



HAL
open science

Caractérisation de microparticules par méthodes diélectrophorétiques : applications aux cellules biologiques

Julie Laforet-Ast

► **To cite this version:**

Julie Laforet-Ast. Caractérisation de microparticules par méthodes diélectrophorétiques : applications aux cellules biologiques. Energie électrique. Ecole Centrale de Lyon, 2010. Français. NNT : . tel-00492027v1

HAL Id: tel-00492027

<https://theses.hal.science/tel-00492027v1>

Submitted on 14 Jun 2010 (v1), last revised 16 Feb 2011 (v3)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée devant

L'ÉCOLE CENTRALE DE LYON

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Préparée au sein de

**L'ÉCOLE DOCTORALE
ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE
DE LYON**

par

Julie LAFORÊT-AST

Caractérisation de microparticules par méthodes diélectrophorétiques : applications aux cellules biologiques

soutenue le 09 mars 2010 devant la commission d'examen

J U R Y

Bruno LE PIOUFLE	Professeur – ENS Cachan	<i>Président</i>
Philippe LEVEQUE	Chargé de recherche CNRS – Université de Limoges	<i>Rapporteur</i>
Gilbert REYNE	Directeur de recherche CNRS – INP Grenoble	<i>Rapporteur</i>
François BURET	Professeur – Ecole Centrale de Lyon	<i>Directeur de thèse</i>
Marie FRENEA-ROBIN	Maître de conférences – Université Claude Bernard Lyon 1	<i>Co-directeur de thèse</i>
Jean-François CHATEAUX	Maître de conférences – Université Claude Bernard Lyon 1	<i>Examineur</i>

L'expérience n'est une lumière qui n'éclaire que soi-même

Lao-Tseu

L'important n'est pas de convaincre, mais de donner à réfléchir

Bernard Werber

REMERCIEMENTS

On ne sait pas ce qu'il nous attend et encore moins tout ce qu'une thèse va exiger de nous-mêmes. Un tel travail, qui plus est dans un milieu pluridisciplinaire, ne peut se construire et aboutir sans le concours et le soutien de nombreuses personnes. Sans l'entourage que j'ai eu, je n'y serais pas parvenue. Je souhaite donc remercier toutes les personnes qui y ont contribué.

A ce titre, j'aimerais d'abord adresser mes remerciements à Laurent Nicolas, directeur du laboratoire Ampère, pour m'avoir accueillie et fait découvrir le monde de la recherche ainsi que pour les discussions qui ont eu cours lors des conseils de laboratoire où j'ai découvert un autre décor du monde de la recherche. Merci aussi pour sa confiance illustrée par les conférences auxquelles il m'a donné l'opportunité de participer.

A mes directeurs de thèse : merci à François Buret pour les discussions et les conseils qu'il a su me donner ainsi que pour son soutien. Merci à Marie Frénéa-Robin d'avoir initié et suivi ce travail et qui m'a permis d'avoir une vision plus élargie du monde « interaction champ-cellule ». Merci pour avoir cru en mes capacités pour mener à bien ce travail.

Merci aux rapporteurs : Philippe Levêque, laboratoire XLIM et Gilbert Reyne, laboratoire G2ELAB, d'avoir accepté cette lourde tâche et de toute l'attention qu'ils ont porté à mes travaux de recherche. Merci à Bruno Le Pioufle, laboratoire SATIE, et Jean-François Chateaux, laboratoire INL, pour l'intérêt manifesté à ces travaux.

Merci à Alain Nicolas, directeur de l'école doctorale EEA, pour m'avoir ouvert les portes du monde de l'enseignement avec des conseils fort profitables sur la pédagogie.

Merci aux stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer et avec lesquelles j'ai pu partager mes connaissances autrement que via l'enseignement !

Merci à Hélène Cérémonie et Jean-Michel Monier pour avoir enseigné à la jeune ingénieure que j'étais les bases (et plus) de la biologie. Merci à Naoufel Haddour et Delina Lyon pour leurs conseils et leurs aides précieuses dans l'élaboration des petites bêtes nommées plus loin liposomes ! Merci à Sébastien Cécillon et Damien Voyer pour les discussions et conseils qui ont contribué à ce travail. Merci à Fabien Sixdenier pour les mesures de champ magnétique.

Merci à tout le personnel administratif du laboratoire pour tous les bonjours adressés avec sourire ce qui n'est pas rien pour commencer une journée et aussi pour les remboursements fort rapides afin que mon banquier n'ai pas à me joindre ... Merci au personnel technique – en particulier Richard Barthollet – pour leur disponibilité et leur aide dans la mise en place de la plateforme. Merci à Alice qui sait nous faire démarrer une journée du bon pied !

Cette thèse n'aurait pas abouti dans des conditions aussi favorables sans le soutien matériel et moral de Yoann. Je tiens ici à lui témoigner toute ma gratitude, de femme enceinte qui de plus est. Merci à Aurélie avec qui discuter lecture et avancement de thèse est un plaisir, Cédric pour toutes les pauses 'zen', Maude et sa fraîcheur de vivre et aussi Nico pour ses fameuses blagues. Merci à mes collègues de bureau anciens et nouveaux et, en particulier, Samuel la gentillesse même, Sanâa et ses sourires quotidiens et Slama pour les discussions enrichissantes que nous avons eu. Merci à tous les doctorants et docteurs pour les discussions et les découvertes que l'on peut faire à travers la richesse de chaque personne et de leur culture ! Merci à Sibel (et sa petite famille) et les 2 Nathalie, écoute et conseils empreints de pédagogie et de gentillesse toujours au rendez-vous. Et merci à chacune pour les « repas » !

Merci à Guillaume, Fred, Marianne, Richard & Eulalie d'avoir été là pendant les vacances ou les week-ends, pour les randos ou une bonne partie de tarot ! Merci pour l'avant, le pendant et l'après mariage, j'ai été comblée de votre attention et de votre gentillesse à tous !

Une pensée particulière pour ma meilleure amie Cathy atteinte de sclérose en plaques depuis ses 25 ans. En espérant que la recherche aura tous les moyens nécessaires pour avancer le plus vite possible, pour comprendre cette maladie et apporter des traitements.

Un grand merci à mes parents de m'avoir soutenue et poussée à arriver jusque là et à qui j'annonce enfin : « les études, j'arrête ! ». Ils sont la preuve qu'un lien parents-enfants est précieux et j'ai une infinie estime envers eux. Merci à ma grand-mère Colette pour son amour, son attention et ses tricots, en particulier 2 belles robes que l'on m'envie toujours !

Merci à celle qui m'a quotidiennement sortie, fait rencontrer des gens et à chaque fin de journée apporte sa part de joie et de folie, merci à ma petite Bahia.

Les derniers mots reviennent à celui qui a toujours su être là : Johann. Merci pour toutes les raisons qui font, qu'avec toi, je suis heureuse et sereine et je sais que j'ai mis ta patience et ton écoute à rude épreuve. Chapeau d'avoir aussi bien mené ta thèse : pour la suite, je serais à tes côtés, comme depuis ces 9 années ... avec, pour une nouvelle vie à deux : l'arrivée de notre fille !

RESUME

Titre : Caractérisation de microparticules par méthodes diélectrophorétiques : applications aux cellules biologiques

Mots clés : électrorotation ; cellules biologiques ; champs électromagnétique

Title : Characterization of microparticles by dielectrophoretic methods : applications to biological cells

Keywords : electrorotation ; biological cells ; electromagnetic fields

Durant ces dernières décennies, les sources électromagnétiques se sont multipliées : l'exposition quotidienne de l'homme s'en est retrouvée considérablement accrue. L'étude des effets des champs sur l'organisme passe par une meilleure compréhension des phénomènes à l'échelle de la cellule, unité de base de l'être vivant. Nos objectifs dans le cadre de ce travail portent sur la caractérisation électrique des cellules et, plus précisément, des deux principaux compartiments cellulaires que représentent le cytoplasme et la membrane. A terme, l'objectif est de fournir les permittivités et conductivités de ces couches afin de renseigner les modèles qui seront utilisés pour la simulation de l'interaction champ-vivant. Lorsqu'une cellule est placée dans un champ électrique tournant (généralisé par des microélectrodes), elle tourne sur elle-même sous l'effet de polarisation des cellules : c'est le principe de l'électrorotation. Le sens et la vitesse de rotation dépendent des propriétés cellulaires et de la fréquence du champ. La mise au point d'une plateforme expérimentale dédiée et automatisée (génération du champ, acquisition et traitement des images, extraction des propriétés) a permis d'accéder aux propriétés électriques des différentes couches sur des levures et des liposomes à travers le tracé du spectre d'électrorotation. Plusieurs études ont permis de valider le fonctionnement de cette plateforme et d'évaluer l'impact des traitements thermique et enzymatique sur des levures ainsi que l'influence de la composition du milieu interne sur le spectre d'électrorotation de liposomes. Par ailleurs, une étude théorique portant sur l'identification paramétrique a montré qu'il est possible d'améliorer l'extraction de certains paramètres en se basant sur une analyse de sensibilité du spectre d'électrorotation à ces paramètres. La mise en place récente d'une salle de culture va permettre d'explorer une gamme plus large de cellules vivantes et d'étudier les effets de sources de champ magnétique sur celles-ci.

Direction de recherche :

François BURET, Professeur à l'Ecole Centrale de Lyon, francois.buret@ec-lyon.fr

Marie FRENEA-ROBIN, Maître de conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1

marie.frenea-robin@univ-lyon1.fr

Laboratoire Ampère (CNRS UMR5005)

<http://www.ampere-lab.fr>

Ecole Centrale de Lyon

36 avenue Guy de Collongue
69134 Ecully CEDEX (France)

Version électronique de cette thèse :

<http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00xxxxxxx>

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : CARACTERISATION PHYSIQUE DES CELLULES BIOLOGIQUES	3
I. LA CELLULE	3
1. Propriétés biologiques	3
1.1. La membrane	4
1.2. Le cytoplasme	5
2. Propriétés physiques	6
2.1. Propriétés mécaniques	6
2.2. Propriétés magnétiques	8
2.3. Propriétés diélectriques	9
II. TECHNIQUES DE CARACTERISATION PHYSIQUE DES CELLULES	13
1. Mesure des propriétés magnétiques	14
1.1. Magnétophorèse	14
1.2. Balances magnétiques et autres systèmes existants	16
2. Mesure des propriétés mécaniques	20
2.1. Exploitation de la force optique	20
2.2. Autres techniques	22
3. Mesure des propriétés électriques	24
3.1. Analyse globale sur suspension cellulaire	24
3.2. Spectroscopie diélectrique sur cellules isolées	26
III. ELECTROROTATION	28
1. Principe	29
1.1. Notion de polarisation	29
1.2. Diélectrophorèse	30
1.3. Électrorotation	32
2. Signature diélectrophorétique	33
2.1. Notion de spectre	33
2.2. Modèles de cellules	34
2.3. Méthodes de détermination	36
3. Exemples d'application	38
3.1. Étude de viabilité	38
3.2. Étude de comportement	38
3.3. Mesure des paramètres électriques de cellules	40
3.4. Séparation	41
IV. CONCLUSION	41
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	43
I. MATERIELS BIOLOGIQUES	43
1. Préparation des levures	44
1.1. Mises en culture	44
1.2. Préparation d'échantillons	44
2. Fabrication des liposomes	44
2.1. Par électroformation	45
2.2. Par extrusion	47
II. DISPOSITIF EXPERIMENTAL	48
1. Système de génération du champ électrique	48
1.1. Microsystème	48
1.2. Matériel et interface	51
2. Système d'observation	53
2.1. Microscope optique	53

2.2. Caméra de visualisation et logiciel d'acquisition.....	54
3. Protocole expérimental.....	54
3.1. Mise au point d'un tampon.....	54
3.2. Plan d'expériences.....	56
III. SPECTRE.....	57
1. Mise en œuvre du procédé de mesure.....	57
1.1. Acquisition des images.....	57
1.2. Données.....	58
1.3. Définitions préliminaires.....	58
2. Mesure de la vitesse de rotation.....	58
2.1. Traitement d'images.....	58
2.2. Critères de sélection.....	60
2.3. Suivi des objets dans une séquence.....	60
2.4. Archivage et exploitation des données.....	61
IV. CONCLUSION.....	63
CHAPITRE III : IDENTIFICATION PARAMETRIQUE.....	65
I. CARACTERISATION.....	65
1. Méthodes appliquées au modèle à deux couches.....	66
1.1. Considérations par rapport au spectre.....	67
1.2. Analyse de sensibilités à partir de la variance.....	68
1.3. Pondération.....	70
1.4. Optimisation.....	73
2. Modèle à trois couches.....	75
II. SENSIBILITE.....	76
1. Influence du choix des plages de variations des paramètres.....	76
2. Effet de la conductivité du milieu de suspension.....	78
3. Sensibilités selon la taille de la cellule.....	79
III. CONCLUSION.....	80
CHAPITRE IV : APPLICATIONS ET DISCUSSION.....	83
I. COMPORTEMENT CELLULAIRE : LES LEVURES.....	83
1. Evolution fréquentielle.....	83
1.1. Paramètres électriques.....	83
1.2. Influence du milieu.....	85
2. Intégrité membranaire.....	86
2.1. Traitement thermique.....	86
2.2. Traitement enzymatique.....	89
II. MODIFICATION DE LA STRUCTURE : LES LIPOSOMES.....	91
1. Paramètres électriques.....	92
2. Liposomes électroformés.....	95
III. DEVELOPPEMENT EN COURS ET PERSPECTIVES.....	98
1. Modélisation de l'électrorotation.....	98
2. Effets des champs magnétiques.....	99
IV. CONCLUSION.....	100
CONCLUSION.....	103
TABLE DES FIGURES.....	106
TABLE DES TABLEAUX.....	108
ANNEXE I : MODELE ANALYTIQUE DE LA PERMITTIVITE EQUIVALENTE.....	109
ANNEXE II : PROTOCOLE D'ELECTROFORMATION.....	112
ANNEXE III : PROTOCOLE D'EXTRUSION.....	113
ANNEXE IV : VARIANCE ET EFFET TOTAL.....	114
BIBLIOGRAPHIE.....	115

INTRODUCTION

La maîtrise des effets des champs électromagnétiques sur le vivant constitue un enjeu scientifique et sociétal majeur. Durant ces dernières décennies, les sources électromagnétiques se sont multipliées : l'exposition quotidienne de l'homme s'en est retrouvée considérablement accrue. Le grand public a souvent une perception néfaste des nouvelles technologies et de leur impact sur la santé malgré les applications potentielles de ces champs dans le domaine médical telles que l'imagerie médicale ou le traitement de certains cancers (hyperthermie). De nombreuses études se sont orientées vers les interactions entre les champs électromagnétiques et la matière vivante (*e.g.* l'étude du comportement des cellules cardiaques lors des électrochocs).

L'étude des effets des champs sur l'organisme, de la cellule à l'être humain, passe par une meilleure compréhension des phénomènes à l'échelle de la cellule, unité de base de l'être vivant. Avec les progrès de la biochimie, de la génétique et des techniques de laboratoire, les mécanismes régissant le fonctionnement interne de la cellule sont de mieux en mieux compris. Les microsystèmes dédiés à la caractérisation et à la manipulation de cellules jouent un rôle essentiel dans la compréhension de ces mécanismes et participent à la mise au point de nouveaux traitements ou outils de diagnostic permettant de mieux dépister, par exemple, les cellules de la leucémie ou du cancer du sein. Le champ d'investigation de la matière vivante est vaste ; en effet, la cellule est caractérisée par de nombreuses propriétés biologiques et physiques. Nous nous intéressons aux propriétés électriques de la cellule afin d'appréhender qualitativement et quantitativement l'effet du champ électrique. En particulier, l'un de nos principaux objectifs consiste à mesurer les paramètres électriques des principaux compartiments cellulaires tels que le cytoplasme et la membrane afin de renseigner des modèles permettant de simuler le comportement de cellules exposées à une source de champ. L'étude de l'interaction du champ avec des cellules est une première étape avant de pouvoir investiguer des communautés cellulaires et de remonter, par exemple, aux comportements des tissus.

Dans un premier volet, nous présentons la cellule au niveau biologique et répertorions ses propriétés physiques dont la mesure peut être exploitée pour caractériser la cellule en détaillant plus précisément leur caractérisation électrique. Celle-ci repose généralement sur l'analyse globale de suspensions cellulaires ou sur l'étude de cellules isolées soumises à un champ électrique dont on fait varier la fréquence. En particulier, les techniques de diélectrophorèse et d'électrorotation permettent une investigation sans contact de la cellule. Elles induisent respectivement un mouvement de translation et de rotation dont les caractéristiques (sens et vitesse) renseignent sur ses propriétés électriques. Nous verrons que chaque type de cellule,

suivant son état physiologique, a un comportement diélectrophorétique propre. Enfin, nous terminons par une présentation non exhaustive des applications potentielles de l'électrorotation.

Dans un second volet, nous présentons les modèles cellulaires étudiés ainsi que leur préparation en vue des expériences (culture dans le cas des levures ou techniques de formation dans le cas de vésicules artificiellement formées). Nous décrivons ensuite le banc d'instrumentation dédié à la manipulation de cellules par diélectrophorèse et par électrorotation. Lors des expériences d'électrorotation, les cellules sont soumises à un champ électrique tournant par l'intermédiaire d'un microsystème d'électrodes dédié pour une gamme de fréquence allant de 10 kHz à 80 MHz. Un système d'observation alliant microscope et caméra vidéo permet la visualisation du comportement des cellules mais aussi l'acquisition d'images. Celles-ci seront par la suite analysées par traitement d'images et la vitesse de rotation sera évaluée pour chaque point de fréquence étudié par un programme développé sous Matlab[®], ce qui nous permet d'obtenir le spectre d'électrorotation des cellules. L'automatisation du banc, indispensable à une manipulation aisée des particules biologiques, est également exposée dans ce chapitre.

Nous développons, dans un troisième volet, les méthodes d'identification paramétrique par minimisation dans le cas d'un modèle cellulaire à 2 compartiments. Dans un premier temps, nous décrivons les différents paramètres que nous cherchons à extraire au cours de nos expériences. Une étude préliminaire de sensibilité du spectre d'électrorotation à ces différents paramètres, basée sur une analyse de la variance, nous permet d'améliorer la procédure d'identification paramétrique. Une étude théorique de l'influence des conditions expérimentales sur le spectre d'électrorotation est également réalisée. Compte tenu de la faible épaisseur de la membrane, nous verrons qu'il est difficile d'extraire la conductance membranaire qui est parfois sacrifiée au profit des autres paramètres.

Enfin, le dernier volet porte sur la caractérisation expérimentale de 2 modèles cellulaires : les levures, aisément manipulables et que l'on se procure facilement, et les liposomes, vésicules artificiellement formées, qui sont d'un grand intérêt de par leur structure cellulaire simplifiée et la possibilité de contrôler leur composition (membrane et milieu interne). Nous explorons les paramètres électriques des levures et l'impact des effets de traitements thermique et enzymatique sur celles-ci. L'étude des liposomes porte sur l'influence de la composition lipidique membranaire et de la conductivité du milieu interne. Avec les techniques d'extrusion et d'électroformation, nous obtenons des liposomes dans une grande gamme de tailles ce qui nous permet d'étudier l'influence de ce paramètre. Enfin, nous présentons des résultats préliminaires issus de l'étude de l'effet d'une exposition de levures en culture à un champ magnétique ainsi que les travaux de modélisation de l'électrorotation réalisés au sein du laboratoire.

CHAPITRE I : CARACTERISATION PHYSIQUE DES CELLULES BIOLOGIQUES

Le besoin de caractérisation des cellules s'explique tant par la nécessité de diagnostiquer certaines anomalies (cancer du sein, par exemple) que par celle d'évaluer l'impact de leur environnement sur leur développement (exposition électromagnétique, par exemple) ... Ainsi, nous verrons tout d'abord que les cellules présentent une structure biologique universelle ainsi que différentes propriétés physiques exploitables à des fins de caractérisation. Puis, nous présenterons les techniques de caractérisation pouvant être mises en œuvre compte tenu de ces propriétés. Enfin, nous porterons notre attention sur la caractérisation électrique des cellules par électrorotation dont le principe sera explicité et illustré par des exemples d'applications.

I. LA CELLULE

Nous décrivons dans un premier temps la structure biologique de la cellule, puis nous compléterons cette description par une présentation de ses propriétés physiques intrinsèques (mécanique, magnétique et diélectrique).

1. Propriétés biologiques

Tous les êtres vivants sont constitués de cellules, unités élémentaires vivantes. La classification des cellules est basée sur l'existence ou non d'un noyau au sein de celles-ci :

- les procaryotes dépourvues de noyau (les bactéries, par exemple),
- les eucaryotes qui possèdent un noyau (la plupart des cellules humaines, par exemple).

Parmi les êtres vivants constitués de cellules eucaryotes, deux grandes catégories se dégagent : ceux formés d'une seule cellule dits unicellulaires et ceux formés de plusieurs cellules regroupées en tissus pour former les différents organes d'un organisme dits pluricellulaires. La taille typique des cellules eucaryotes est de l'ordre d'une dizaine de micromètres. La Figure I.1 montre l'échelle des tailles des systèmes biologiques et des dimensions de dispositifs technologiques du nanomètre au centimètre.

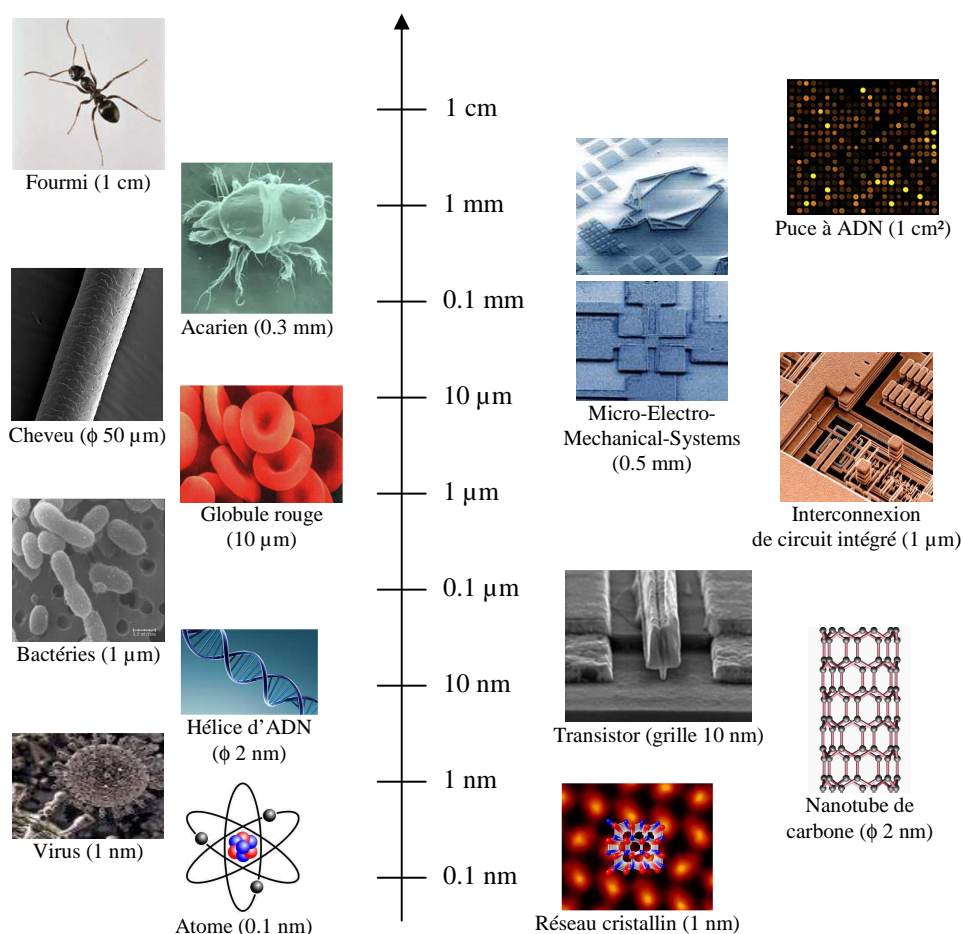


Figure I.1 : Dimensions caractéristiques des structures biologiques et technologiques

De formes variées, les cellules présentent des constitutions plus ou moins complexes avec cependant une structure universelle. En effet, elles sont toutes délimitées par une membrane qui renferme des molécules qui baignent dans un milieu gélatineux appelé le cytoplasme.

1.1. La membrane

La membrane, formée d'une bicouche lipidique (Figure I.2) renfermant des protéines, est une enveloppe qui délimite, entoure et protège la cellule [1]. Grâce à cette structure moléculaire inhomogène, la membrane joue un double rôle dans la vie de la cellule : à la fois en tant qu'isolant et en tant que filtre :

- les molécules lipidiques, arrangées en une bicouche épaisse de 5 à 10 nm, forment une barrière imperméable au passage de la plupart des molécules solubles dans l'eau ; elles bloquent totalement le passage des ions inorganiques (K^+ , Na^+ , Cl^- , Cl^{2+} , ...) et freinent la diffusion des solutés organiques polaires tels les acides aminés,
- les protéines ont pour rôle de réguler les échanges transmembranaires ; en elle-même, la membrane n'est perméable qu'aux petites molécules hydrophobes (O_2 , N_2 , glycérol, ...).

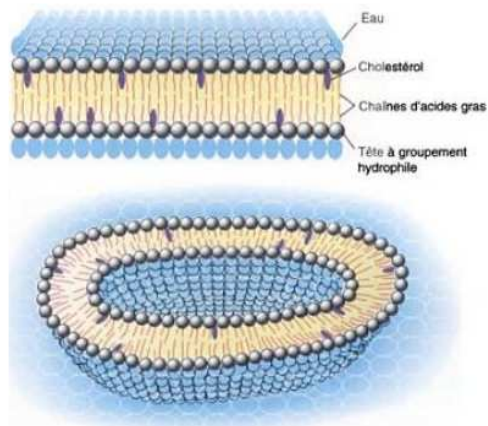


Figure I.2 : Structure d'une membrane : toute bicouche peut se refermer sur elle-même pour former une cellule

La structure en bicouche est due aux propriétés amphiphiles des molécules lipidiques qui possèdent une tête hydrophile et 2 queues hydrophobes.

1.2. Le cytoplasme

Le cytoplasme est un milieu fluide où l'eau représente 70% de la masse cellulaire.

Les cellules eucaryotes ont compartimenté dans le cytoplasme (Figure I.3) les éléments assurant la gestion des processus nécessaires à leur fonctionnement : se reproduire, se nourrir, se déplacer et se défendre. Ces compartiments (appelés organites) ont chacun une fonction biologique propre pour la production, la dégradation, la régulation ou le maintien cellulaire. Toutes les cellules ont les mêmes organites, mais en fonction de leur rôle dans l'organisme, ceux-ci sont plus ou moins développés. Le cytoplasme peut se déformer grâce à la présence d'un cytosquelette qui se déconstruit et se reconstruit sans cesse.

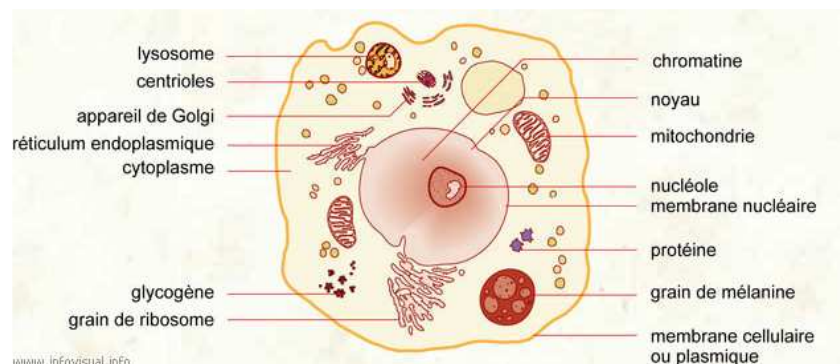


Figure I.3 : Structure d'une cellule eucaryote (source : <http://www.infovisual.info/>)

Les principales réactions du métabolisme et la synthèse des protéines intracellulaires se déroulent dans le cytoplasme qui assure aussi la duplication de l'ADN et la synthèse d'ARN (fonctions du noyau) et entre autres la synthèse des protéines extracellulaires (fonction du réticulum endoplasmique) ainsi que la respiration (fonction des mitochondries). À l'inverse du noyau chez les cellules eucaryotes, la cellule procaryote (Figure I.4) possède un filament d'ADN qui contient l'information génétique et qui n'est pas protégé par une membrane nucléaire.

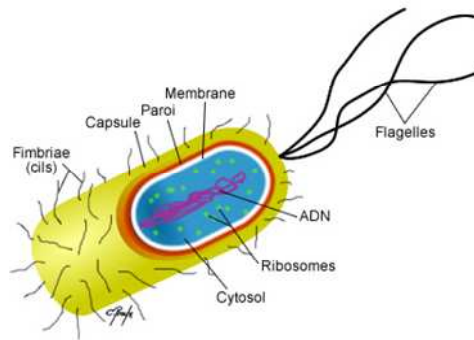


Figure I.4 : Structure d'une cellule procaryote

2. Propriétés physiques

Ces dernières années ont vu une prise de conscience croissante du rôle que jouent les aspects physiques dans les interactions de la cellule biologique avec son environnement mais aussi dans des processus biologiques fondamentaux [2]. Il est possible de caractériser une cellule à partir de ses propriétés acoustiques, mécaniques, magnétiques, optiques et électriques. L'enjeu à long terme de la caractérisation est la mise à disposition de la communauté scientifique de bases de données exhaustives et robustes en vue d'applications ou d'études en biophysique.

Aussi, de nombreuses techniques actuelles (mécaniques, électriques, optiques ou encore acoustiques) sont employées dans les bio-microsystèmes à des fins de caractérisation (mesure des propriétés physiques intrinsèques d'une cellule) [3] ou de manipulation (tri, transport, micro-positionnement).

2.1. Propriétés mécaniques

Afin d'analyser la réponse de cellules soumises à des sollicitations mécaniques comme l'accélération ou la gravité [4], les chercheurs tendent à caractériser les modules d'élasticités des différents types cellulaires. Le module élastique ou module d'Young, noté E , caractérise la résistance intrinsèque d'un matériau à une contrainte mécanique qu'il faut exercer pour en doubler la longueur; à titre d'exemple, le module d'Young de la membrane d'un globule rouge est de 1 kPa [5]. Il a aussi été montré que des cellules se déformaient en présence de substances chimiques, c'est le cas des fibroblastes V-79 qui ont la particularité de prendre la forme de la lettre ϕ en réaction à la molécule de cytochalasine B [6].

Les cellules vivantes sont dotées de propriétés mécaniques leur permettant d'accomplir certaines fonctions cellulaires (Figure I.5) comme l'adhésion ou la migration. La régulation de ces fonctions dépend de l'environnement mécanique comme la peau, les muscles [7] ou encore le cerveau. Dans ce contexte, un GdR (Groupe de Recherche) a été mis en place au 1^{er} janvier 2008 sur la mécanotransduction – processus de transformation des signaux mécaniques externes en

signaux biologiques [8, 9] – afin de mieux comprendre les processus impliqués, par exemple, dans l'évolution du tissu osseux tel que le remodelage sous l'action de contraintes mécaniques. La coordination des cellules, qui interagissent entre-elles pour assurer l'intégrité des tissus, passe par l'amplitude des contraintes et des déformations qui sont transmises par le cytosquelette aux différents points de contact que la cellule met en place avec son environnement [10].

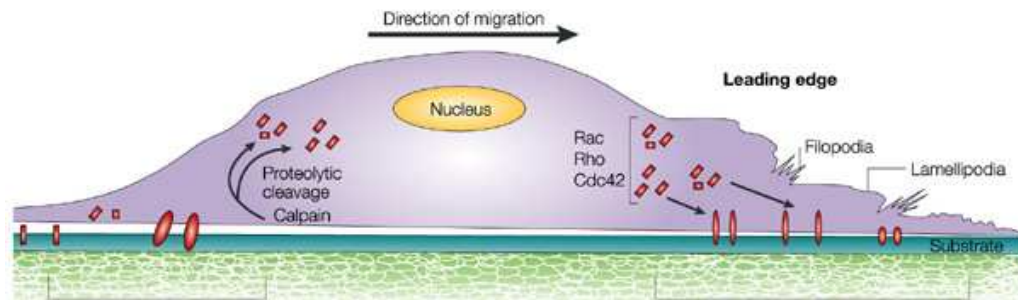


Figure I.5 : La cellule adhère sur le substrat via des complexes d'adhésion (en rouge), l'extension de la membrane est gouvernée par la dynamique du cytosquelette qui permet de faire migrer la cellule [11]

La compréhension des mécanismes de couplage entre l'adhésion des cellules et la nature physique de leur environnement est un enjeu crucial pour la biologie ; à titre d'exemple, la rigidité du substrat peut réguler la différenciation des cellules souches [12]. L'étude de l'adhérence des cellules en culture est importante ; par exemple, pour connaître le potentiel migratoire de cellules cancéreuses [13]. Dans le domaine des biomatériaux, on peut aussi citer les travaux conduits au laboratoire BMBI (BioMécanique et BioIngénierie) de Compiègne autour d'un thème de recherche intitulé « de l'interaction cellule-matériaux à l'organe artificiel » ; nous pouvons citer à titre d'exemple les travaux de Velzenberger portant sur un revêtement cellulosique de boîtes pour cultures cellulaire bioactives [14]. Des chercheurs de l'université de Princeton ont mis au point des filtres mécaniques pour séparer différents types de cellules sanguines à partir de leur propension à adhérer aux surfaces, d [15].

Une cellule est aussi caractérisée par sa masse volumique, notée ρ , ainsi que sa compressibilité, notée β , propriété qu'ont les corps de diminuer de volume sous l'effet d'une pression. Elle peut être définie par $\beta = 1/\rho c^2$ où c correspond à la vitesse du son dans le matériau considéré. A titre d'exemple, la densité de l'eau et celle des globules rouges valent 0,997 et 1,139 g.cm⁻³ [16] respectivement. En ce qui concerne leur compressibilité, elles valent respectivement 4,48.10⁻¹⁰ et 3,38.10⁻¹⁰ Pa⁻¹ ; une étude montre qu'une diminution de la concentration de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges entraîne une augmentation de leur compressibilité [17]. La densité et la compressibilité des cellules et de leur milieu environnant interviennent dans l'expression de la force acoustique, de plus en plus exploitée dans les dispositifs de micromanipulation de cellules [18].

2.2. Propriétés magnétiques

Le comportement d'une cellule en présence d'un champ magnétique dépend de sa susceptibilité magnétique (notée χ) [19]. Cette propriété désigne la capacité d'un matériau à s'aimanter sous l'effet d'un champ magnétique (Figure I.6). χ est reliée à la perméabilité relative μ_r par l'équation $\chi = \mu_r - 1$; ainsi, la susceptibilité du vide est nulle. Lorsque $\chi > 0$, le matériau est dit paramagnétique ; pour $\chi < 0$, il est dit diamagnétique (Figure I.7).

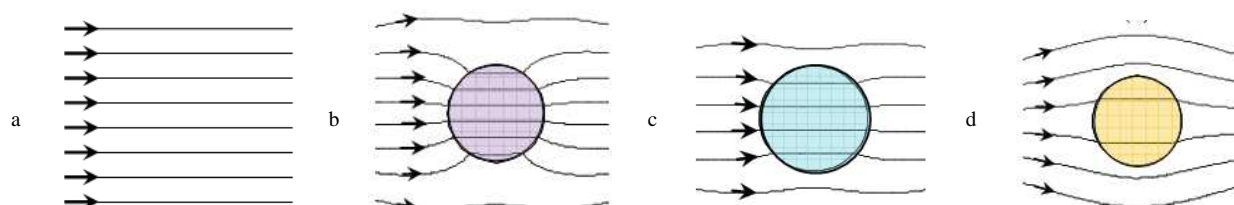


Figure I.6 : (a) Isovaleurs de la densité de flux magnétique issu d'une source magnétique. Modification de cartographie suite à la présence d'un corps (b) ferromagnétique (c) paramagnétique (d) diamagnétique

La plupart des cellules sont faiblement diamagnétiques, leur susceptibilité magnétique volumique se rapproche de celle de l'eau valant $-9,05 \cdot 10^{-6}$ unité SI [20]. L'échelle donnée Figure I.7 permet d'avoir une vue d'ensemble de la gamme de susceptibilités magnétiques des matériaux.

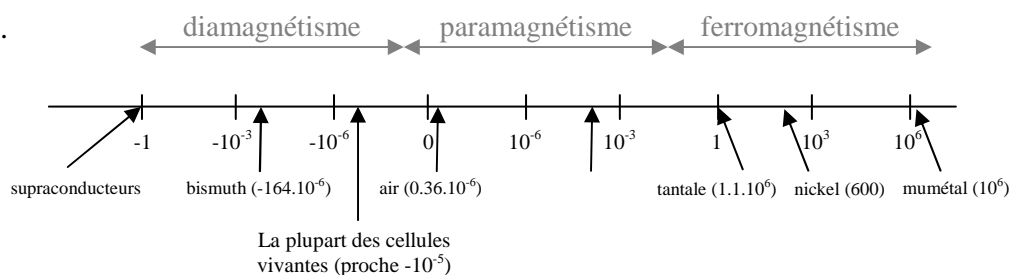


Figure I.7 : Echelle de susceptibilités magnétiques (unité SI)

Il existe quelques exceptions :

- les globules rouges qui contiennent une grande concentration de fer dans l'hémoglobine – molécule paramagnétique qui permet le transport de l'oxygène – sont des cellules diamagnétiques mais ont une susceptibilité plus importante que celle de l'eau ($-6,52 \cdot 10^{-6}$ pour les globules désoxygénés [20]),
- Les bactéries magnétotactiques ont des propriétés magnétiques intrinsèques qui leur permettent de se déplacer le long des lignes de champ magnétique terrestre [21, 22]. Elles synthétisent naturellement des chaînes intracellulaires de nanoparticules magnétiques Fe_3O_4 appelés magnétosomes (Figure I.8) et des études ont montré une nouvelle méthode pour cultiver et assembler des nanoparticules dans des structures ordonnées par manipulation avec des micro-aimants après lyse de la membrane [23].

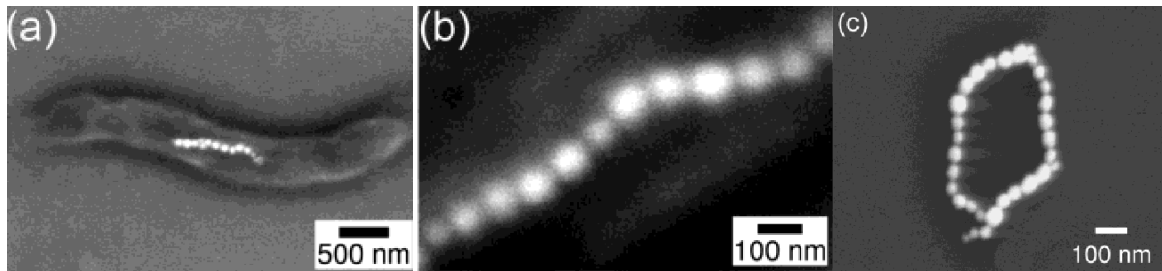


Figure I.8 : *Magnetospirillum magnetotacticum* (a) la bactérie synthétise une chaîne de nanoparticules qui est ancrée à l'intérieur de son corps (b) chaque particule est recouverte d'une membrane (c) anneau de nanoparticules formé par la manipulation et la lyse de deux bactéries magnétotactiques

La résonance magnétique nucléaire est une technique d'analyse non destructive très utilisée pour l'étude de matériaux ou l'imagerie médicale. Actuellement, la méthode utilisée pour observer les zones actives du cerveau est basée sur l'aimantation de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges [24]. En effet, l'activation génère un appel massif de sang oxygéné local ; en suivant la perturbation du signal de résonance magnétique nucléaire émis par une molécule active de l'hémoglobine [25], il est possible de localiser ces zones.

2.3. Propriétés diélectriques

- Indice de réfraction

Quand un faisceau de lumière (onde électromagnétique) pénètre dans un organisme, les propriétés optiques, telles que l'absorption et la dispersion, déterminent la transmission et la distribution de la lumière. La modification de la propagation des faisceaux par leur interaction avec le milieu matériel dans lequel ils se propagent est caractérisée par l'indice de réfraction.

L'indice de réfraction, noté n , représente le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et celle dans le milieu de propagation. C'est un paramètre important pour comprendre et prédire le comportement de la lumière (transport dans les tissus biologiques, interaction avec des objets biologiques) et pour les applications en diagnostic optique et en traitement laser. Il intervient dans l'expression de la force optique décrite dans la partie II.2.1 de ce chapitre. La plupart des cellules ont des indices de réfraction voisins malgré des tailles et des formes très différentes ; pour exemple, l'indice de réfraction de l'eau, des cellules mammifères et du plasma sanguin sont respectivement de 1,333 [26], de 1,38 à 1,41 [27, 28] et 1,351 [29].

- Permittivité et conductivité électriques

Autour et à l'intérieur de chaque cellule vivante, des champs électriques sont présents et peuvent être critiques au bon fonctionnement des processus biologiques [30]. La caractérisation électrique des cellules, qui s'intéresse à la mesure de l'impédance, est donc un point clé pour la compréhension des phénomènes intrinsèques ou non à la cellule.

La réponse d'une cellule en présence d'un champ électrique dépend de deux paramètres que sont la permittivité électrique relative (notée ϵ_r) qui reflète la capacité à polariser un matériau par accumulation de charges et la conductivité électrique (notée σ) qui reflète la capacité à laisser passer un courant électrique avec un minimum de pertes. Le comportement de la cellule résulte de la différence de permittivités complexes entre le milieu extracellulaire et la cellule (Figure I.9).

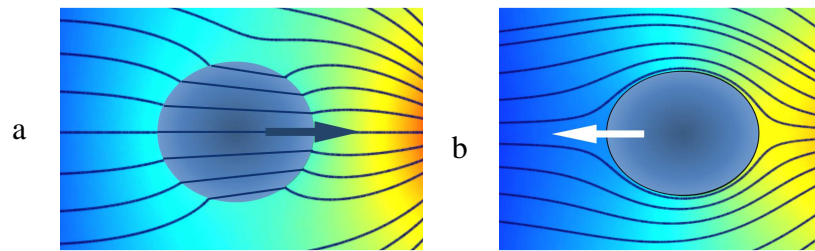


Figure I.9 : Lignes de champ électrique (a) cas où la particule est plus (b) ou moins polarisable que le milieu

Pour étudier l'influence des champs électromagnétiques sur les cellules, il est nécessaire de construire un modèle électrique. En 1^{ère} approche, la cellule peut être assimilée à un circuit électrique composé d'une capacité C_{mem} représentant la membrane (modélisation du phénomène de polarisation apparaissant à l'interface) reliée en série avec une résistance R_i représentant le milieu intracellulaire ou plutôt les charges libres internes à la cellule [31, 32]. Le milieu externe est symbolisé par une résistance R_m en parallèle avec une capacité C_m (Figure I.10).

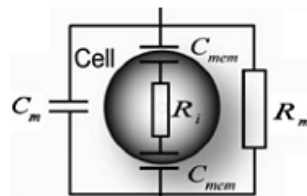


Figure I.10 : Modèle de circuit équivalent pour une cellule en suspension [33]

La cellule est une structure hétérogène composée d'un cytoplasme (milieu interne noté i) de rayon R , entouré d'une membrane (notée mem) d'épaisseur d immergée dans un milieu externe (noté m) (Figure I.11).

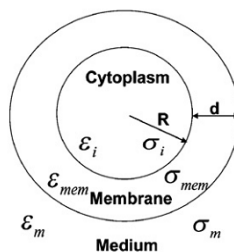


Figure I.11 : Modèle monocouche d'une cellule de forme supposée sphérique

La permittivité complexe d'une particule s'exprime par : $\varepsilon_p^* = \varepsilon_0 \varepsilon_r - j\sigma/\omega$ avec $\varepsilon_0 = (36.\pi.10^9)^{-1} F.m^{-1}$ la permittivité du vide, ε_r la permittivité relative (sans unité) et σ la conductivité électrique. ε_p^* peut aussi être exprimée en fonction des propriétés électriques et géométriques des différentes couches qui composent la particule, d'après un modèle analytique élaboré en 1978 par Irimajiri *et al.* [34] *i.e.* pour la Figure I.11 :

$$\varepsilon_p^* = \varepsilon_{mem}^* \frac{\left(\frac{R+d}{R}\right)^3 + 2\left(\frac{\varepsilon_i^* - \varepsilon_{mem}^*}{\varepsilon_i^* + 2\varepsilon_{mem}^*}\right)}{\left(\frac{R+d}{R}\right)^3 - \left(\frac{\varepsilon_i^* - \varepsilon_{mem}^*}{\varepsilon_i^* + 2\varepsilon_{mem}^*}\right)} \quad \text{Équation I.1}$$

Des compartiments supplémentaires (représentant le noyau cellulaire par exemple) peuvent être ajoutés ce qui tend à rendre le modèle plus complexe. Le paragraphe III.2.2. de ce chapitre sera consacré aux différents modèles physiques et analytiques des cellules.

La permittivité et la conductivité électriques dépendent de la fréquence du signal électrique d'excitation. Un exemple représentatif du comportement fréquentiel des propriétés électriques de cellules est tracé pour le cas de cellules humaines de type Jurkat (paramètres électriques référencés dans le Tableau I.2) avec $R = 5\mu m$ et $d = 5nm$.

En partant des équations de Maxwell-Gauss et Maxwell-Ampère, la permittivité complexe équivalente de la cellule s'exprime en fonction des permittivités complexes du cytoplasme et de la membrane par :

$$\varepsilon_{eq}^* = \frac{2R + 2d}{\frac{2d}{\varepsilon_{mem}^*} + \frac{2R}{\varepsilon_i^*}} = \varepsilon_{eq,r} - j \frac{\sigma_{eq}}{\varepsilon_0 \omega} \quad \text{Équation I.2}$$

En analysant l'expression déduite d'un modèle analytique 1D que nous avons développé (Annexe I), nous retrouvons les valeurs extrêmes pour la permittivité complexe de la cellule obtenue avec le modèle analytique développé par Irimajiri (Tableau I.1) :

- en basse fréquence : $\varepsilon_{eq,r} \cong \frac{R}{d} \varepsilon_{mem,r}$ et $\sigma_{eq} \cong \frac{R}{d} \sigma_{mem}$
- en haute fréquence : $\varepsilon_{eq,r} \cong \varepsilon_{i,r}$ et $\sigma_{eq} = \sigma_i$

Fréquences	$\varepsilon_{p,r}$	σ_p (en S.m ⁻¹)
10 kHz	5,905.10 ³	0,003
80 MHz	45,951	0,394

Tableau I.1 : Valeurs numériques obtenues pour les fréquences extrêmes

A basse fréquence, les propriétés électriques de la membrane prédominent : globalement, elle se comporte comme un isolant étant donné la conductivité équivalente (3 mS.m^{-1}) qui est celle de la membrane à un rapport 10^3 près. À plus haute fréquence, elle est shuntée ; le cytoplasme prend le relais en tant que conducteur ; en effet, la partie imaginaire de sa permittivité complexe est deux fois plus importante que la partie réelle. Les paramètres électriques et géométriques des deux compartiments expliquent les valeurs limites obtenues en basse et haute fréquence pour la cellule prise dans sa totalité (Figure I.12).

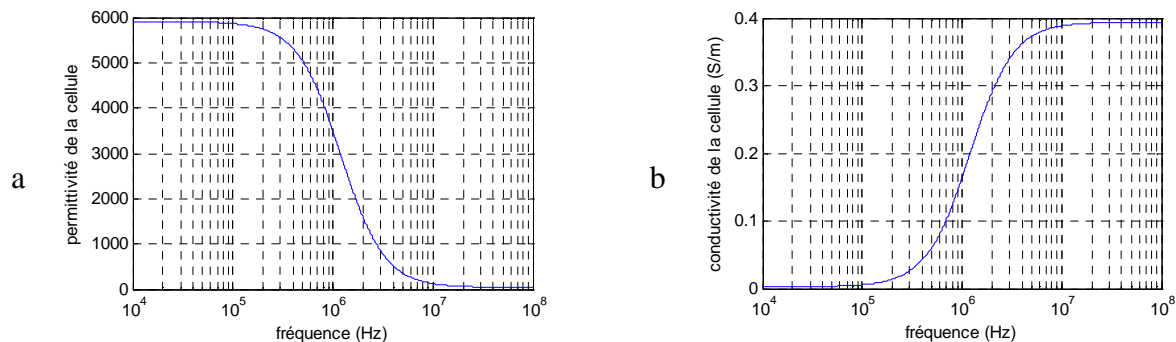


Figure I.12 : La permittivité complexe est fonction de la fréquence ; comportement pour une cellule sphérique à 2 couches. Représentation de (a) la permittivité électrique (b) la conductivité électrique [35]

En s'intéressant à une organisation d'ordre supérieur, il apparaît que les tissus musculaires ont des permittivités relatives allant de 100 pour une fréquence de 0,1 GHz à 10^5 pour 10 kHz [36, 37]. Comme pour les tissus, l'étendue des plages de valeurs trouvées pour les cellules, dans leur ensemble, se justifie donc par leur structure électrique et physique hétérogène.

L'eau possède une permittivité relative de l'ordre de 80 [38] et une conductivité électrique (cas de l'eau ultra pure) de $4,2 \mu\text{S.m}^{-1}$ [39]. Différents types de cellules étudiées par électrorotation sont énumérés par Dalton *et al.* [40] ; pour la plupart des cellules mammifères, les paramètres des différents compartiments varient dans les plages suivantes [41]:

- pour la membrane : $1,2 < \frac{\epsilon_{mem,r}}{d} < 4 \mu\text{F.cm}^{-2}$ et σ_{mem} négligeable
- pour le cytoplasme : $50 < \epsilon_{i,r} < 150$ et $0,1 < \sigma_i < 1,3 \text{ S.m}^{-1}$
- $2 < d < 8 \text{ nm}$

Le Tableau I.2 présente les propriétés pour deux types de cellules humaines :

	$\epsilon_{i,r}$	σ_i (en S.m^{-1})	$\epsilon_{mem,r}$	σ_{mem} (en S.m^{-1})
Globule rouge	59	0,31	4,44	$< 10^{-6}$
Jurkat	45	0,4	6	3.10^{-6}

Tableau I.2 : Caractéristiques de cellules Jurkat (issues de lymphome) [42] et de cellules sanguines [43]

La mesure des paramètres électriques permet, outre l'intérêt scientifique de créer un modèle mathématique de la matière vivante, de différencier des cellules (par exemple, par identification des permittivités et conductivités). Parmi les applications phares, on peut citer le dépistage précoce du cancer du sein [44] : un réseau d'électrodes mesurant l'activité électrique des cellules mammaires se révèle être beaucoup plus sensible que les techniques traditionnelles. Il a aussi été montré que le phénomène d'apoptose (vieillesse programmée des cellules) peut être identifié par une modification de la réponse spectrale de cellules [45]. En ce qui concerne les globules rouges, des études montrent qu'ils se composent d'enveloppes isolantes enfermant un électrolyte conducteur [36]. A titre d'illustration, une étude portant sur la détection du paludisme est résumée Figure I.13.

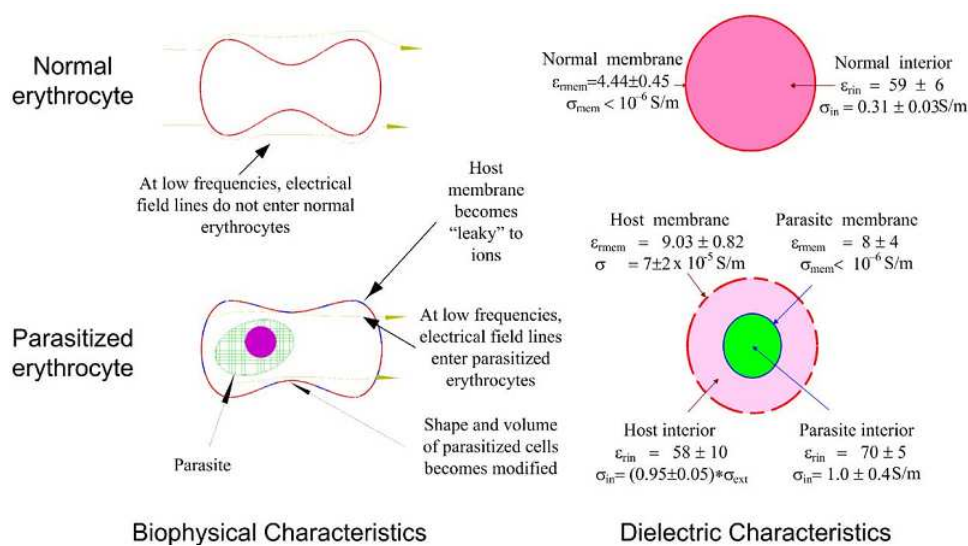


Figure I.13 : Différences biophysiques et diélectriques entre des cellules atteintes ou non de paludisme [43]

II. TECHNIQUES DE CARACTERISATION PHYSIQUE DES CELLULES

L'approche classique en biologie cellulaire consiste à travailler sur un grand nombre de cellules et à accéder aux paramètres pertinents à partir d'une mesure globale, moyennée sur la population cellulaire étudiée. Parfois, cette démarche qui ne traduit pas la diversité cellulaire peut se révéler insuffisante. Il devient alors nécessaire d'effectuer des mesures sur cellules uniques, qui reflètent mieux la variabilité et la diversité intrinsèques au vivant. Séparer des populations distinctes de cellules sur la base de caractéristiques différentes ou encore détecter des cellules rares est parfois nécessaire comme pour la détection précoce ou la récurrence de certaines maladies. Les méthodes d'analyse doivent s'adapter aux échelles de la cellule et aux exigences (objets vivants, fragilité par exemple) et peuvent être effectués sur la base des propriétés présentées précédemment.

La manipulation – sélection, déplacement, piégeage – à l'échelle cellulaire ou moléculaire a de nombreux domaines d'application : la biologie (tri cellulaire) ; le médical (diagnostic de maladies, test de médicaments), le génie des procédés (microréacteurs) et la chimie analytique (laboratoire sur puces). Les domaines cités sont des exemples dont la valeur ajoutée économique est très importante mais ne sont pas exhaustifs. La manipulation sans contact – qui permet de travailler en environnement clos et stérile – repose sur l'utilisation de forces agissant à distance impliquant des champs électrique ou magnétique, des faisceaux laser voire des ondes acoustiques. Ces manipulations ont pour but d'immobiliser, étudier, transporter, trier des particules et sont souvent associées à des microsystèmes fluidiques. Une bonne synthèse sur la manipulation et la séparation de cellules peut être trouvée dans les articles [46, 47].

Dans cette partie, les principes physiques et les méthodes de mesure des propriétés physiques de cellules seront explicités et illustrés par des exemples.

1. Mesure des propriétés magnétiques

1.1. Magnétophorèse

Le terme de « magnétophorèse » est utilisé pour décrire le déplacement induit par l'interaction entre des particules magnétiques et un champ magnétique non-uniforme [48]. Ce phénomène utilise les propriétés magnétiques intrinsèques des cellules et des applications de migration cellulaire basée sur ce principe ont vu le jour [49, 50].

La force s'exerçant sur une particule de susceptibilité magnétique χ_p , de volume V_p immergée dans un milieu de susceptibilité χ_m et soumise à un champ d'induction magnétique B s'exprime comme suit :

$$\vec{F} = \vec{F}_p - \vec{F}_m = \frac{\Delta\chi}{2\mu_0} V_p \vec{\nabla} B^2 \quad \text{Équation I.3}$$

avec - $\mu_0 = 4\pi 10^{-7} \text{ H.m}^{-1}$ la perméabilité magnétique du vide,

- $\Delta\chi = \chi_p - \chi_m$: lorsque $\Delta\chi > 0$, la particule est dirigée dans le sens du gradient vers les maxima de l'induction magnétique (Figure I.14 cas a) et lorsque $\Delta\chi < 0$, la particule est dirigée vers les minima (Figure I.14 cas b). $\Delta\chi$ indique la direction de la force, *i.e.* une particule peut être repoussée ou attirée par le champ magnétique. Comme vu précédemment, pour la plupart des cellules biologiques, on a : $\chi_p < 0$ (Figure I.7),

- $\vec{\nabla} B^2$: la force est indépendante du signe du champ magnétique. Elle exploite le gradient de champ ; l'intérêt à des échelles microscopiques est qu'ils peuvent être intenses tout en utilisant de faibles champs magnétiques.

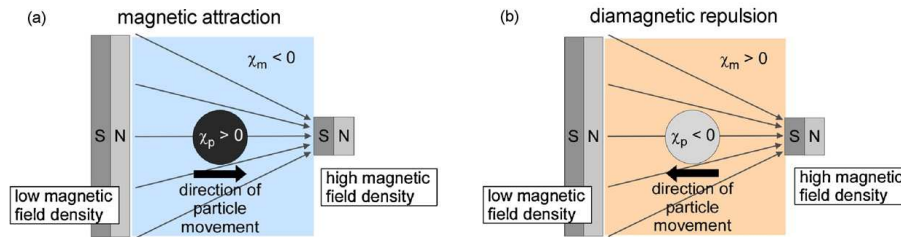


Figure I.14 : a) Attraction d'une particule magnétique suspendue dans un milieu diamagnétique b) Répulsion d'une particule diamagnétique suspendue dans un milieu paramagnétique [51]

On peut également recourir au greffage de nanoparticules magnétiques sur la surface des cellules pour augmenter χ_p et ainsi augmenter artificiellement la force qui s'applique sur des cellules à manipuler [52].

Le principe de magnétophorèse – exploitant les propriétés diamagnétiques – peut-être illustré par différentes expériences de lévitation :

- la lévitation d'une grenouille (Figure I.15) qui montre la possibilité de léviter un matériau faiblement susceptibles (comme le vivant et l'eau) de taille macroscopique. L'obtention d'une force magnétique suffisante requiert ici l'utilisation de champs magnétiques très importants,



Figure I.15 : Grenouille en lévitation au-dessus d'une bobine qui produit un champ magnétique de 16T [53]

- les travaux de recherche de l'équipe « μ systèmes » du laboratoire G2elab à Grenoble qui portent sur la micro-lévitation diamagnétique (Figure I.16). Les lois de réduction d'échelles sont alors favorables en permettant l'exploitation de forts gradients de champs magnétiques,

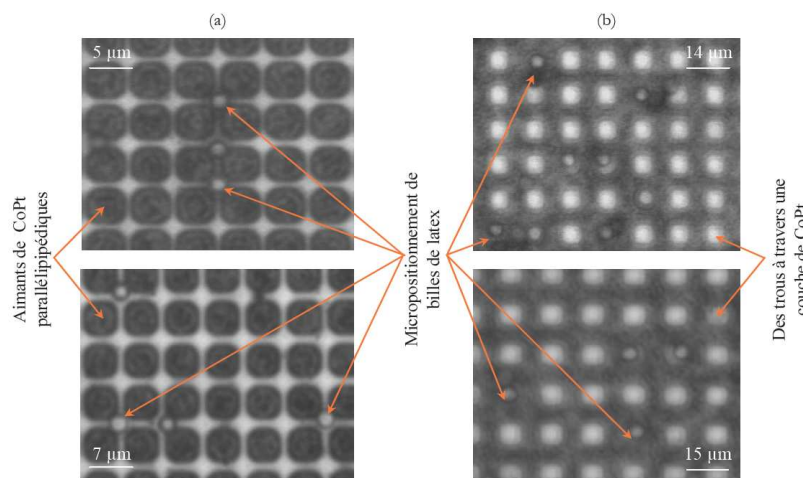


Figure I.16 : Micro positionnement en 2D et sans contact de billes de latex (a) avec des puces comportant des matrices de micro aimants parallélépipédiques (b) des puces comportant des trous à travers une couche de CoPt [54]

- le piégeage de levures par magnétophorèse négative réalisé au laboratoire en collaboration avec le G2elab (Figure I.17 (a) et la Figure I.17 (b) montre que les minima d'énergie sont situés au centre des puits entre 4 micro aimants.

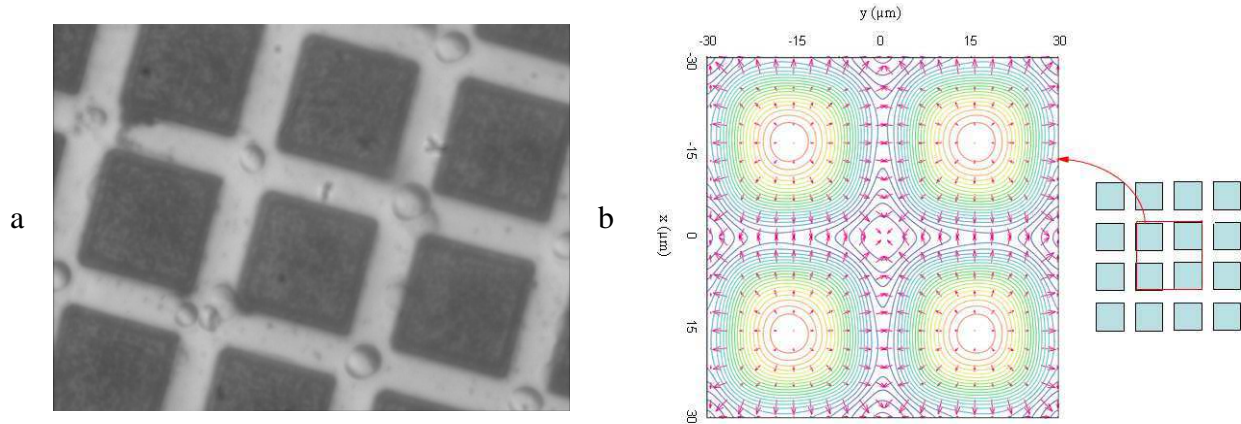


Figure I.17 : Micro positionnement sans contact de levures (a) matrice de micro aimants parallélépipédiques de CoPt (25 μm de côté et 10 μm de gap) (b) cartographie des isovalues de l'énergie magnétique [55]

1.2. Balances magnétiques et autres systèmes existants

➤ Mesure de la susceptibilité magnétique du milieu χ_m

Elle se fait à partir d'une balance magnétique basée sur les forces d'attraction ou de répulsion ou encore d'un magnétomètre à SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) basé sur l'utilisation d'aimants supraconducteurs.

Le principe de la balance magnétique repose sur la mesure d'une force. Une extrémité du tube contenant l'échantillon est soumise à l'action d'un champ d'induction B uniforme, l'autre se trouvant dans un champ B' négligeable par rapport au premier (Figure I.18). L'échantillon, suspendu à une balance, subit une force donnée par :

$$F = \frac{1}{2} \chi_v A H^2$$

Équation I.4

avec - χ_v : susceptibilité volumique de l'échantillon

- A : aire de la section de l'échantillon

- H : l'intensité du champ magnétique

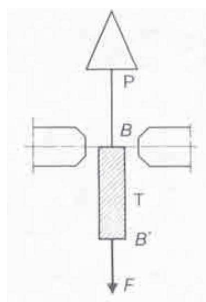


Figure I.18 : Principe de la balance de Gouy : le tube T, contenant l'échantillon, est suspendu à l'un plateau P d'une balance de précision [56]

Dans le cas de la balance de Gouy, la force mesurée est celle exercée par les aimants dont la position est maintenue constante sur l'échantillon qui est suspendu; celle d'Evans (Figure I.19) mesure la force opposée : celle que l'échantillon dont la position est maintenue constante exerce sur les aimants qui sont ici suspendus.

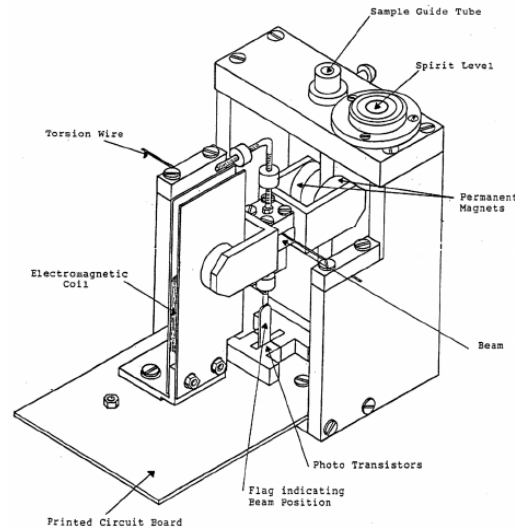


Figure I.19 : Balance d'Evans : mesure de susceptibilité magnétique volumique [57]

A travers la mesure de la force nécessaire pour conserver l'équilibre du système, la balance déduit la valeur de susceptibilité moyenne de l'échantillon introduit.

Le magnétomètre à SQUID est un dispositif fondé sur la supraconductivité, propriété que certains matériaux possèdent de conduire le courant électrique sans résistance en dessous d'une certaine température critique. Le magnétomètre est composé d'un cryostat pour refroidir l'échantillon, d'une bobine de détection pour capturer le flux magnétique de l'échantillon, d'un SQUID qui détecte le signal de la bobine et d'un système de spires pour appliquer un champ magnétique à l'échantillon (Figure I.20).

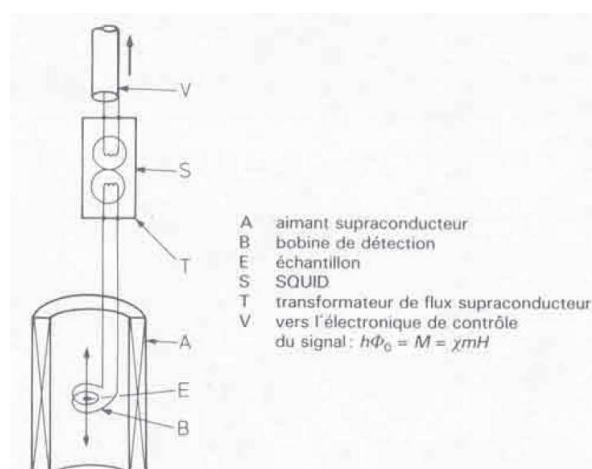


Figure I.20 : Principe d'un magnétomètre à SQUID [56]

Ce dispositif ne détecte pas directement une variation du champ magnétique générée par le déplacement vertical de l'échantillon mais plutôt le courant induit dans une série de spires de détection traversées par l'échantillon. Le flux magnétique ainsi généré est transmis au détecteur auquel cette bobine est couplée de façon inductive. La seconde bobine fait partie d'un circuit oscillant alimenté à sa fréquence de résonance. Une variation d'inductance conduit au changement de la mutuelle et aux bornes de ce circuit, la tension – proportionnelle à la variation du flux dans le bobinage de mesure et donc à l'aimantation de l'échantillon – est mesurée. Le principe est donc de transformer en signal électrique la variation de flux induite par le déplacement de l'échantillon le long de l'axe d'une bobine. Par ailleurs, il est nécessaire de l'isoler des variations des champs extérieurs, qu'elles proviennent du champ produit par l'aimant supraconducteur ou du champ ambiant.

➤ Mesure de la susceptibilité magnétique des particules χ_p

Elle peut se faire à partir de la mesure de la vitesse de translation des particules soumises à la force magnétique. Häfeli *et al.* ont développé une technique de mesure de susceptibilité basée sur l'utilisation du dispositif décrit Figure I.21 combinant microfluidique et exploitation de la force magnétique. Pour une particule migrant dans un fluide, la force de traînée visqueuse qui s'oppose à leur déplacement est :

$$F_{Stokes} = 3\pi v_p D_p \eta \quad \text{Équation I.5}$$

avec - v_p la vitesse de la particule

- D_p le diamètre de la particule

- η la viscosité du milieu

De la force magnétique exercée sur la particule et de la force de Stokes, il est possible de déduire l'expression de la vitesse de déplacement de la particule, dont χ_p est déduite:

$$v_p = \frac{\Delta\chi D_p^2}{18\eta} \frac{|\vec{\nabla} B^2|}{2\mu_0} \quad \text{Équation I.6}$$

Le dispositif proposé par Häfeli repose sur l'utilisation d'un aimant produisant un gradient de champ magnétique constant dans la largeur du canal et unidimensionnel [58]. La vitesse de déplacement, constante, des particules dans le liquide sous l'effet de la force magnétique est acquise par traitement d'images automatisé. Ce système a été validé sur des particules magnétiques (de 0,5 à 3,5 μm) dans des milieux aqueux de viscosité différente (ajustée par ajout de sucrose) en comparant les informations acquises avec celles obtenues en utilisant des particules calibrées.

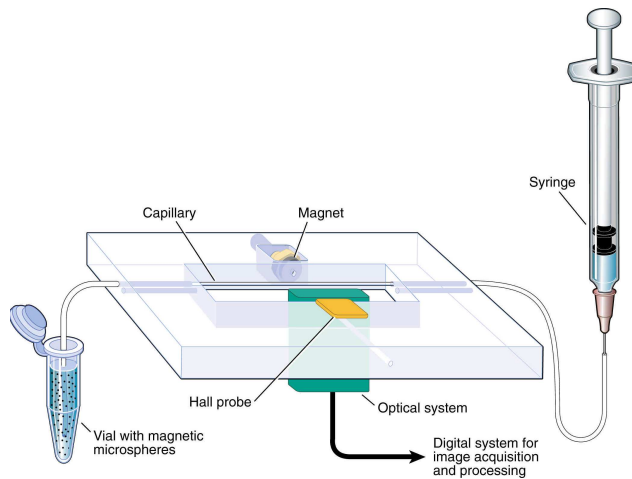


Figure I.21 : Schéma du dispositif de mesure magnétique sur des microsphères

Les équipes des chercheurs Chalmers et Moore ont mis au point un dispositif magnétique basé sur l'emploi d'une paire d'aimants en Néodyme Fer Bore [59]. Il génère également un gradient de champ constant dans une zone où le déplacement de cellules est observé (Figure I.22). Il permet aussi la séparation magnétique en fractionnant un flux de cellules sanguines marquées ou non magnétiquement (marquage immunomagnétique) en plusieurs flux de sortie. Des particules en polystyrène fonctionnalisées en surface par une couche de Fe_3O_4 sont étudiées.

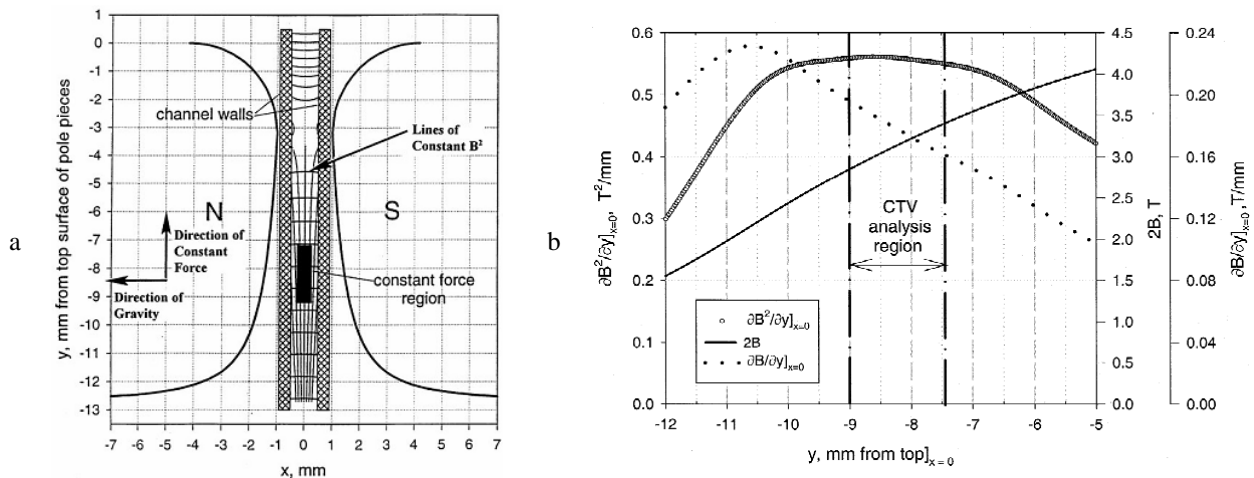


Figure I.22 : Dispositif générant un champ magnétique constant (a) section axiale à travers le canal fluide et l'aimant (b) tracé des lignes de symétrie de la densité d'énergie magnétique [60]

A ce jour, à notre connaissance, cette technique n'a pas été appliquée à des cellules non marquées magnétiquement, en raison de l'obtention de forces magnétiques insuffisantes avec les aimants utilisés. Cependant, il serait intéressant d'étudier la possibilité de reprendre le principe en utilisant des micro-aimants permettant d'obtenir de forts gradients de champ magnétique, afin d'augmenter l'intensité des forces produites.

2. Mesure des propriétés mécaniques

2.1. Exploitation de la force optique

L'utilisation des techniques de manipulation optique permet, par résolution de problèmes inverses de type identification paramétrique, de caractériser la cellule. La 1^{ère} démonstration expérimentale du piégeage optique remonte à 1970 et est attribuée à Ashkin [61] qui a montré l'attraction de particules réfringentes vers les régions d'intensité maximale quand elles étaient illuminées par un faisceau laser focalisé. De petites particules diélectriques de taille micrométrique sont ainsi piégées près du point focal d'un faisceau laser étroitement focalisé.

La lumière est constituée de photons d'énergie $h\nu$ et d'une quantité de mouvement $p = h\nu/c$ avec $h = 6,626.10^{-34} J.s$ la constante de Planck, ν la fréquence et c la célérité des photons. Ainsi, quand un photon est réfléchi à l'interface entre un milieu et une particule, il subit une variation de quantité de mouvement qui engendre une force sur la surface réfléchissante $F = dp/dt = nI/c$ avec n l'indice de réfraction du milieu dans lequel le photon se propage et I l'intensité du rayon lumineux.

Dans le cas de particules diélectriques, les forces appliquées sur la sphère peuvent se diviser en deux parties [62] :

- un terme « radiatif » F_r lié à la réfraction – les photons sont déviés et répartis symétriquement par rapport au centre de la particule (Figure I.23 cas a) et l'absorption des photons (Figure I.23 cas b) d'un faisceau lumineux est uniformément répartie. La force résultante est orientée selon la direction de propagation de la lumière,
- un terme « gradient » F_g lié à l'interaction d'un objet avec un faisceau lumineux non uniforme. Si une particule est peu réfléchissante (Figure I.23 cas c), elle est dirigée vers le maximum d'intensité lumineuse ; si elle est très réfléchissante, elle peut être expulsée vers les zones d'intensité minimale (Figure I.23 cas d). L'expression de la force optique de « gradient » a les mêmes effets que la force de diélectrophorèse qui sera développée plus loin:

$$\overrightarrow{F}_{grad} = 2\pi R^3 \varepsilon_{mopt} K_{opt} \vec{\nabla} E^2 \quad \text{Équation I.7}$$

$$\text{avec } \varepsilon_{mopt} = n^2 \varepsilon_0 \text{ et } K_{opt} = \frac{n_p^2 - n_m^2}{n_p^2 + 2n_m^2}.$$

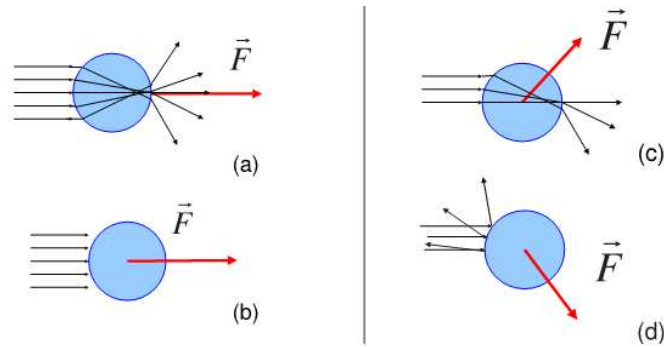


Figure I.23 : Illustration de la composante « radiative » (à gauche) et « gradient » (à droite) de la force optique [62]

Sous l'action de la force optique, une particule diélectrique exposée à un faisceau laser focalisé est attirée vers l'axe du laser et propulsée dans la direction de propagation. Les pinces optiques permettent de positionner les objets avec précision dans l'espace : la force appliquée est mesurée en évaluant le décalage de leur position par rapport au centre du piège optique. Les pinces optiques sont capables de manipuler des particules de taille micrométrique et de leur appliquer des forces contrôlées ; en pratique, les puissances laser utilisées sont comprises entre 10 mW et 1W, correspondant à une force de 0,5-500 pN au plan focal. A titre de comparaison, le poids d'une cellule (diamètre : 1 μm) est environ égal à 50 pN [63, 64].

Dans l'air, les particules sont accélérées tandis que dans un liquide, leur mouvement est amorti par la force de traînée visqueuse. Quelques exemples sont présentés Figure I.24.

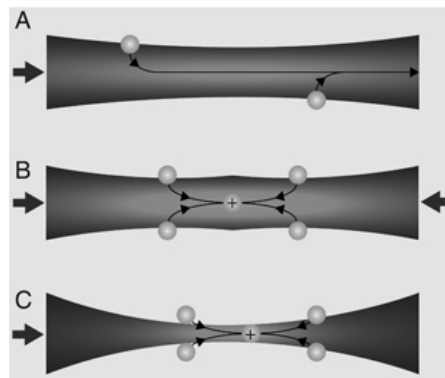


Figure I.24 : Manipulation de particules d'indice de réfraction plus grand que celui du milieu (A) un rayon attire les particules sur l'axe via la force de gradient et les propulse le long de sa direction de propagation via la force de radiation (B) deux rayons avec des foyers légèrement décalés compensent leurs forces de radiation ; par conséquent, les particules sont confinées sur l'axe optique entre les deux plans focaux (C) un rayon fortement concentré forme la base d'un piège; les particules sont donc confinées par les forces de gradient [65]

La manipulation optique dépend donc de plusieurs paramètres :

- la différence d'indice entre l'objet et le milieu environnant qui augmente le processus de réfraction (une cellule vivante : $\sim 1,35$ et le milieu physiologique : 1,3 ; différence faible),
- l'intensité du laser : le faisceau lumineux doit traverser la particule sans l'endommager c'est-à-dire que l'élévation locale de température doit être maîtrisée,
- la focalisation du laser [66].

Les pinces optiques ont été utilisées pour imposer des forces à l'échelle de cellules entières. Afin de mieux comprendre le transport des fibroblastes et leurs interactions dans le tissu conjonctif, des expériences ont été réalisées : des fibroblastes manipulés individuellement par pinces optiques sont autorisés à former de brefs contacts avec une surface de verre recouverte de fibronectine dans le but d'étudier les propriétés physico-chimique de cette liaison [67]. D'autres études sur des globules rouges ou des cellules nucléées ont permis de caractériser les propriétés viscoélastiques associées à la déformation cellulaire : extension engendrée entre 2 fibres optiques se faisant face [68, 69]. La mesure du déplacement par étirement d'une cellule par pinces optiques permet de caractériser son élasticité. Basée sur une simulation par éléments finis de la déformation d'une cellule adhérente, des fonctions de correction (prenant par exemple en compte l'influence de l'angle d'imprégnation) permettent de remonter au module d'Young intrinsèque à partir du module d'élasticité apparent déterminé expérimentalement [70]. Des bactéries individuelles peuvent être maintenues dans un piège optique pour étudier leur adaptation durant des changements en concentration du nutriment du milieu de culture [71].

2.2. Autres techniques

Les pinces optiques, très utilisées pour la caractérisation mécanique d'une cellule, ne sont pas la seule voie ; il existe d'autres techniques comme les méthodes magnétiques, les micropipettes ou encore l'utilisation de microplaques (les méthodes citées ici sont les plus couramment utilisées et ne sont donc pas exhaustives).

Les pinces magnétiques ont été utilisées pour la première fois par Crick et Hughes en 1950 [72]. La technique consistait à faire détruire (par phagocytose) des objets : des cellules (ici des fibroblastes) contenant des billes magnétiques sont cultivées dans le but d'étudier les déformations membranaires grâce à des micromanipulations des billes. Depuis longtemps, les biologistes savent traiter les surfaces des billes avec des protéines ou des anticorps multiples. Une fois les billes magnétiques attachées à la cellule d'intérêt, il est possible d'appliquer une force et de la moduler en réglant la distance entre les aimants. La force est constante (de l'ordre de 20 pN) : le gradient de champ varie sur une échelle de distance du millimètre (taille de l'entrefer) ; à l'échelle de la cellule, ce gradient est constant. Il est possible de déterminer la force à travers les déplacements horizontaux par la mesure des fluctuations Browniennes de la bille ; le comportement élastique de la molécule d'ADN est ainsi étudié [73, 74].

La magnétocytométrie par rotation permet d'exercer une contrainte mécanique spécifique sur le cytosquelette de cellules en culture en fixant des microbilles ferromagnétiques sur leur membrane (Figure I.25) [7]. Un champ magnétique variable est appliqué dans la direction verticale, il produit un couple sur la bille magnétisée dans la direction horizontale par

l'intermédiaire d'un moment magnétique initial à 45°. Fabry *et al.* ont mis en évidence, en régime dynamique, une relation non linéaire entre le module d'élasticité apparent et le moment appliqué à la bille [75]. Laurent *et al.* étudie les propriétés mécaniques des cellules épithéliales alvéolaires dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë par cette méthode [76].

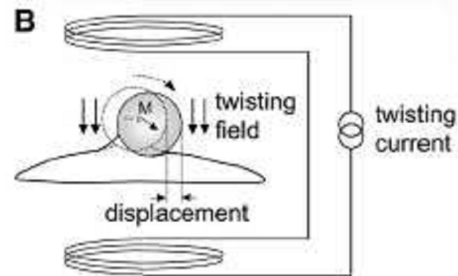


Figure I.25 : Schéma descriptif simplifié de l'expérience de magnétocytométrie [76]

Pour identifier les paramètres rhéologiques dans le cas de cellules peu déformables comme les cellules endothéliales, il est utile de caractériser l'aspiration des cellules à l'intérieur d'une micropipette (Figure I.26) comme le montre les travaux de Boudou *et al.*

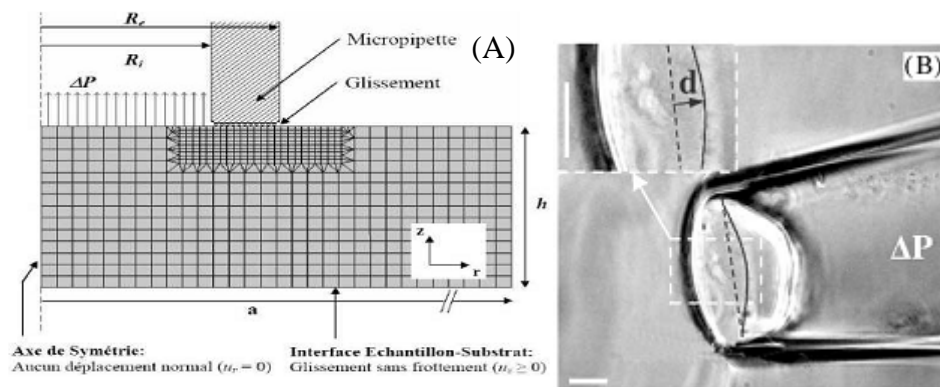


Figure I.26 : (a) Aspiration de l'échantillon (b) Modèle aux éléments finis, l'aspiration est représentée par une pression ΔP appliquée à l'intérieur d'une région circulaire délimitée par le rayon interne de la micropipette [77]

Par ailleurs, il est possible de fixer une cellule entre 2 microplaques (Figure I.27) et ainsi de faire des essais d'étirement afin d'en déduire par la suite le module d'Young de la cellule.

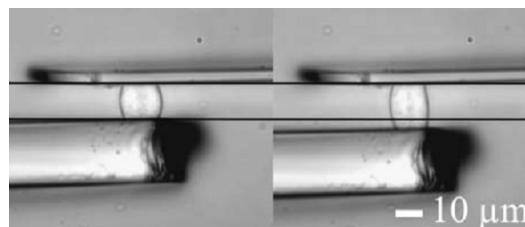


Figure I.27 : Etirement d'une cellule par des microplaques de verre, la plaque supérieure est fine et flexible tandis que la plaque inférieure est rigide [78]

3. Mesure des propriétés électriques

Pour un champ électrique donné, la réponse (par exemple la mise en mouvement) d'une cellule dépend de ses caractéristiques électriques et géométriques. Plusieurs méthodes permettent de mesurer la bio impédance de tissus cellulaires ou de cellules isolées sans requérir de modification chimique de l'échantillon et permettent donc une investigation des cellules dans un tampon usuel [79, 80]. Il est possible de mesurer les propriétés intrinsèques des cellules sur suspension cellulaire ou sur cellules isolées.

3.1. Analyse globale sur suspension cellulaire

3.1.1. Impédancemétrie

L'impédancemétrie est une méthode de mesure directe des propriétés électriques de corps biologiques en solution par la caractérisation courant/tension (en amplitude et en phase) de celui-ci. Conventionnellement, une faible tension alternative est utilisée pour le signal d'excitation et la réponse en courant est mesurée. Les microsystèmes utilisant ce procédé sont usuellement constitués d'électrodes permettant à une suspension cellulaire de circuler entre celles-ci (Figure I.28) ; les cellules sont placées en contact avec des électrodes d'excitation et de détection. L'intérêt du canal microfluidique est donc de contrôler le déplacement des cellules afin de les placer à un endroit optimal par rapport aux électrodes

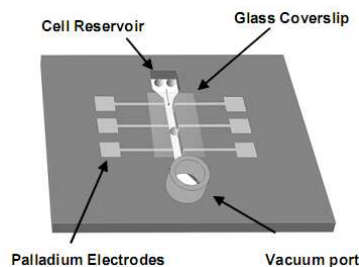


Figure I.28 : Schéma d'un dispositif de spectroscopie électrique d'impédance. L'ouverture permet de faire entrer les cellules dans le canal rempli de liquide et de les amener au milieu des électrodes [81]

Les réponses en phase et en amplitude des cellules ainsi excitées sont enregistrées (Figure I.29) ; la capacitance – proportionnelle à la permittivité – et la conductance – proportionnelle à la conductivité – sont mesurées en fonction de la fréquence d'excitation. La mesure de l'impédance complexe d'une suspension de particules peut donc être utilisée pour obtenir les propriétés électriques moyennes des particules [82-84].

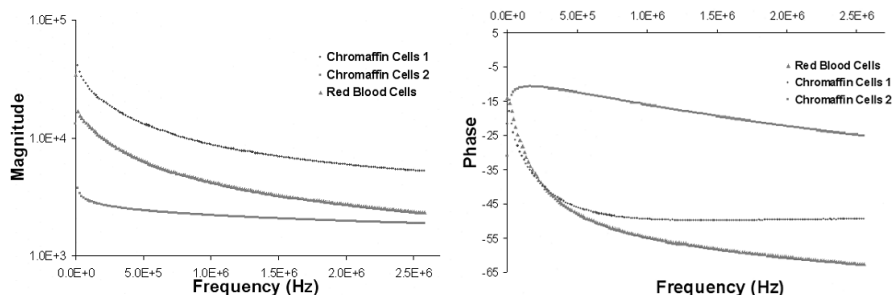


Figure I.29 : Spectres d'impédance électrique en amplitude et en phase pour différentes populations de cellules [85]

Pour exemple, des chercheurs ont montré l'influence de la fermentation de cellules sur l'évolution de la permittivité pour une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 20 MHz [86]. Ces diverses techniques de mesures des propriétés diélectriques incluant une partie microfluidique – ont des applications phares comme la mesure des taux de biomasse (rendement de la croissance par rapport à un substrat aliment) pour la culture des levures mais aussi le suivi de la fermentation de bactéries, de levures et autres [87].

3.1.2. Diélectrophorèse

Une méthode basée sur le principe de la diélectrophorèse (*cf.* Chapitre I. III.1.2.) permet la mesure des propriétés des cellules via leur taux de collecte sur une électrode selon un protocole de dilution établi [88, 89]. En effet, il a été montré que le nombre de cellules collectées en fonction de la fréquence du champ électrique était un indicateur [90] ; par exemple, le spectre (Figure I.30) montre, sur une population, le nombre de cellules collectées atteintes de leucémie myéloïde traitées (K652AR) ou non (K652).

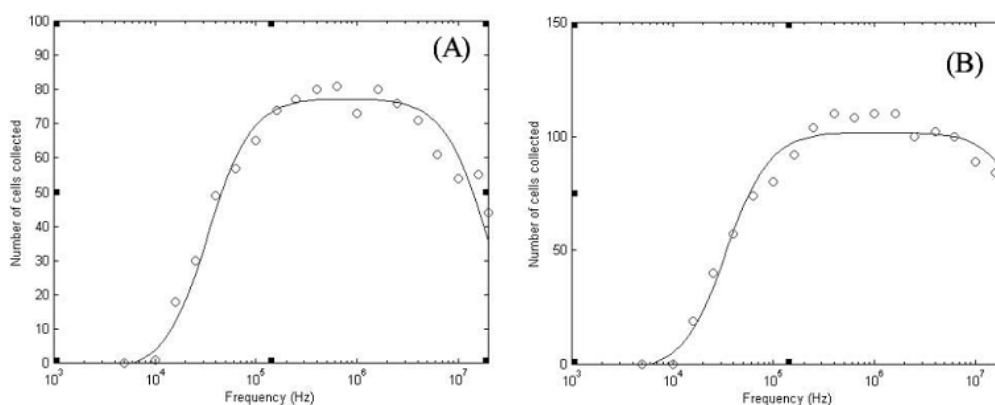


Figure I.30 : Spectre de taux de collecte de cellules K652 et K652AR [91]

Des méthodes optiques ont été mises au point afin de mesurer le taux de collecte des cellules via l'absorbance ou une technique d'illumination évanescente [92, 93]. En augmentant la fréquence du champ appliqué à des électrodes de forme hyperbolique (Figure I.31), les cellules sont attirées vers les maxima de champ par diélectrophorèse positive (sur les 6 premières images) puis en sont progressivement éloignées sous l'effet de la diélectrophorèse négative.

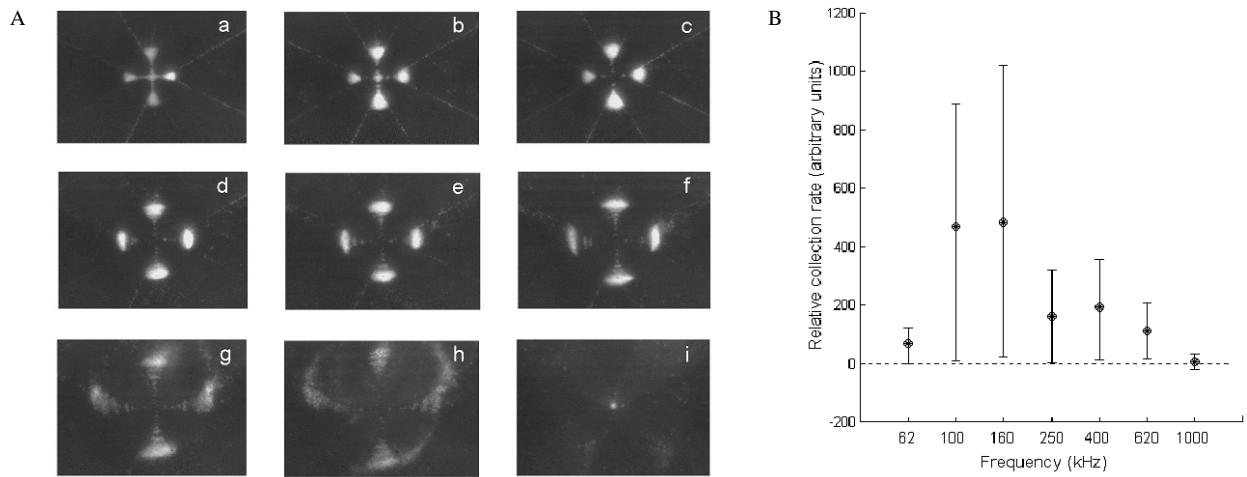


Figure I.31 : (A) Séquences d'images montrant le comportement de particules de latex à différentes fréquences (de 1MHz pour la 1^{ère} photographie à 2MHz pour la dernière avec un pas de 125 kHz) (B) Tracé du taux de collecte en fonction de la fréquence, les barres indiquent l'écart-type mesuré pendant les dix 1^{ères} secondes [94]

Suehiro *et al.* ont proposé une technique basée sur le phénomène de diélectrophorèse positive (essais à 100 kHz) pour capturer des particules en solution sur un microsystème à électrodes interdigitées. En mesurant la variation temporelle de l'impédance électrique, il est possible d'évaluer quantitativement la concentration cellulaire en milieu aqueux en accord avec un modèle mathématique [95].

Il résulte de la méthode d'impédancemétrie une mesure quantitative qui permet donc l'étude de biofilms, d'agrégat et de populations cellulaires. Nous nous intéressons à la mesure sur cellules isolées qui, par ailleurs, permet une mesure qualitative des propriétés diélectriques des cellules.

3.2. Spectroscopie diélectrique sur cellules isolées

Gawad *et al.* proposent un outil basé sur le principe du compteur de particules Coulter permettant la mesure du spectre d'impédance pour des cellules individuelles dans une gamme de fréquence comprise entre 100 kHz et 15 MHz [33, 96]. L'impédance du réseau d'électrodes change quand une cellule passe à travers et la tension à ses bornes est mesurée (Figure I.32) ; le flux est utilisé pour guider la cellule dans le canal. La différence entre la tension de référence (milieu d'immersion seul) et celle due à la présence de la cellule dans ce milieu permet d'en déduire ses propriétés électriques ainsi que sa vitesse de déplacement en vue d'utiliser ce dispositif pour le tri cellulaire. La réponse de la cellule à ce signal dépend de la fréquence appliquée. Une méthode de traitement de signaux numériques a été mise au point pour extraire le bruit des signaux recueillis d'après les mesures d'impédances [97]. Cette méthode a été étendue à la mesure sur des biomolécules par Sohn *et al.* [98].

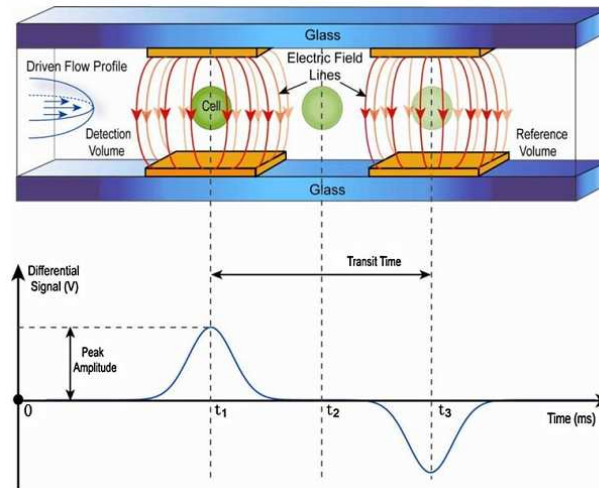


Figure I.32 : Particule passant deux électrodes dans un micro canal et signal d'impédance de la cellule

De nouvelles investigations ont cours dans le domaine du térahertz, on peut citer les travaux de l'IEMN (*Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie*) [99] portant sur l'élaboration de différentes micro sondes impédimétriques dédiées à la caractérisation de cellules biologiques par spectroscope diélectrique dans un environnement microfluidique (Figure I.33). Les méthodes de spectroscopie térahertz s'appuient sur la génération d'impulsions ultracourtes (quelques centaines de femtosecondes). Les modifications d'impédance électriques observées dans le domaine des hyperfréquences traduisent une modification de la structure macromoléculaire de telle ou telle partie de la cellule, survenant par exemple lors de l'interaction d'un ligand avec son récepteur, et viennent ainsi compléter d'autres mesures effectuées dans la gamme du MHz, traduisant une modification globale des propriétés diélectriques de la membrane.

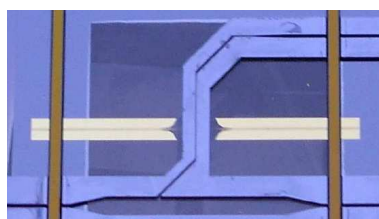


Figure I.33 : Prototype de microcapteur combinant une partie microfluidique et une partie hyperfréquence [100]

Il est possible d'obtenir une lévitation des particules par diélectrophorèse négative (*cf.* partie III.1.2) au-dessus d'un réseau d'électrodes, en raison de la diminution du champ avec la distance au plan des électrodes [101-103]. Lorsque le poids apparent (tenant compte de la poussée d'Archimède) et la force de diélectrophorèse se compensent, les particules atteignent un point d'équilibre stable. La hauteur de lévitation dépend du champ électrique, des propriétés électriques et géométriques de la particule ainsi que des densités de celle-ci et du milieu ce qui permet d'envisager un tri sur un flux de particules [104].

Vykoukal *et al.* proposent un système dans lequel les particules sont amenées par microfluidique et les électrodes disposées tout au long du canal permettent le tri des particules suivant leur propriété [105] : des particules de propriétés électriques différentes évoluent à différentes altitudes dans le canal (Figure I.34) et se déplacent à différentes vitesses compte-tenu du profil de vitesse parabolique de type Poiseuille.

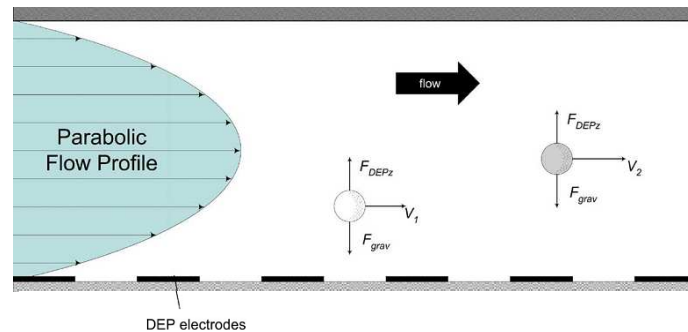


Figure I.34 : Schéma de principe de la séparation flux-force [106]

Lorsqu'une cellule est soumise à la force de diélectrophorèse, elle se déplace. Par la mesure de la vitesse de déplacement, il est possible d'obtenir les propriétés électriques d'une cellule en balayant une large gamme de fréquences [107]. Basée sur la mesure de la vitesse de rotation, l'électrorotation permet aussi la mesure des propriétés électriques d'une cellule et de ses différents compartiments. L'électrorotation, contrairement aux techniques présentées ci-dessus, n'implique pas de gérer une partie microfluidique. Dans la partie suivante, nous verrons que la manipulation de cellules par électrorotation (utilisation de générateurs délivrant des signaux en quadrature dans une grande gamme de fréquence) est rapidement exploitable qualitativement et quantitativement.

III. ELECTROROTATION

Les manipulations basées sur l'utilisation d'un champ électrique sont particulièrement adaptées à la miniaturisation car celle-ci permet la génération de forts champs électriques avec de faibles tensions. L'électrorotation – utilisée pour la caractérisation de cellules – se fonde sur le principe de polarisation des cellules biologiques sous l'effet d'un champ électrique. Par ailleurs, la caractérisation diélectrique se fait à partir de l'extraction des paramètres du spectre et implique l'utilisation d'un modèle analytique choisi. Des exemples non exhaustifs d'applications qui ont cours avec ce principe seront aussi présentés.

1. Principe

Pour comprendre l'intérêt d'appliquer des forces électriques à une échelle micrométrique, il convient de regarder l'évolution des forces avec la taille. Si on considère une longueur caractéristique L de l'objet considéré, il est possible d'exprimer les différentes forces comme des lois de puissance de cette grandeur (Tableau I.3) :

Grandeur physique	Loi d'échelle
Force de Van der Waals inter-moléculaire	L^{-7}
Force capillaire	L^1
Vitesse d'écoulement	L^1
Puissance thermique transférée par conduction	L^1
Force électrostatique	L^2
Temps de diffusion	L^2
Force de gravité	L^3
Force magnétique entre aimants	L^2
Force magnétique entre courant à densité de courant constante	L^3

Tableau I.3 : Lois d'échelles pour différentes grandeurs physiques [108]

Il apparaît que les forces électrostatiques, inexploitable en conversion électromécanique à l'échelle macroscopique, sont largement utilisées dans les microsystèmes. En effet, alors que les forces électromagnétiques dominantes dans les applications macroscopiques peuvent être vues comme une interaction entre un champ magnétique et un courant volumique, les forces électrostatiques résultent d'une interaction entre des charges surfaciques et un champ électrique. La réduction d'échelles permet en outre d'obtenir des champs électriques élevés (plusieurs kV.m^{-1}) avec des tensions d'alimentation de quelques volts seulement, ce qui accroît la prépondérance et l'intérêt de ces forces ; en effet, pour $L = 1\text{cm}$ ou $L = 100\mu\text{m}$, on peut réduire la tension par 1000 et obtenir la même force diélectrophorétique [109].

1.1. Notion de polarisation

Une cellule est une particule électriquement neutre mais polarisable. Sous l'effet d'un champ électrique non uniforme, une réorganisation interne des charges la polarise et lui confère les propriétés d'un dipôle. Il a été mis en évidence des phénomènes appelés dispersions [87, 110] qui correspondent à la dépendance fréquentielle de la permittivité complexe :

- jusqu'à 10^4 Hz (dispersion α) : la structure de la membrane cellulaire joue un rôle de condensateur et les charges de surface induisent des valeurs importantes de permittivités et conductivités,
- jusqu'à 10^8 Hz (dispersion β) : la polarisation interfaciale des membranes induit une diminution de la capacité membranaire ce qui se traduit par la circulation d'un courant dans le milieu intracellulaire. La conductivité augmente et devient représentative du

milieu extra et intracellulaire tandis que la permittivité apparente diminue fortement (Figure I.12). Ce comportement s'explique principalement par l'effet Maxwell-Wagner,

- après 10^8 Hz (dispersions δ et γ) : elles sont essentiellement dues à la polarisation des molécules dipolaires. La membrane est alors court-circuitée d'un point de vue électrique et le milieu se comporte comme un électrolyte [111].

Le mécanisme de polarisation interfaciale confère à la cellule les propriétés d'un dipôle : les ions internes à la cellule se déplacent vers l'électrode de polarité opposée et sont stoppés par la membrane plasmique qui présente une résistivité électrique très supérieure à celle du cytoplasme [112]. Le même processus se produit au niveau du milieu, ce qui conduit à l'accumulation de charges au niveau de l'interface cellule/milieu.

Dans le cas d'un champ uniforme, les forces de Coulomb qui s'exercent sur les charges opposées du dipôle se compensent : la polarisation ne produit donc aucune force électrique nette capable de déplacer la cellule. Dans le cas contraire, les forces ne se compensent pas ce qui engendre un déplacement de la particule polarisée. La non uniformité du champ électrique est donc une condition nécessaire à la manipulation de cellules. Deux types de méthodes peuvent induire une polarisation et permettre le déplacement d'une cellule :

- l'application d'un champ non uniforme en amplitude associée au terme de diélectrophorèse conventionnelle,
- l'application d'un champ non uniforme en phase tel qu'un champ tournant induisant le phénomène d'électrorotation ou glissant induisant le phénomène de diélectrophorèse dite à ondes progressives [113].

1.2. Diélectrophorèse

La diélectrophorèse utilise les propriétés de polarisabilité des particules et consiste à leur appliquer un champ électrique non uniforme en amplitude pour les déplacer. Depuis la preuve de faisabilité de son utilisation sur des objets de faibles tailles à la fin des années 1970 par Pohl [88], elle est devenue un principe de plus en plus utilisé dans les applications microfluidiques pour déplacer, trier, différencier et obtenir des informations sur les particules ciblées, notamment les cellules biologiques. Placée dans un champ électrique, la cellule présente un moment dipolaire \vec{m} ; la force résultante a donc pour expression :

$$\vec{F} = (\vec{m} \cdot \nabla) \vec{E} \quad \text{Équation I.8}$$

La plupart des cellules sont assimilables à des objets sphériques diélectriques présentant des pertes. L'expression du moment dipolaire – développé à partir de [114] – conduit à :

$$\vec{m} = 4\pi\epsilon_m K(\omega) r^3 \vec{E} \quad \text{Équation I.9}$$

d'où l'expression du facteur de Clausius-Mossotti :

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad \text{Équation I.10}$$

avec ϵ_m , ϵ_p , σ_m et σ_p : permittivités et conductivités du milieu d'immersion et de la particule (N.B. : $\epsilon_x^* = \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{\omega}$ avec $\epsilon_x^* = \epsilon_0 \epsilon_{x,r}$ avec $\epsilon_{x,r}$ la permittivité dite relative)

- ω et E : respectivement pulsation et intensité efficace du champ électrique appliqué
- r le rayon de la cellule

Un gradient de champ électrique génère donc une force sur une particule et dans le cas où la non uniformité se restreint à une variation d'amplitude, on obtient :

$$\vec{F} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}[K(\omega)] \vec{\nabla}(E^2) \quad \text{Équation I.11}$$

Il est à noter que $[\vec{\nabla}(E^2)] = \frac{[V^2]}{[\text{distance}^3]}$ il est donc possible de générer une force à partir

d'une tension faible pour une petite distance. En effet, on voit bien que l'intérêt du microsystème réside dans sa faible distance inter-électrodes : le facteur d'échelle est ici favorable aux dimensions micrométriques.

Dans le cas où $\text{Re}[K(\omega)] > 0$, les cellules sont amenées vers les maxima de champ (diélectrophorèse positive) ; la particule est donc plus polarisable que son milieu de suspension. Dans le cas opposé (diélectrophorèse négative), les cellules sont amenées vers les minima de champ (Figure I.35). Pour une particule et un milieu donnés, le passage d'un régime à l'autre dépend, uniquement de la fréquence du champ électrique appliqué.

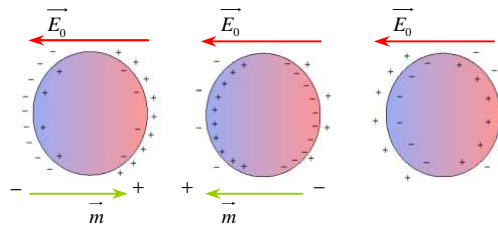


Figure I.35 : De gauche à droite : la particule est moins, plus et autant polarisable que le milieu environnant

De nombreuses structures d'électrodes peuvent être utilisées pour générer un champ électrique non uniforme, comme les électrodes rectangulaires interdigitées (Figure I.36). Une comparaison de différentes structures d'électrodes pour la diélectrophorèse a été proposée par M. Frénéa-Robin *et al.* : différentes possibilités sont offertes par l'intégration aisée de ce procédé.

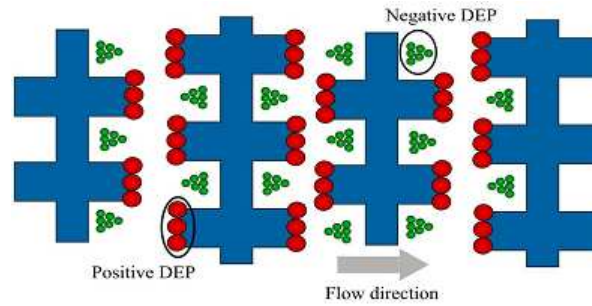


Figure I.36 : Electrodes rectangulaires interdigitées : en vert, des particules soumises à la diélectrophorèse négative, en rouge, des particules soumises à la diélectrophorèse positive [115]

La diélectrophorèse concerne autant la matière neutre (cellules biologiques) que chargée (particules fonctionnalisées). Des micro-dispositifs ont montré la faisabilité d'utiliser ce principe pour la séparation cellulaire, la fusion cellulaire ou le tri cellulaire. Des microsystèmes permettant de générer des forces intenses ont été mis au point [41, 116]; le pilotage en temps réel est tout à fait réalisable. Ces microsystèmes sont compatibles avec des solutions biologiques et sont parfaitement intégrables dans un microcircuit, la diélectrophorèse devient incontournable dans le monde des bio-microsystèmes.

1.3. Électrorotation

L'électrorotation consiste à induire un mouvement rotatif (Figure I.37) sur une particule exposée à un champ d'amplitude constante qui tourne (non uniforme en phase). Le principe a été mis en œuvre pour la 1^{ère} fois par Arnold et Zimmermann en 1988 [117]. Ils ont adopté un système d'électrodes dans lequel les tensions appliquées à deux électrodes adjacentes sont déphasées de 90 degrés.

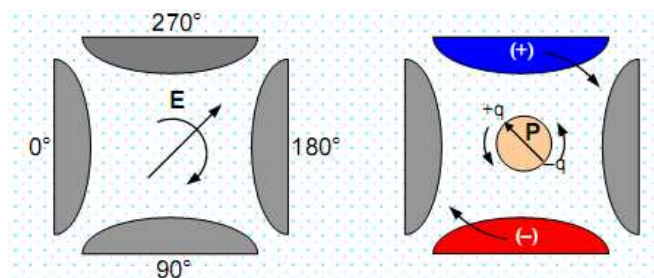


Figure I.37 : à gauche : un champ tournant est engendré entre quatre électrodes par application d'une tension sinusoïdale avec un déphasage de 90° ; à droite : selon l'angle de phase entre la polarisation induite et le champ électrique, le couple agit sur la particule qui se met en mouvement dans le sens identique ou inverse au champ

Le temps de relaxation dû au phénomène de polarisation est trop long pour permettre un synchronisme entre le dipôle induit au niveau de la particule et le champ tournant. Le déphasage résultant se traduit par l'existence d'un couple qui s'exerce sur la particule, l'amenant à tourner sur elle-même. L'angle formé entre le dipôle induit et le champ impose le sens de rotation de la cellule.

Une cellule supposée sphérique subit donc un couple [116] :

$$\vec{\Gamma} = -4\pi\epsilon_m r^3 \text{Im}[K(\omega)]E_0^2 \vec{k} \quad \text{Équation I.12}$$

avec - ω et E : fréquence angulaire et amplitude du champ électrique appliqué

- \vec{k} : vecteur orthogonal au plan contenant le champ tournant,
- pour les autres termes, se référer à l'équation I.9

Quand $\text{Im}[K(\omega)] > 0$ (l'angle du moment dipolaire induit par rapport au vecteur du champ est compris entre 0 et 180°), les cellules tournent dans le sens opposé à celui du champ. Dans le cas contraire ($\text{Im}[K(\omega)] < 0$), les cellules tournent dans le même sens que le champ. Pour exemple, une étude sur des cellules mammaires d'humain et de souris a montré la présence de ces deux comportements dans la gamme étudiée (0,5 kHz à 12 MHz) [118].

2. Signature diélectrophorétique

La cellule présente un comportement diélectrophorétique fonction de la fréquence. Ainsi, nous verrons l'intérêt de l'étude du spectre mais aussi des modèles cellulaires utilisés lors de la détermination des paramètres électriques des différents compartiments d'une cellule.

2.1. Notion de spectre

Le spectre diélectrophorétique d'une cellule (Figure I.38) permet de prévoir le comportement de celle-ci en présence d'un champ électrique inhomogène dans un milieu de propriétés électriques données de permittivité ϵ_m et de conductivité σ_m . Il représente l'évolution des parties réelle et imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti $K(\omega)$ en fonction de la fréquence dont l'intensité et le sens de la force qui s'exerce sur la cellule dépend.

L'allure du spectre reflète différents aspects de la structure et de la composition cellulaire. Le facteur de Clausius-Mossotti dépend de la permittivité complexe de la cellule qui dépend à son tour, comme vu précédemment, des propriétés géométriques et électriques de la cellule.

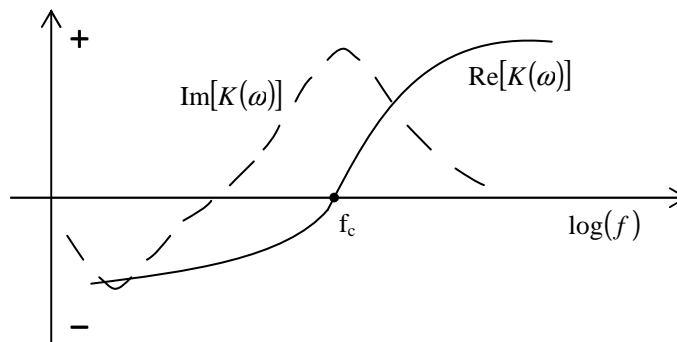


Figure I.38 : Evolution typique des parties réelle et imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence pour une cellule vivante dans un milieu aqueux peu conducteur.

Le facteur de Clausius-Mossotti dépend de ε_p^* qui varie en fonction du type de cellules. Ainsi, il existe bien une signature diélectrophorétique : chaque type de cellule est caractérisé par un spectre diélectrophorétique qui lui est propre. La fréquence caractéristique, pour laquelle la partie réelle de $K(\omega)$ s'annule, dépend donc aussi des propriétés de la cellule. Ainsi, elle peut par exemple constituer un moyen qualitatif de suivre l'évolution d'une infection de la cellule par un virus à travers sa mesure à intervalles de temps réguliers. Dans des milieux peu conducteurs, elle peut renseigner sur les caractéristiques membranaires d'une cellule [119]. En effet, il est possible de faire les approximations suivantes :

- pour des fréquences inférieures à quelques MHz $\frac{\sigma_i}{\omega} \gg \varepsilon_i$
- $\sigma_i \gg \sigma_{mem}$
- $R \gg d$

Compte tenu de ces approximations, on déduit :

$$\varepsilon_{mem} = \frac{\sigma_m d}{\sqrt{2\pi}(R-d)f_c} \quad \text{Équation I.13}$$

2.2. Modèles de cellules

Il est possible de relier le spectre d'une cellule aux valeurs de permittivité et de conductivité électrique de ses compartiments à travers le facteur de Clausius-Mossotti. Cette identification repose sur un modèle analytique de cellule sphérique à compartiments supposés homogènes et concentriques. Les différentes couches qui peuvent être prises en compte dans le modèle sont – pour les cas les plus usuels – la membrane, le cytoplasme, le noyau mais aussi la double couche électrique se formant à l'interface entre la particule et le liquide [120].

Lorsqu'un objet immergé dans un liquide présente une paroi chargée, les charges mobiles de la solution se réorganisent pour donner naissance à une double couche électrique (Figure I.39). Elle résulte de l'équilibre entre les forces de nature électrique et celles de nature thermique. Il s'agit d'un modèle décrivant la variation du potentiel électrique aux abords d'une surface. Les composés biologiques possèdent des groupements chimiques de surface perdant ou acquérant un ion dès qu'ils sont mis en solution à pH donné. C'est le cas, par exemple, des groupements carboxyles COOH susceptibles de perdre l'ion hydrogène, laissant exposer des terminaisons COO⁻ chargées négativement. De même, la membrane cellulaire peut présenter des terminaisons chimiques chargées [121] dont les effets sont négligeables à une échelle macroscopique mais ne

le sont plus à une échelle microscopique, en raison de la formation de la double couche à l'interface cellule/liquide.

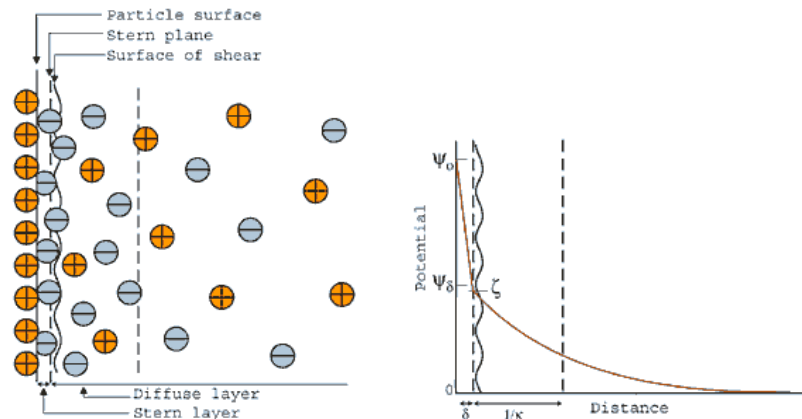


Figure I.39 : Modèle et distribution de charges à proximité de la paroi d'un diélectrique immergé dans un milieu conducteur

- Sphère homogène

Ce modèle s'applique en particulier aux billes en latex non fonctionnalisées, particules couramment utilisées pour des expériences préliminaires de caractérisation du système de manipulation. La bille est ainsi modélisée par une simple sphère de conductivité σ_p et de permittivité ϵ_p . Le facteur de Clausius-Mossotti est presque toujours négatif ce qui est dû à la relaxation de Maxwell-Wagner où la polarisation est dominée par la permittivité sur la conductivité. L'allure du spectre est exposée sur la Figure I.40 cas A.

- Sphère monocouche

La cellule modélisée par un modèle monocouche est le cas le plus couramment utilisé et fait référence à la structure Figure I.11. La permittivité complexe équivalente de la cellule (modélisée par le cytoplasme entouré de sa membrane) peut être exprimée sous la forme de l'équation I.1 [34]. Elle permet d'identifier les paramètres influençant de manière significative son comportement diélectrophorétique dans une gamme de fréquence donnée. L'allure du spectre apparaît sur la Figure I.40 cas B et correspond à la réponse diélectrique de globules rouges.

- Sphère à trois couches

Si le modèle précédent est souvent adopté pour décrire les cellules, un modèle à deux compartiments est parfois plus représentatif de la structure cellulaire [122]. On peut prendre l'exemple de cellules végétales dont une paroi entoure la membrane plasmique ou les cellules animales dont le noyau est important. Un modèle analytique a été développé par Irimajiri [123] considérant les différents compartiments de la cellule comme une succession de couches concentriques [124].

Dans le cas où l'on considère le cytoplasme (indice 0), la membrane plasmique (indice 1) et la paroi cellulaire (indice 2), la permittivité complexe de la sphère qui équivaut à ces deux couches peut être remplacée par :

$$\varepsilon_{1eff}^* = \varepsilon_1^* \frac{\left(\frac{R_1}{R_0}\right)^3 + 2\left(\frac{\varepsilon_0^* - \varepsilon_1^*}{\varepsilon_0^* + 2\varepsilon_1^*}\right)}{\left(\frac{R_1}{R_0}\right)^3 - \left(\frac{\varepsilon_0^* - \varepsilon_1^*}{\varepsilon_0^* + 2\varepsilon_1^*}\right)} \quad \text{Équation I.14}$$

avec R_i est le rayon de la couche indice i .

Ensuite, la permittivité complexe de la cellule peut être exprimée comme :

$$\varepsilon_p^* = \varepsilon_2^* \frac{\left(\frac{R_2}{R_1}\right)^3 + 2\left(\frac{\varepsilon_{1eff}^* - \varepsilon_2^*}{\varepsilon_{1eff}^* + 2\varepsilon_2^*}\right)}{\left(\frac{R_2}{R_1}\right)^3 - \left(\frac{\varepsilon_{1eff}^* - \varepsilon_2^*}{\varepsilon_{1eff}^* + 2\varepsilon_2^*}\right)} \quad \text{Équation I.15}$$

L'allure du spectre apparaît sur Figure I.40 cas C. La Figure I.40 montre que la fréquence du champ appliqué modifie significativement le comportement des cellules soumises au champ.

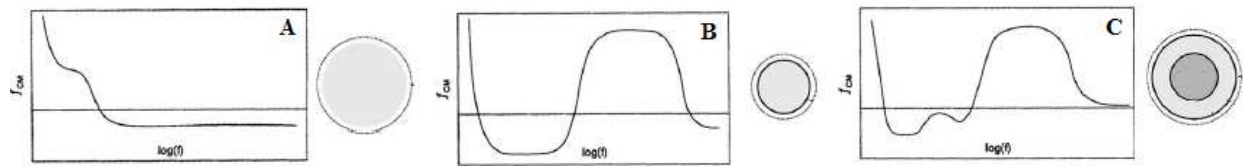


Figure I.40 : Différents types de réponse de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (A) sphère homogène (B) sphère monocouche (C) sphère à trois couches [41]

Bai et al. ont simulé les propriétés électriques de la bactérie *Escherichia coli* par un modèle sphéroïdal. Une 1^{ère} étude leur a permis de déterminer les propriétés du milieu interne par un modèle 2 couches. Une 2^{nde} étude portant sur un modèle à 4 compartiments imbriqués permet d'étudier la couche externe composée des membranes interne et externe séparées par un espace de 10 nm [125]. En particulier, ce modèle renseigne sur la permittivité de la membrane externe malgré une précision moins importante que le modèle à 2 compartiments.

Dans ce qui suit, nous considérons la méthode de détermination de spectre par électrorotation.

2.3. Méthodes de détermination

La structure et les propriétés des cellules biologiques peuvent être identifiées en observant le spectre électrorotation [41]. Celui-ci correspond au tracé de l'évolution de la vitesse

de rotation en fonction de la fréquence du champ tournant et est obtenu expérimentalement. En effet, le couple de traînée visqueuse exercé par le milieu s'exprime par :

$$F_{Stokes} = 8r^3\pi\eta R(\omega) \quad \text{Équation I.16}$$

avec η désigne la viscosité du milieu d'immersion.

Si on néglige l'action des forces d'inertie – on considère donc que la vitesse de la particule s'établit au bout d'un temps très court – ; le principe fondamental de la dynamique appliqué aux systèmes en rotation nous donne l'expression de la vitesse de rotation d'une particule [126] :

$$\Omega(\omega) = -\frac{\varepsilon_m \text{Im}[K(\omega)]E^2}{2\eta} \quad (\text{en rad.s}^{-1}) \quad \text{Équation I.17}$$

En posant $\xi = \frac{\varepsilon_m E^2}{2\eta}$, la vitesse de rotation obtenue est $\Omega(\omega) = -\xi \text{Im}[K(\omega)]$; elle est proportionnelle au facteur de Clausius-Mossotti. D'après les équations ci-dessus, il apparaît que le spectre (et donc la vitesse de rotation) est une fonction non linéaire des paramètres ε_i , σ_i , ε_{mem} , σ_{mem} et ξ . En procédant au relevé expérimental du spectre d'électrorotation, on est capable de déterminer les paramètres en adoptant une démarche itérative conduisant à l'obtention de valeurs permettant de faire coïncider les spectres pratique et théorique (Figure I.41).

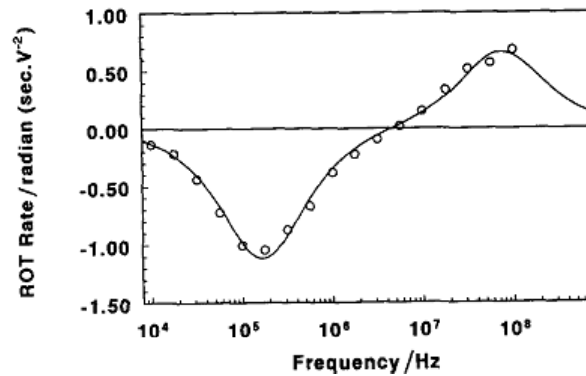


Figure I.41 : Spectre d'électrorotation expérimental (o) et théorique (–) d'une cellule DS19 modélisée par le modèle monocouche [126]

Les deux pics sur la Figure I.41 s'expliquent par le fait que la cellule est une structure hétérogène (Equation I.2). Le 1^{er} pic intervenant en basse fréquence correspond à la vitesse maximale de la cellule dans le sens opposé à celui du champ ; sa position et son amplitude sont majoritairement fonction des propriétés de la membrane. Le 2nd pic correspond à la vitesse maximale de la cellule dans le sens du champ et est principalement fonction des propriétés du cytoplasme [127]. En basse fréquence, la membrane agit comme un isolant s'opposant au

passage du champ étant donné sa faible conductivité par rapport à celle du cytoplasme. Pour des fréquences plus élevées, la membrane a un comportement de plus en plus capacitif et vient peu à peu court-circuiter sa résistance et permettre ainsi la pénétration du champ.

Des considérations théoriques et des résultats expérimentaux sur la dépendance de température ont montré que pour mesurer des propriétés diélectriques cellulaires, le spectre d'électrorotation ne dépendait pas fortement de la température lors des expérimentations [128]. Les cellules concernées par cette étude sont des levures, des globules rouges ainsi que des cellules de type végétal ; la gamme de température étudiée est de 25 à 35°C. Par contre, des cellules soumises à des traitements thermiques peuvent subir des dommages irréversibles.

3. Exemples d'application

De nombreuses études impliquant des manipulations par méthodes diélectrophorétiques sur des cellules existent à ce jour. Plus bas, des applications sont données à titre d'exemple et ne sont donc pas exhaustives.

3.1. Étude de viabilité

La détermination de viabilité sur des ovocytes *Cyclospora cayetanensis* a été réalisée par électrorotation ; l'état de reproduction par spores de ces ovocytes a facilement été déterminé, comme l'état de fertilisation des ovules *A. suum* [40].

L'effet de biocide sur des levures ont été étudiés [129] montrant que, au-dessus d'un seuil de concentration de Cosmocil, la conductivité membranaire augmente avec la dose, pendant que la conductivité interne change seulement quand la conductivité membranaire a augmenté de manière conséquente. Des études portant sur des levures vivantes et mortes (par traitement thermique) ont montré l'influence de la viabilité sur leur signature diélectrophorétique [130].

Patel *et al.* répertorient des mesures diélectriques de cellules mortes dans [131].

3.2. Étude de comportement

Des cellules tissulaires humaines ont été exposées à des concentrations non toxiques d'amiante et sont étudiées afin de voir les changements de comportement électrique pendant 72 heures. Les résultats ont révélé une légère hausse de la conductivité interne et une baisse de la conductance membranaire [132] au bout de 12 heures d'exposition. Ces effets peuvent être causés par la perméabilisation de la membrane cellulaire et de la fuite des ions dans le milieu. De nombreuses recherches sont en cours sur les globules rouges ; par exemple, une étude [133] montre que la capacitance de la membrane augmente et sa conductance diminue quand la conductivité du milieu externe est grande ce qui reflète les dispersions moléculaires des globules.

Huang *et al.* ont mesuré l'évolution des propriétés électriques de lymphocytes T humains au cours de leur cycle de division [134]. Sudsiri *et al.* ont mesuré l'influence de la température sur les propriétés diélectriques de la membrane des globules rouges (soumis à des températures comprises entre 10 et 35°C) [135].

Les levures, de par leur simplicité de mise en culture et leur facilité à être employées, sont largement étudiées dans la littérature. Hölzel montre l'influence des propriétés électriques du milieu sur le tracé du spectre [136]. Quand les cellules tournent dans le sens opposé à celui du champ électrique, le pic d'électrorotation d'amplitude similaire survient à une fréquence plus faible lorsque la conductivité du milieu est plus faible (Figure I.42). Par ailleurs, on constate que la position du pic d'électrorotation en basse fréquence ainsi que la fréquence à laquelle la rotation des cellules s'inverse dépendent de la conductivité du milieu d'immersion.

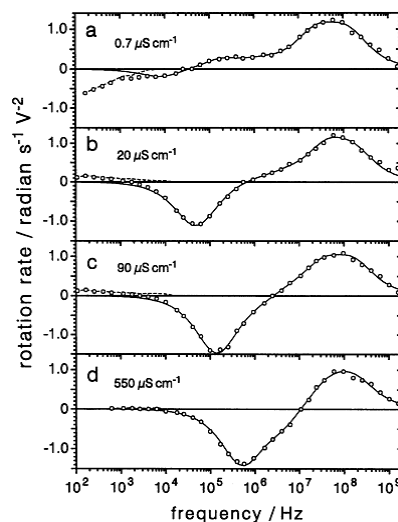


Figure I.42 : Spectres d'électrorotation de levures dans quatre milieux de conductivités différentes

La Figure I.43 présente le tracé sous Matlab[®] de la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti pour des cellules de type Jurkat dans des milieux à différentes conductivités. La vitesse de rotation des cellules est proportionnelle à ce terme comme nous l'avons préalablement écrit (Equation I.17). Les cellules présentent une évolution de leur comportement (position des pics d'électrorotation et de la fréquence à laquelle la rotation des cellules s'inverse) en fonction de la conductivité du milieu comparable à celle révélée par l'étude expérimentale présentée par Hölzel.

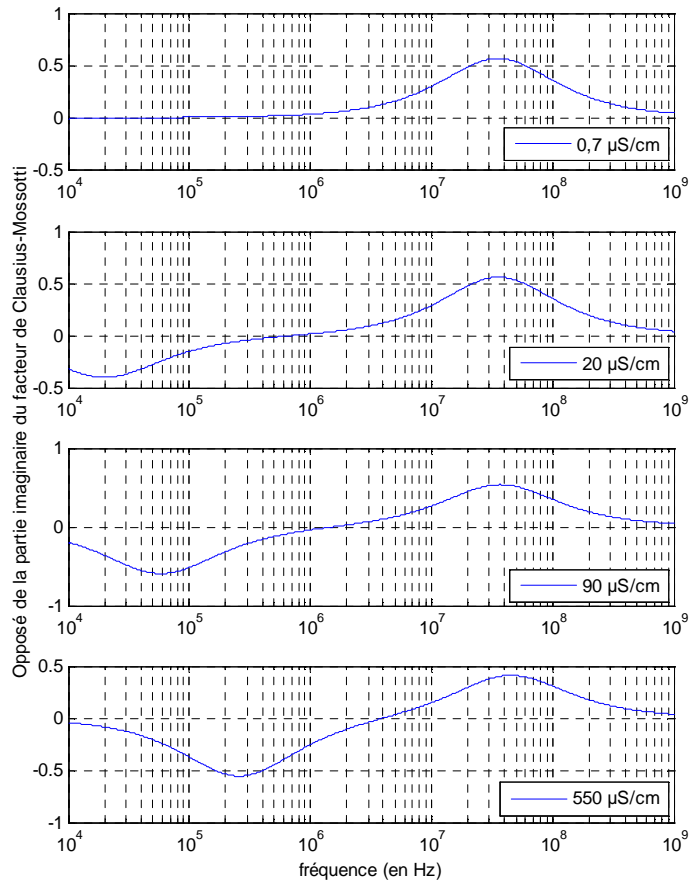


Figure I.43 : Tracé de l'opposé de $\text{Im}(K(\omega))$ de cellules Jurkat dans quatre milieux de conductivités différentes

De nombreuses études portent sur le comportement diélectrophorétique de cellules infectées par le paludisme (pour rappel voir Figure I.13) [43, 137] ; d'autres sur des fibroblastes infectés par des virus [138] en effectuant un suivi de l'infection virale contrôlé via une analyse protéique des cellules. Il résulte de cette étude l'observation de la décroissance graduelle de la capacité spécifique membranaire des cellules après infection.

3.3. Mesure des paramètres électriques de cellules

Des spectres diélectriques de cellules d'algues [139] ont permis de montrer que la paroi cellulaire avait une permittivité très faible (3-5), ceci pouvant s'expliquer par la forte teneur en silicate et la faible teneur en eau.

Afin d'évaluer la séparation par diélectrophorèse de lymphocyte T et B, monocytes et granulocytes, Yang *et al.* ont mesuré les propriétés électriques par électrorotation [140]

Les liposomes – vésicules fabriquées à partir de bicouches lipidiques – sont aussi employés: ils constituent des modèles simplifiés des cellules [141]. Les liposomes unilamellaires présentent un spectre dont les paramètres électriques peuvent être extraits à partir d'un modèle monocouche. En ce qui concerne les liposomes multilamellaires, ou ceux composés de multiples vésicules, l'interprétation des résultats s'avère plus complexe.

3.4. Séparation

De nombreuses techniques de séparation et de tri cellulaire reposent sur la différence de signature diélectrophorétique existant entre différentes cellules. Ainsi, Markx *et al.* ont séparé des bactéries *Micrococcus lysodeikticus* de levures *Saccharomyces cerevisiae* [142] ; de même, Kang *et al.* ont réussi à séparer des globules blancs et aussi des cellules mammaires cancéreuses suivant leur taille [143]. On peut aussi citer Li *et al.* qui utilise la fréquence caractéristique pour séparer des cellules de *Listeria* qui sont mortes par traitement thermique adapté ou vivantes [144]. Un signal de 1 V est appliqué à 10 kHz – fréquence à laquelle l’ensemble des cellules est soumis à la diélectrophorèse négative – et ensuite, alors que la fréquence est augmentée, les cellules vivantes basculent vers la diélectrophorèse positive (Figure I.44).

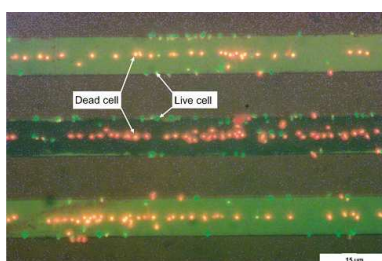


Figure I.44 : Image au microscope optique de la séparation de cellules de *Listeria* mortes et vivantes à 50 kHz

Afin d’illustrer le pouvoir de séparation diélectrophorétique, on peut citer les travaux de Gascoyne *et al.* ayant montré la capacité de détecter des changements dus à l’expression d’un gène dans des lignées de cellules de rat par une technique alliant diélectrophorèse et microfluidique : le fractionnement par couplage flux-force [41].

IV. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons tout d’abord étudié la structure biologique des cellules, structure qui se veut universelle quelque soit le type cellulaire. Ensuite, nous avons énuméré les différentes propriétés physiques intrinsèques de la cellule et fait l’inventaire des techniques de caractérisation basées sur ces propriétés. En particulier, l’étude des propriétés électriques des cellules permet l’analyse de leur comportement lorsqu’elles sont soumises à une source de champ externe tout comme le diagnostic de certaines maladies. Le principe utilisé dans le cadre de notre travail repose sur une manipulation sans contact par application d’un champ électrique inhomogène. La réponse obtenue est propre à chaque type cellulaire et fonction de l’état physiologique de la cellule. A partir de modèles physiques des cellules, nous avons présenté des méthodes de détermination des paramètres électriques des différents compartiments des modèles cellulaires.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Dans le chapitre précédent, les principes et techniques de caractérisation cellulaire actuels ont été exposés. Nous utilisons la méthode basée sur le principe de l'électrorotation à partir duquel il est possible d'atteindre les propriétés électriques intrinsèques des cellules, procédé sans contact qui permet de générer de forts champs à partir d'une faible tension.

Ce chapitre sera consacré à l'instrumentation et à la présentation détaillée de la plateforme expérimentale – tout ce qui est nécessaire à la réalisation des expérimentations : matériel biologique, micro-système et environnement électrique, système de visualisation et d'acquisition ainsi que les moyens permettant l'exploitation des déplacements observés. La mise en place de ce banc expérimental constitue, au niveau du laboratoire, le point de départ d'un axe scientifique sur l'interaction champ électromagnétique – cellule dont l'objectif est de caractériser les effets des champs au niveau cellulaire.

I. MATERIELS BIOLOGIQUES

Les modèles cellulaires utilisés au cours de cette thèse sont :

- des levures : micro-organismes eucaryotes facilement cultivables et utilisables en laboratoire,
- des liposomes : vésicules constituées de une à plusieurs bicouches lipidiques séparées par des compartiments aqueux. La composition au niveau de la membrane et du milieu interne est donc contrôlable lors de l'élaboration de ceux-ci. Ils constituent des modèles essentiels pour l'étude fondamentale de la cellule biologique et sont structurellement proches des cellules animales : ils sont donc bien adaptés pour étudier les propriétés biophysiques de la membrane. Ils participent aujourd'hui à de nombreuses applications en médecine pour la vectorisation des médicaments ou encore le diagnostic *in vitro* [66]. Les liposomes peuvent encapsuler des molécules ou des particules et les membranes peuvent servir de substrats pour l'immobilisation de molécules dans les études de reconnaissance biologique.

Jusqu'à présent, le laboratoire ne disposait pas des infrastructures nécessaires à la culture et à la manipulation de cellules vivantes humaines. Il s'est récemment doté d'une salle de culture de cellules eucaryotes, qui devrait permettre l'étude prochaine de nouveaux modèles biologiques.

1. Préparation des levures

1.1. Mises en culture

Les levures sont de type *Saccharomyces cerevisiae* et sont issues d'un bloc commercial de levure pressée alimentaire. Une petite quantité de levures est prélevée sous hotte à flux laminaire et suspendue dans un milieu aqueux composé de 1% d'extrait de levure, 4% de glucose et 1 % de peptone (les pourcentages sont massiques). Par la suite, elles sont mises en culture sur milieu gélosé sous hotte (ajout de 1,5 % d'agar au milieu dans ce cas) dans des boîtes de Pétri par stries d'épuisement afin de créer des colonies isolées.

1.2. Préparation d'échantillons

Préalablement aux expérimentations, les levures sont lavées (centrifugation, élimination du surnageant et resuspension) dans le milieu de suspension désiré selon les conditions de l'expérience. Ces organismes sont en effet d'une grande tolérance vis-à-vis de la pression osmotique ; les levures peuvent être suspendues à nouveau dans de l'eau sans subir de choc. Elles ont une apparence sphérique (légèrement ovale) d'un diamètre moyen de 6 μm .

Le colorant vital dit bleu de Trypan est adapté à l'estimation de la viabilité des levures [145]. En effet, seules les levures mortes laissent entrer le colorant et se colorent en bleu tandis que les cellules vivantes ne sont pas colorées. Les expériences sous champ électrique n'ont pas montré d'impact sur la viabilité des levures pour les conditions expérimentales suivantes : tensions crête-à-crête appliquées aux électrodes distantes de 400 μm allant jusqu'à 9 V.

2. Fabrication des liposomes

Les liposomes sont des bicouches lipidiques artificiellement formées. Ils sont préparés à partir de phospholipides : molécules amphiphiles [146]. En effet, un phospholipide possède une tête polaire hydrophile qui sera donc en contact avec de l'eau et la queue (partie apolaire) constituée de chaînes formant un cœur hydrophobe protégé de l'eau (Figure I.2). Dans un état thermodynamiquement stable, une organisation de ces phospholipides a lieu de telle manière que les têtes polaires se regroupent entre elles et permettent l'établissement d'une bicouche d'épaisseur de l'ordre de 5 nm.

Les phospholipides principalement utilisés dans nos expériences sont (Figure II.45) :

- DOPC : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (Sigma Aldrich) : lipide insaturé majoritaire qui servira de matrice lors de l'élaboration de la solution lipidique à faire sécher,
- 18:1 NBD PE : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (Avanti Polar Lipids) : le marquage au NBD est situé au niveau de la tête,

- 16:0-12:0 NBD PC : 1-palmitoyl-2-(12-((7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)lauroyl)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids) : le marquage fluorescent NBD est greffé en substitution de la partie terminale d'une des deux chaînes carbonées.

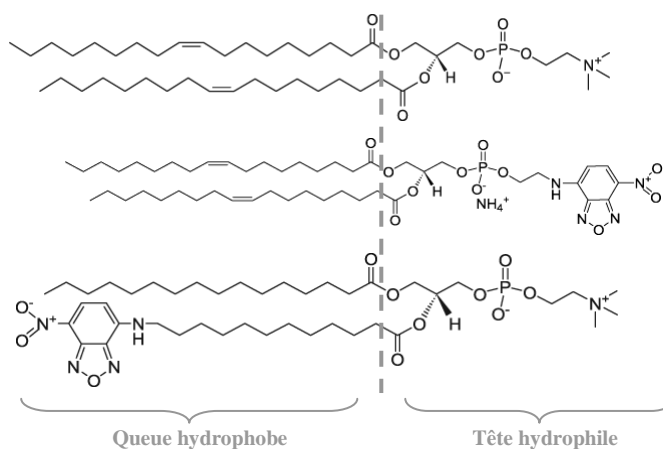


Figure II.45 : Formules chimiques du DOPC, NBD PE et NBD PC (de haut en bas) d'après www.avantilipids.com

Les lipides marqués au NBD fluorescent sont excités par la lumière bleue (460 nm) et cette excitation leur fait émettre une lumière verte (534 nm). Le mélange entre le DOPC et les lipides marqués est a priori relativement stable étant donné que ces derniers ont été synthétisés avec des queues du même type : chaîne de carbone de longueurs voisines (moins de 4 carbones de différence) ; ils présentent donc une structure similaire à celle de leur homologue non marqué (le DOPC) de façon à perturber le moins possible les propriétés de la bicouche.

Le produit sec, sous forme de poudre, est dissout dans une solution de chloroforme:méthanol (proportion volumique 9:1). Pour chaque lipide, une solution mère concentrée est préparée à 10 mg.mL^{-1} . La solution lipidique finale est concentrée à $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ et contient 2,5% massique (*masse soluté sur masse de la solution en pourcentage*) de lipides marqués.

2.1. Par électroformation

Le principe de la méthode d'électroformation a été mis au point depuis une vingtaine d'années [147]. Il repose sur le décollement progressif et successif d'une bicouche à partir d'un dépôt surfacique de lipide sur une plaque de verre. Un champ électrique alternatif lentement variable en fréquence est appliqué perpendiculairement au film de phospholipides afin de faire mouvoir les feuillet lipidiques (Figure II.46).

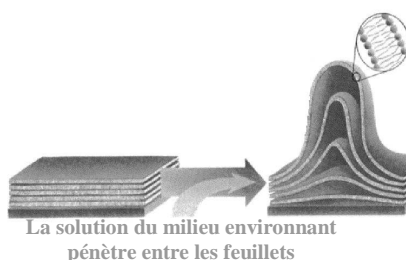


Figure II.46 : Décollement des bicouches par application d'un champ perpendiculairement aux feuillet [148]

Le champ électrique est appliqué entre deux plaques de verres recouvertes d'un film conducteur d'ITO (Indium Tin Oxyde) [149, 150]. Un fil de cuivre autocollant permet d'appliquer le champ sur les faces conductrices de chacune des lames sur lesquelles est déposée la solution lipidique de travail désirée pour former les liposomes. Les lames ainsi préparées sont placées sous vide pendant au moins deux heures pour éliminer toute trace de chloroforme ; en effet, celui-ci altère les propriétés des membranes. Le dépôt (10 μL environ) se fait via une seringue Hamilton sur une couche en faisant des zigzags. Entre les deux surfaces conductrices qui sont placées en regard l'une de l'autre, un joint silicone autocollant définit la chambre d'électroformation qui sera scellée afin d'assurer l'étanchéité.

Le milieu aqueux dit aussi milieu de gonflement qui formera le milieu interne des liposomes est injecté au sein de cette chambre ce qui a pour effet d'hydrater les feuillettes lipidiques. Dans le cas de l'électroformation, la solution interne utilisée ne peut contenir trop d'ions, ce qui pourrait empêcher le gonflement, et est donc une solution aqueuse avec ajout de saccharose à 50 mmol.L^{-1} . Le remplissage de la chambre se fait sous champ (Figure II.47).

Des paliers de tensions, fréquences et durées prédéfinies permettent de provoquer l'apparition d'un maximum d'évènements de fusion. A la fin de l'électroformation, les liposomes ont gonflé et atteint des tailles comprises entre 10 et 100 μm et afin de les détacher de la surface, le dernier palier est fixé à 0,3 V_{eff} , 4 Hz pendant 15 minutes. La formation prend environ trois heures. Le protocole complet suivi pour l'électroformation est donné en Annexe II.

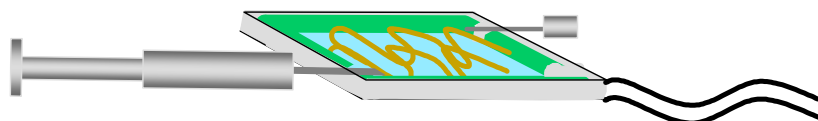


Figure II.47 : Chambre d'électroformation lors de la phase de remplissage de celle-ci

Les liposomes ainsi formés sont des vésicules lipidiques unilamellaires géantes (Figure II.48) dont la membrane est constituée d'une bicouche plus ou moins fluide et incompressible en fonction de la composition de phospholipides.

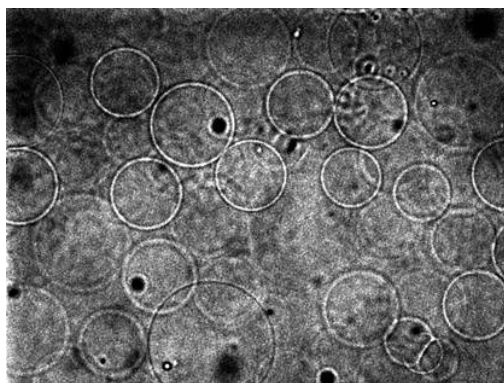


Figure II.48 : Observation de liposomes lors de l'électroformation

2.2. Par extrusion

L'extrusion est un procédé de fabrication mécanique par lequel la suspension de lipides est comprimée et contrainte de passer à travers les pores d'une membrane en polycarbonate permettant ainsi la formation de petits liposomes unilamellaires. La taille dépend du diamètre des pores et peut atteindre une douzaine de micromètre pour des pores de 10 μm de diamètre.

La solution, l'extruder (Figure II.49), les seringues et le bloc chauffant (Figure II.50) sont placés dans un four avant formation des liposomes réalisée à une température avoisinant les 45°C pendant au minimum 30 minutes.

Le solvant est ici évaporé sous un flux d'azote sec sans oxygène ; les lipides sont ensuite hydratés dans un milieu d'immersion aqueux composé de saccharose et dont la conductivité peut être ajustée si souhaité par ajout de KCl, l'osmolarité finale étant fixée à 50 mmol.L^{-1} . Préalablement à l'extrusion, la solution lipidique subit quelques cycles de gel/dégel.

L'extruder assemblé auparavant renferme la membrane en polycarbonate dont le diamètre des pores peut être choisi entre 1 à 10 μm .

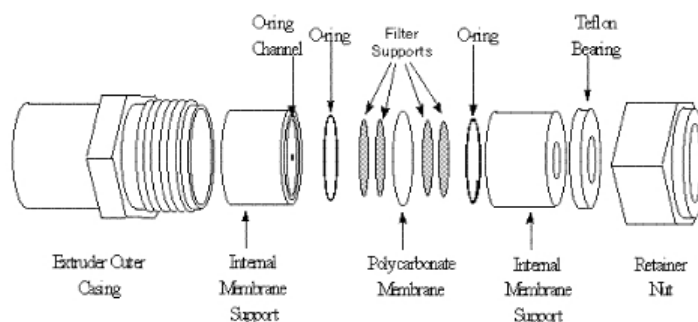


Figure II.49 : Assemblage de l'extruder

La solution hydratée remplit une des deux seringues insérées dans l'extruder. Ensuite, des allers-retours sont effectués lentement à travers la membrane et ce dans le bloc chauffant qui maintient l'ensemble à une température avoisinant les 45°C (Figure II.50). Le protocole complet d'extrusion est donné en Annexe III.



Figure II.50 : Extrusion d'après www.avantilipids.com

II. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le dispositif expérimental (Figure II.51) doit permettre la mise en mouvement de cellules sous champ électrique ainsi que l'observation et l'acquisition vidéo de ce mouvement.



Figure II.51 : Dispositif expérimental (en haut : côté électrique, en bas, partie microsysteme et optique : pilotage des appareils et acquisition sur PC via les interfaces GPIB et Firewire)

1. Système de génération du champ électrique

1.1. Microsysteme

Huang *et al.* ont défini une géométrie d'électrodes satisfaisantes à partir de polynômes répondant aux équations de Laplace [151]. Le contour est obtenu à partir du tracé des équipotentielles : $x^2 - y^2 = \pm a^2$ avec $2a$ la distance qui sépare deux électrodes en face à face (Figure II.52 cas a). En effet, des études ont montré que les variations du couple induit sur les particules dans des formes de structure de quatre électrodes planaires en arrangement circulaire (Figure II.52) sont suffisamment grandes pour engendrer des erreurs de mesures [152].

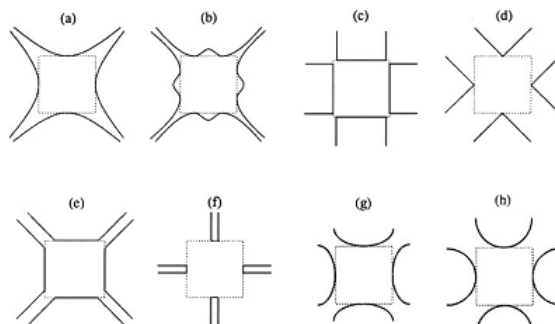


Figure II.52 : Forme d'électrodes étudiées a) hyperbole polynomiale b) os c) carrée d) pyramidale e) pyramidale tronquée f) épingle g) ellipse h) circulaire

En revanche, les électrodes polynomiales offrent la possibilité d'obtenir un champ relativement uniforme dans l'espace inter-électrodes et aussi la possibilité de générer un couple suffisant pour assurer la rotation des cellules. En effet, il s'avère que le champ est constant au centre du dispositif (cercle blanc sur la Figure II.53). Il convient donc – afin de soumettre les cellules à un champ de même amplitude – de les placer dans la zone centrale du système d'électrodes où la force de diélectrophorèse n'intervient pas et où les variations de couple sont faibles.

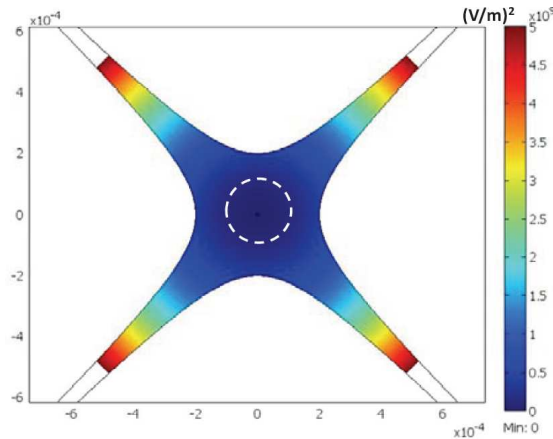


Figure II.53 : Electrodes polynomiales : carte du module de E^2

Le mode d'alimentation des électrodes dépend du champ que l'on souhaite appliquer (Figure II.54). Ainsi, un avantage de l'utilisation des électrodes polynomiales est d'effectuer, préalablement à nos expérimentations, l'application de diélectrophorèse négative permettant de déplacer les cellules dans cette zone de champ d'amplitude constante. Pour des électrodes séparées par un gap de $400\ \mu\text{m}$, la zone est délimitée par une distance d'environ $200\ \mu\text{m}$ [34].

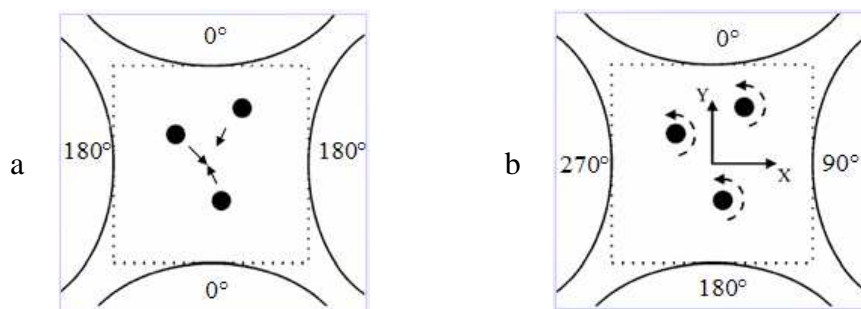


Figure II.54 : Alimentation des électrodes (a) cas de la diélectrophorèse (b) cas de l'électrorotation

Par ailleurs, une étude sur l'électrorotation dans une cage octopole (Figure II.55) montre que les cellules tournent plus lentement que dans un piège à quatre électrodes, avec la même tension et la même distance entre électrodes [153]. En revanche, ce système offre la possibilité de maîtriser le placement vertical de la cellule, et de s'affranchir de tout contact entre la cellule et le substrat.

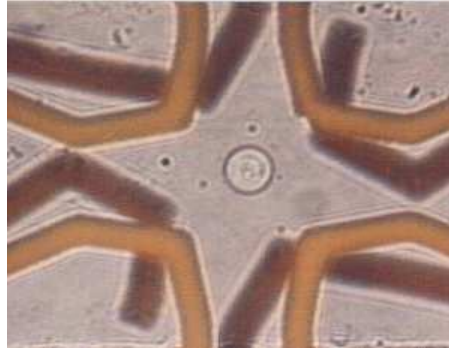


Figure II.55 : Cage octopole 3D (distance entre deux électrodes opposées : 40 μm)

Un microsystème doit permettre de manipuler des cellules tout en étant biocompatible. Ainsi, le procédé de fabrication du microsystème est basé sur l'emploi des techniques standard de photolithographie, les électrodes étant constituées d'or. Le dessin du masque a été réalisé à l'aide du logiciel CleWin. Les microélectrodes (Figure II.56) ont été déposées sur des plaquettes de pyrex métallisées recouvertes d'une couche de 50 nm de titane (sert de couche d'apprêt) et d'une couche de 100 nm d'or ; ces dépôts ont été réalisés par la société ACM.

L'étape de photolithographie¹ débute par l'enduction de résine photosensible Shipley S1818 positive, les zones révélées correspondent donc aux zones exposées aux UV c'est-à-dire non protégées par les motifs opaques du masque. La plaquette est préalablement placée 2 minutes sur une plaque chauffante à 90°C afin de favoriser l'adhérence de la résine. Le dépôt s'effectue en utilisant un spin-coater programmé avec les données suivantes : vitesse (4000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$), accélération (5000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) et durée (30 s). Un pré-recuit sur la plaque à 90°C durant une minute permet d'éliminer les solvants : produits les plus volatiles. L'insolation de la plaquette est ensuite réalisée avec un aligneur à UV Karl Suss MJB 4, avec une durée d'exposition de 5 s. La plaquette est ensuite immergée durant 40 s dans un produit révélateur dilué à 50 % (Microposit Developer Concentrate, Shipley) avant d'être rincée puis séchée. Il s'ensuit une étape de cuisson à 110°C pendant une minute destinée à durcir la résine pour lui assurer une bonne résistance aux attaques chimiques.

Les motifs des électrodes sont ensuite obtenus par gravure humide de l'or puis du titane en immergeant la plaquette dans 2 bains successifs de gold etchant (Sotrachem) puis de titanium etchant (Sigma). Pour terminer, on procède au délaquage du wafer en le trempant 5 minutes dans un bain de Microposit Remover 1165 (Shipley) à 60°C.

¹ Lieu de réalisation : salle blanche du laboratoire SATIE (groupe BIOMIS) à Rennes

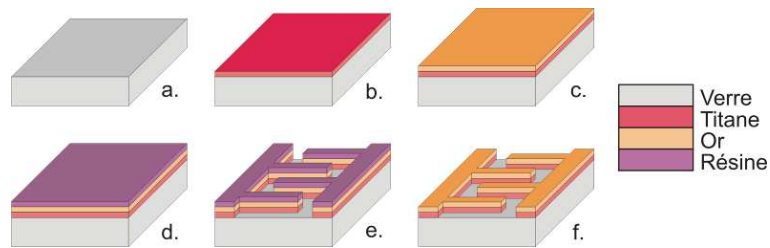


Figure II.56 : Etapes de réalisation des motifs des électrodes

Les microélectrodes polynomiales réalisées par le procédé précédent sont visibles sur la Figure II.57 qui présente aussi le branchement final du microsystème afin de générer un champ tournant. Comme vu au 1^{er} chapitre, les faibles tensions appliquées permettent de minimiser les échauffements thermiques et ainsi de préserver la viabilité cellulaire.

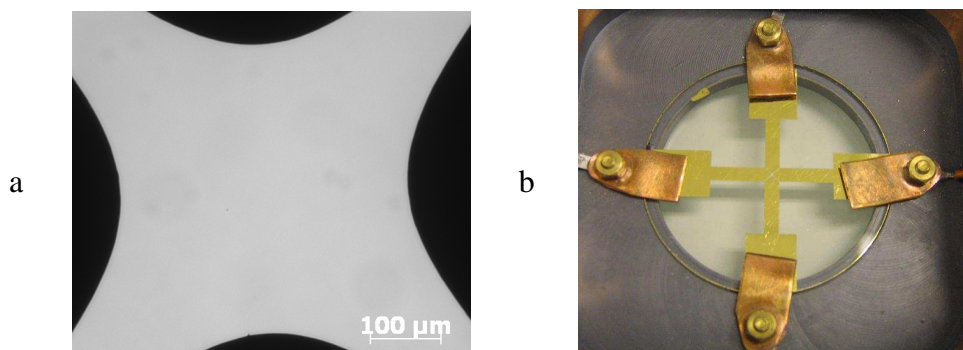


Figure II.57 : Electrodes polynomiales (a) microsystème, (b) branchement

1.2. Matériel et interface

- Matériel électrique (Agilent Technologies)

Quatre générateurs (standard waveform generator 33250A) permettent la production de tensions sinusoïdales. Ces générateurs peuvent être synchronisés entre eux et permettent d'atteindre des fréquences allant de 1 μ Hz à 80 MHz pour des signaux sinusoïdaux. L'électro-osmose, qui est la conséquence de la formation d'une double couche électrique (Figure I.39) à la surface des électrodes, est un phénomène qui doit être pris en compte. En effet, il peut induire des déplacements de fluide lors d'une expérience de diélectrophorèse : la double couche est mise en mouvement en raison de la force exercée sur les charges accumulées à la surface des électrodes par la composante tangentielle du champ électrique. Elle entraîne avec elle le fluide. Afin de réduire ces effets, la fréquence minimale du signal appliqué aux électrodes est ici de 10 kHz. Au-delà d'une certaine fréquence, de l'ordre de quelques dizaines de kHz, la double couche n'a plus le temps de se former. Aussi, les effets électro-osmotiques se manifestent exclusivement en basse fréquence [116].

Les signaux sont observés sur un oscilloscope large bande (DSO6034A) qui permet de contrôler les différentes caractéristiques des signaux délivrés via une interface décrite ci-après.

Les impédances de sortie des générateurs et l'impédance d'entrée de l'oscilloscope peuvent être réglées à 50Ω ou $1 M\Omega$; on choisit la 1^{ère} étant donné que celle du microsystème est supérieure à $1,5 k\Omega$ afin de la négliger sur toute la gamme de fréquence étudiée. Tous ces équipements sont contrôlés par ordinateur via des interfaces GPIB (General Purpose Interface Bus). Un schéma du câblage est visible sur la Figure II.58.

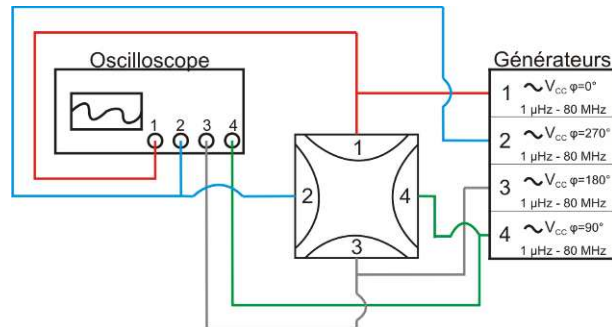


Figure II.58 : Connexion du matériel électrique

- Interface graphique

Une interface utilisateur graphique a été programmée sous Labview[®] (Figure II.59).

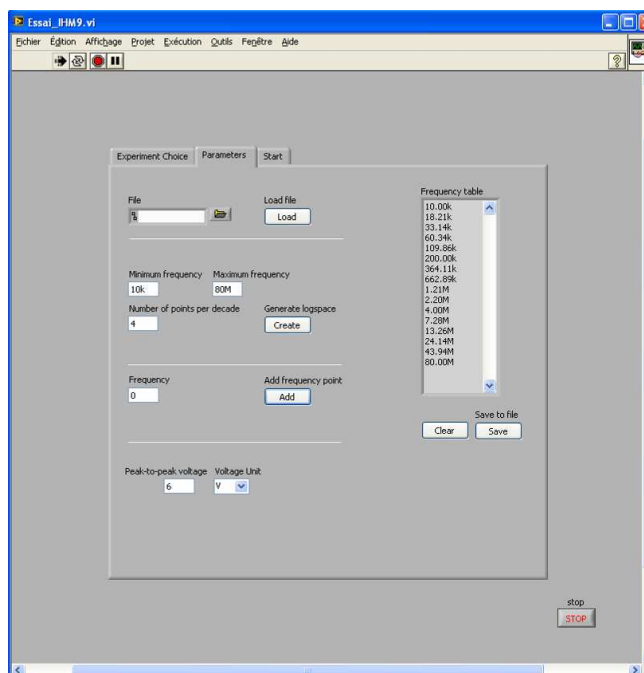


Figure II.59 : Interface graphique pour l'utilisateur

Les paramètres tension, fréquence, permettant d'ajuster le champ électrique produit par les électrodes sont accessibles. L'interface permet à l'utilisateur de choisir le mode de fonctionnement (diélectrophorèse conventionnelle, électrorotation ou encore diélectrophorèse à ondes progressives). Les commandes sont communiquées aux générateurs de tension via les interfaces GPIB. Les tensions générées sont affichées sur l'oscilloscope, les calibres utilisés étant automatiquement ajustés par le programme.

2. Système d'observation

La zone d'intérêt où nos cellules sont visualisées et mises en mouvement correspond à la partie transparente du microsystème ; il nous est possible d'observer les cellules avec une lumière de microscope traditionnelle. Afin de réaliser le suivi des cellules en mouvement, des vidéos sont enregistrées par caméra. Ainsi, il nous est possible de contrôler le bon déroulement des expériences tout en qualifiant les résultats dans un 1^{er} temps ; ceux-ci seront par la suite quantifiés grâce à un traitement réalisé sous Matlab[®].

2.1. Microscope optique

Le principe est d'éclairer en lumière blanche le support, tout en ayant la possibilité d'utiliser une lampe à fluorescence qui, à travers un filtre, ne laissera passer que la longueur d'onde correspondant au marqueur fluorescent utilisé (Figure II.60).

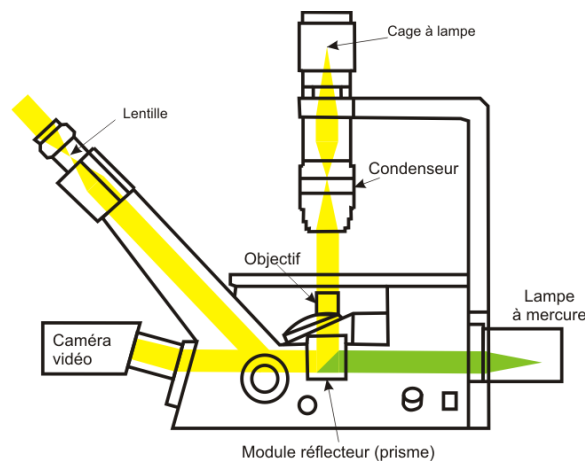


Figure II.60 : Principe de transmission optique d'un microscope inversé

Deux microscopes sont à disposition :

- un microscope inversé à contraste de phase Carl Zeiss Axiovert 40
- un microscope droit à épifluorescence Carl Zeiss AxioImager

Usuellement, nous utilisons le microscope inversé qui permet une mise en place aisée du dispositif soutenant le microsystème au-dessus des objectifs ; il comprend les objectifs : 10X, 20X et 32X. La lentille du microscope ayant un grossissement de 10X ; pour les objectifs précédents, le grossissement focal à l'œil nu est respectivement de 100, 200 et 320.

Cependant, pour les liposomes de petites tailles réalisés par extrusion, il s'est avéré nécessaire d'utiliser le 2nd microscope avec un zoom plus important tout en conservant une distance de travail intéressante : de 9 mm pour l'objectif en considération (LD EC Epiplan-NEOFLUAR 50X) qui permet toujours de travailler avec notre microsystème et ses connexions.

2.2. Caméra de visualisation et logiciel d'acquisition

La caméra AxioCam HSm est adaptée à des observations en fluorescence. C'est une caméra à grande vitesse qui nous permet de visualiser aisément le déplacement des cellules : de 60 à 198 images par seconde avec des résolutions respectives de 660 x 494 et 124 x 98 pixels en noir et blanc. Le système de contrôle par caméra est également relié à l'ordinateur pour une acquisition d'images ou de films via le logiciel Axiovision[®]. Il est possible de choisir le type de fichier que l'on désire sauvegarder, sachant que le format .zvi (pour des films) permet de conserver toutes les données relatives à l'acquisition optique telles que l'acquisition de chaque image, le temps d'exposition, l'échelle, le zoom utilisé, la taille des images ...

Quatre points par décade de fréquence permettent l'acquisition d'un spectre d'électrorotation satisfaisant pour extraire les paramètres électriques voulus. Le traitement d'images est développé à la fin de ce chapitre.

3. Protocole expérimental

Le dispositif doit intégrer des contraintes biologiques puisque le travail se fait dans un environnement liquide qui doit être compatible avec le microsystème et la suspension cellulaire. Il est parfois nécessaire d'ajuster la composition du tampon afin que celui-ci soit compatible avec le système tout en préservant la viabilité des cellules.

Préalablement à toute expérience, le microsystème est lavé et rincé à l'éthanol et à l'eau distillée. Les cellules prélevées de leur culture sont lavées trois fois dans la solution qui servira de milieu de suspension via un procédé simple de centrifugation et élimination du surnageant.

3.1. Mise au point d'un tampon

Le tampon est le milieu de suspension dans lequel les cellules sont immergées. Il doit être faiblement conducteur pour ne pas risquer d'endommager les électrodes ni porter atteinte à la viabilité cellulaire de par une élévation de température. Il doit aussi assurer le maintien physiologique des cellules : l'osmolarité doit parfois être ajustée.

- Conductivité électrique

La conductivité du milieu (σ_m) est un paramètre fondamental, elle ne peut être choisie dans une large gamme de valeurs :

- Préservation de la viabilité : en effet, pour un réseau d'électrodes (bandes parallèles espacées de 20 μm), l'élévation de température consécutive à l'application d'une tension V peut

être approchée, en régime permanent, par la relation $\Delta T \approx \frac{\sigma_m V_{eff}^2}{k_t}$ dans laquelle k_t désigne la

conductivité thermique de la solution. Pour $V_{eff}^2 = 10V$ et $\sigma_m = 1S.m^{-1}$, on obtient $\Delta T \approx 20^\circ C$ ce qui peut détériorer la membrane. En prenant des conductivités inférieures à $100 mS.m^{-1}$, ΔT devient inférieur à $2^\circ C$ tolérée par les cellules [154]. De plus, ces valeurs permettent de réduire les risques d'endommagement des électrodes en raison de courants trop élevés.

- Influence sur le comportement diélectrophorétique de la cellule : décalage de la position du pic d'électrorotation en basse fréquence et de la fréquence pour laquelle la rotation des cellules change de sens Figure I.42).

La conductivité du milieu est mesurée grâce à un conductimètre Consort C532. L'ajout de KCl pour ajuster la conductivité implique une augmentation de l'osmolarité (Figure II.61).

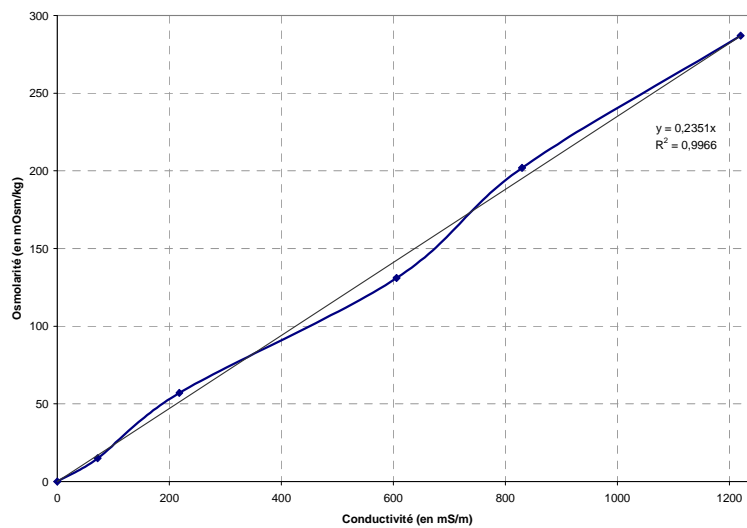


Figure II.61 : Influence de la conductivité sur l'osmolarité (conductivité ajustée par ajout de KCl)

Il apparaît que pour une conductivité de $200 mS.m^{-1}$, l'osmolarité n'atteint pas $50 mOsm.kg^{-1}$. Pour la plupart des cellules, les valeurs physiologiques d'osmolarité sont de l'ordre de $300 mOsm.L^{-1}$ (plasma sanguin). Ainsi, une faible conductivité peut induire un risque d'éclatement des cellules.

- Osmolarité

Les cellules sont le siège d'échanges d'eau ou de substances dissoutes, ces échanges se font grâce à la perméabilité membranaire. Ces échanges se font du milieu le moins concentré vers le plus concentré grâce à la pression osmotique. La contrainte liée à l'utilisation d'une solution faiblement conductrice (solution hypotonique) lors des expériences, impose la mise au point de solutions pauvres en ions qui risquent de faire éclater les cellules en provoquant une entrée massive d'eau par osmose. En effet, il est important de maintenir une pression osmotique normale ; ainsi, l'ajout de molécules volumineuses imperméables à la membrane permet de compenser la faible teneur en ions. Les molécules vont exercer une pression suffisante qui

contrebalance la force intracellulaire ce qui se traduit par une augmentation de l'osmolarité de la solution. Classiquement, du saccharose est ajouté à la solution pour maintenir l'osmolarité. En effet, ce produit est imperméable à la membrane, non toxique, non chargé, peu coûteux et très soluble.

L'osmolarité du milieu est mesurée grâce à un osmomètre cryoscopique manuel (Fisher-Scientific). Le principe de fonctionnement est le suivant : les solutions aqueuses peuvent généralement être surfondues à une température définie. La congélation de l'échantillon est initiée à l'aide d'une aiguille froide et permet alors de déterminer un point d'inflexion dans la courbe de température qui est directement relié à l'osmolarité de la solution.

- Cas particulier des liposomes

Le milieu interne est une solution aqueuse dont l'osmolarité est ajustée par ajout de saccharose tandis que l'osmolarité du milieu externe sera ajustée par ajout de sorbitol, autre type de sucre. Pour une même concentration molaire, une solution au sorbitol s'avère environ 1,88 fois moins dense qu'une solution au saccharose. Cette différence de densité est mise à profit lors de l'observation au microscope optique :

- elle permet une sédimentation des liposomes sur la lame d'observation et par conséquent dans le plan des électrodes,
- elle correspond aussi à une différence d'indices optiques qui permet ainsi d'obtenir un contraste amélioré : pour des solutions à 200 mM à 20°C, les indices optiques sont de 1,3433 et 1,3477 respectivement pour la solution au saccharose et au sorbitol [155].

3.2. Plan d'expériences

Lors de chaque expérience, les cellules sont préalablement préparées : centrifugation pour les extraire de leur milieu initial (milieu de culture dans le cas des levures), élimination du surnageant et suspension dans le milieu d'immersion.

Les cellules en suspension sont déposées dans une chambre : espace fermé de volume connu (100 μ L) qui se présente sous la forme d'un joint autocollant en silicone placé au-dessus du microsystème sur lequel une lamelle de verre est déposée. Elle permet de limiter les phénomènes d'évaporation, pouvant provoquer une variation de la conductivité de la solution ainsi que des mouvements de fluide au sein de celle-ci engendrant des perturbations.

Chaque électrode est connectée à un générateur via des plots de contact (vérification du contact avec un voltmètre). La gestion de l'application du champ se fait via l'interface où l'utilisateur choisit le type d'expérience (électrorotation ou diélectrophorèse), génère une table de fréquence (par défaut elle est logarithmique de 10 kHz à 80 MHz avec 4 points par décade) et indique la tension à appliquer.

L'acquisition se fait ensuite sous Axiovision[®] avec un film par point de fréquence appliquée. La mesure de la vitesse de rotation se fait par chronométrage manuel via l'enregistrement des vidéos ou par mesure automatisée (développée ci-après).

III. SPECTRE

L'instrumentation décrite ci-dessus permet de visualiser le déplacement des cellules au sein du microsysteme. Afin de mesurer les vitesses de rotation des cellules soumises à un champ tournant, un programme de détection et de mesure a été réalisé.

Reichle *et al.* mesurent la vitesse de rotation de cellules de structure inhomogène à partir de la détection de la modulation d'intensité lumineuse [156]. De Gasperis *et al.* estiment la position de la cellule en considérant que le centre de gravité de la cellule correspond au centre de rotation puis ils effectuent une auto-corrélation d'une image à l'autre [157].

Budde *et al.* ont développé un logiciel qui permet l'acquisition et le traitement des images, le suivi des cellules et la mesure de leur vitesse de rotation [158]. Après segmentation des images, l'axe principal de chaque objet est déterminé. Le suivi se fait d'une image à celle qui lui succède et permet d'exclure des objets suivant des zones de recherches définies. La mesure de la vitesse de rotation s'effectue par la mesure de la variation de l'angle. Zhou *et al.* se basent aussi sur la mesure de l'angle formé entre l'axe principal et l'axe horizontal [159]. La détermination de l'axe qui définit la position angulaire de la cellule, car celles-ci ne sont pas parfaitement sphériques, est la méthode que nous employons.

1. Mise en œuvre du procédé de mesure

1.1. Acquisition des images

Le logiciel Axiovision[®] est utilisé pour piloter la caméra rapide (AxioCam HSm) qui permet de filmer les cellules en rotation : un film de quelques secondes est réalisé pour chaque point de fréquence appliquée. Les images composant chaque séquence sont stockées dans un répertoire dont le nom correspond à la fréquence.

Le temps d'acquisition des images est ajusté par l'opérateur en fonction de la vitesse de rotation maximale sur tout le spectre, qui peut varier fortement selon le type de particules manipulées et les caractéristiques du milieu d'immersion telles que la viscosité ou la conductivité. Enfin, l'objectif choisi est le même pour l'ensemble des mesures ; de son choix dépend la résolution en $\mu\text{m}/\text{pixel}$, dans le cas de l'utilisation du microscope Axiovert 40 CFL, se référer au Tableau II.4.

Objectif	10X	20X	32X
Résolution (en $\mu\text{m}/\text{pixel}$)	0,99	0,5	0,31

Tableau II.4 : Résolution de la taille des pixels en fonction de l'objectif correspondant

1.2. Données

Le programme de mesure de vitesse des cellules a été développé sous Matlab[®], le traitement d'images fait appel à certaines fonctions de la toolbox « image processing ».

A l'exécution, l'opérateur spécifie dans une boîte de dialogue les paramètres suivants :

- la résolution (en $\mu\text{m}/\text{pixel}$),
- l'intervalle de temps entre deux images (en s),
- le rayon moyen approximatif des cellules manipulées (en μm).

Ensuite, il fournit le chemin du dossier comportant les sous-répertoires associés aux différences points de fréquence réalisés. Pour chaque fréquence, le programme détermine la vitesse moyenne ainsi que les vitesses minimale et maximale, l'écart-type et le nombre de cellules sur lequel le calcul a été effectué. Il trace le spectre d'électrorotation correspondant.

1.3. Définitions préliminaires

Dans la description du principe de la mesure automatique de vitesse des cellules, nous définirons tout d'abord les termes suivants :

- Séquence : ensemble d'images correspondant à un point de fréquence donné
- Objet : une cellule ou un agrégat de cellules
- Cellule isolée : pour qu'une cellule soit candidate à la mesure, elle doit se trouver suffisamment éloignée des autres en raison des modifications locales du champ que leur proximité pourrait induire

2. Mesure de la vitesse de rotation

Les images issues des acquisitions vidéo effectuées lors de nos expériences sont traitées dans le but de ne retenir que les cellules isolées et représentatives, par leur taille, de la population étudiée. Nous quantifions leur vitesse de rotation par la mesure de l'orientation de la cellule.

2.1. Traitement d'images

Cette étape consiste à détecter les objets dans l'image, à les étiqueter et à les caractériser. Pour chaque séquence et sur l'ensemble des images en niveau de gris, un filtrage passe-haut permet de déterminer le contour des objets (Figure II.62).

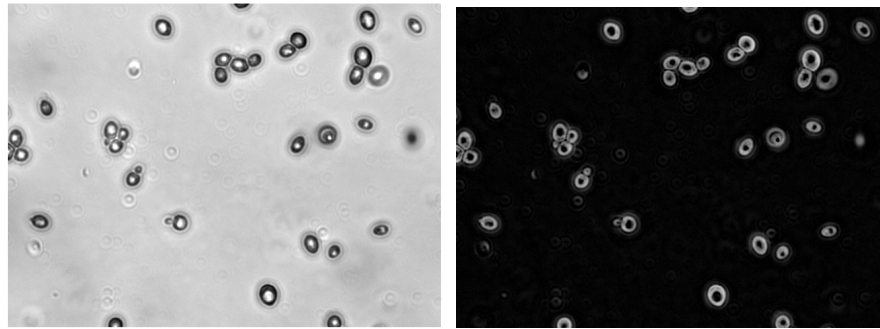


Figure II.62 : A gauche, image d'origine en niveau de gris et à droite, effet du filtrage passe-haut

Chaque image est ensuite convertie en image binaire par seuillage en intensité (la valeur de seuil est déterminée par la méthode d'Otsu impliquant le calcul de l'histogramme [160], Figure II.63) et les zones correspondant aux objets sont identifiées. Les petits objets (bruit qui peut être dû à la capture d'image ou au contraste non uniforme) sont supprimés de l'image par ouverture morphologique et les contours des objets restants sont remplis (Figure II.63).

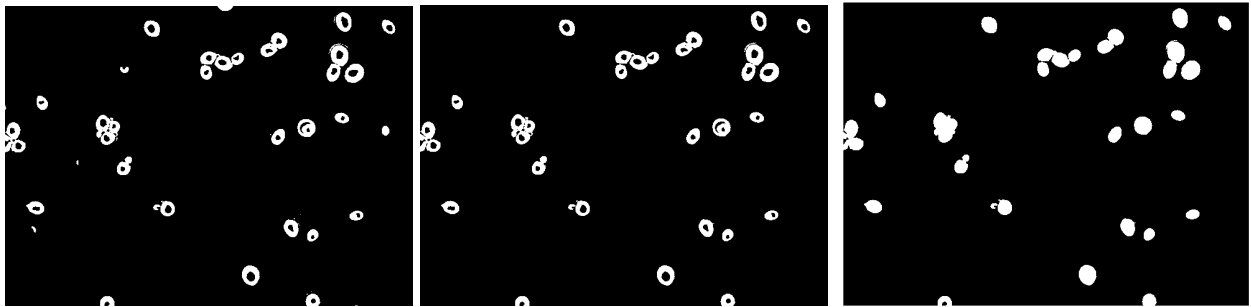


Figure II.63 : A gauche, image obtenue après binarisation ; au milieu, suppression du bruit et à droite, remplissage des contours

Ainsi, les objets sont étiquetés puis caractérisés par détermination de :

- l'aire
- les coordonnées du barycentre
- l'orientation : angle entre l'axe horizontal et l'axe principal de l'ellipse équivalente, compris entre -90° et 90° . Cette position angulaire (Figure II.64) sera utilisée pour déterminer la vitesse de rotation étant donné que l'intervalle de temps entre deux images est connu.
- la longueur de l'axe principal



Figure II.64 : Détermination de l'orientation de l'objet sous Matlab (angle entre l'axe horizontal représenté en pointillé et l'axe principal)

2.2. Critères de sélection

Une cellule est considérée comme isolée si les conditions suivantes sont réunies :

- distance entre son contour extérieur et celui d'une cellule voisine ou d'un agrégat voisin supérieure au diamètre de la cellule (critère défini expérimentalement),
- distance suffisant par rapport au bord de l'image : le barycentre de la cellule doit être séparé du bord par une distance supérieure à 1,5 fois le diamètre de la cellule. Cette précaution permet d'exclure les cellules situées en bordure d'images qui pourraient tout de même se trouver proches de cellules situées juste en dehors du cadre de l'image.

Après segmentation, un objet est considéré comme un agrégat si la dimension de son aire est supérieure à 1,7 fois l'aire moyenne d'une cellule. En effet, au-delà d'une certaine taille, un objet est éliminé afin d'exclure les amas de cellules que l'on ne désire pas étudier.

Les objets sont classés par catégorie selon trois types différents (Figure II.65) :

- 0 : cellule unique,
- 1 : agrégat de cellules,
- 2 : cellule se trouvant proche de la frontière de l'image.

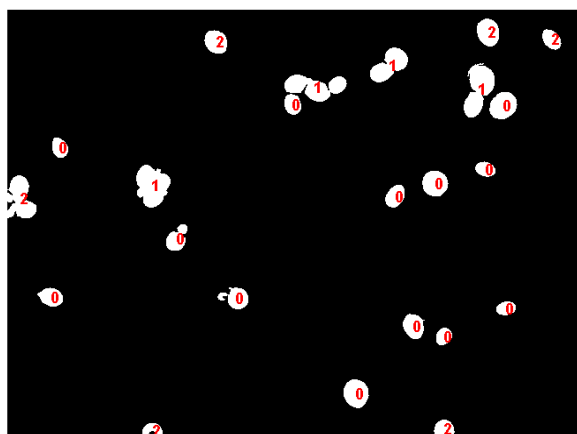


Figure II.65 : Étiquetage des objets

2.3. Suivi des objets dans une séquence

Dans chaque nouvelle image, nous procédons au repérage des objets répondant aux critères définis ci-dessus. Pour chaque groupe formé de deux objets, on vérifie que l'un des deux objets est une cellule unique ; si ce n'est pas le cas, les objets sont classés dans la nouvelle catégorie « cellule non isolée ». De même, si la distance séparant deux objets ne répond pas au critère voulu, les objets sont classés dans cette catégorie. Les objets restants sont candidats à la mesure de vitesse de rotation et classés dans la catégorie « cellules isolées » (Figure II.66).

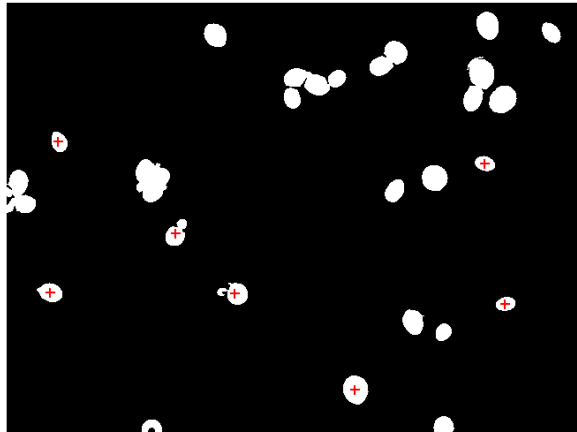


Figure II.66 : Repérage des cellules isolées

Lorsqu'un objet de type « cellule isolée » est repéré dans une nouvelle image, si le déplacement minimum par rapport à chacun des objets de l'image précédente est supérieur à un seuil fixé (rayon moyen d'une cellule), il est considéré comme un nouvel objet. Sinon, il est associé à l'objet qui était le plus proche dans l'image précédente.

Par ce procédé, si un agrégat de cellules venait à se désagréger ou si une cellule s'éloigne suffisamment du bord de l'image, dès lors que les critères sont respectés, les nouvelles cellules isolées peuvent être détectées et prises en compte pour la mesure de vitesse.

2.4. Archivage et exploitation des données

A chaque nouvelle image de la séquence, une mesure de l'orientation est effectuée sur les objets candidats et stockée dans une table (une table par objet). Une table associée à un objet cesse d'être mise à jour :

- lorsqu'un objet présent dans les images précédentes disparaît dans la nouvelle image,
- en fin de traitement, pour un objet conservé jusqu'en bout de séquence.

Les mesures d'orientation ainsi effectuées sur chaque cellule isolée sont archivées et seront prises en compte dans le calcul de la vitesse si l'objet a pu être suivi dans au moins $N/2$ images consécutives d'une séquence comportant N images.

Les cellules non isolées telles que les agrégats, les cellules trop proches des frontières de l'image ou d'une autre cellule ne sont pas considérées pour les mesures de vitesse et donc aucune mesure n'est stockée. Une cellule qui se détacherait d'un agrégat ou s'éloignerait du bord suffisamment pour devenir une cellule isolée est prise en compte, en cours de séquence, pour les mesures de vitesse et la méthode utilisée permet le stockage de ces données (Figure II.67).

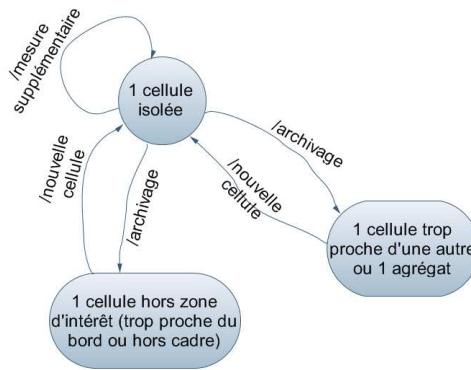


Figure II.67 : Traitement des données : aucune mesure n'est stockée sur les cellules non isolées ; en revanche, toute cellule nouvellement repérée et isolée est prise en compte en cours de séquence

Pour chaque séquence d'images, nous procédons aux traitements suivants :

- à partir des données archivées : calcul de la différence de phase entre 2 images pour chaque cellule,
- correction des résultats obtenus pour tenir compte des sauts de phase de 180° à l'aide d'une fonction modulo (en effet, l'orientation est définie entre -90° et 90°),
- application d'un filtre médian pour lisser les résultats en écartant les points aberrants.

La Figure II.68 donne le résultat du traitement pour la séquence d'images traitées ici.

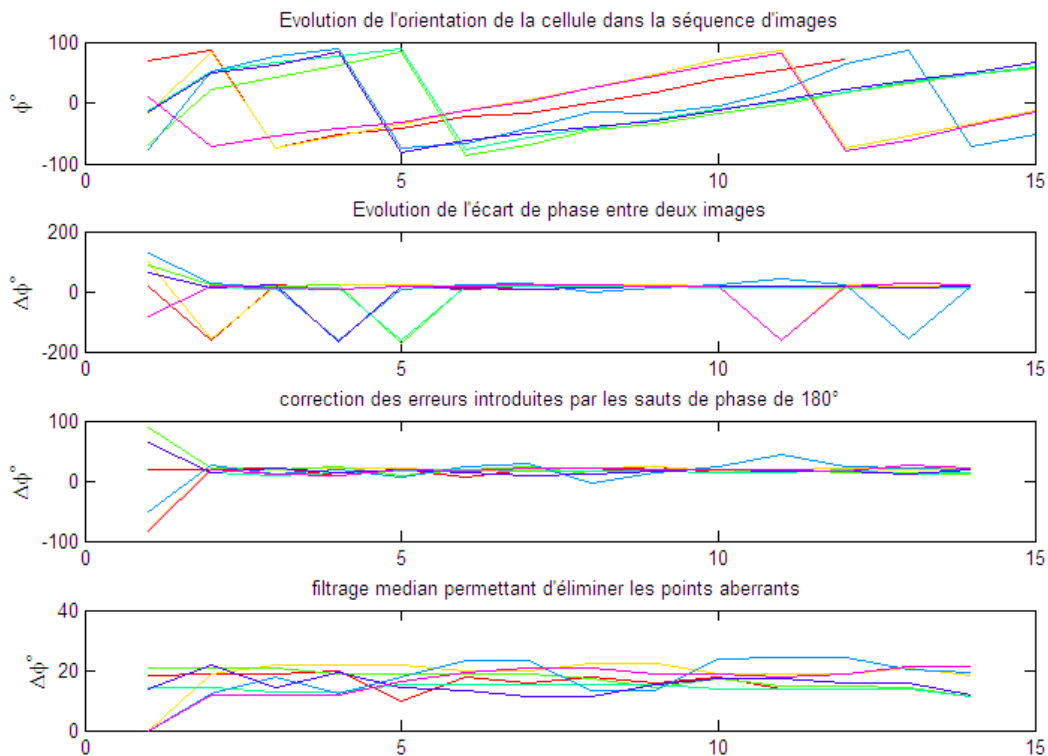


Figure II.68 : Suivi des sept cellules isolées identifiées dans la séquence (c'est-à-dire pour un point de fréquence donné) limitée à 15 images : une couleur par cellule

Nous en déduisons le déphasage moyen entre deux images pour chaque cellule (notée i) suivie dans j images consécutives dont la vitesse de rotation moyenne ressort :

$$\Omega_{moy}(i) = 2\pi \frac{\Delta\Phi_{moy}(i)}{\Delta T} \text{ en rad.s}^{-1} \quad \text{Équation II.18}$$

avec $\Delta\Phi_{moy}(i) = \frac{1}{j-1} \sum_{k=1}^{j-1} [\phi(k+1) - \phi(k)]$ et T l'intervalle de temps entre 2 images consécutives.

La vitesse de rotation pour le point de fréquence considéré correspond à la moyenne des vitesses déterminées pour chacune des n cellules suivies dans la séquence :

$$\Omega_{moy}(f) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Omega_{moy}(i) \quad \text{Équation II.19}$$

A partir de la vitesse de rotation obtenue pour chaque point de fréquence, il est possible de tracer le spectre d'électrorotation (Figure II.69) pour l'expérience considérée (ici des levures en suspension dans de l'eau distillée) ; le chiffre au-dessus de chaque point indique le nombre de cellules pour lesquelles la mesure a été réalisée.

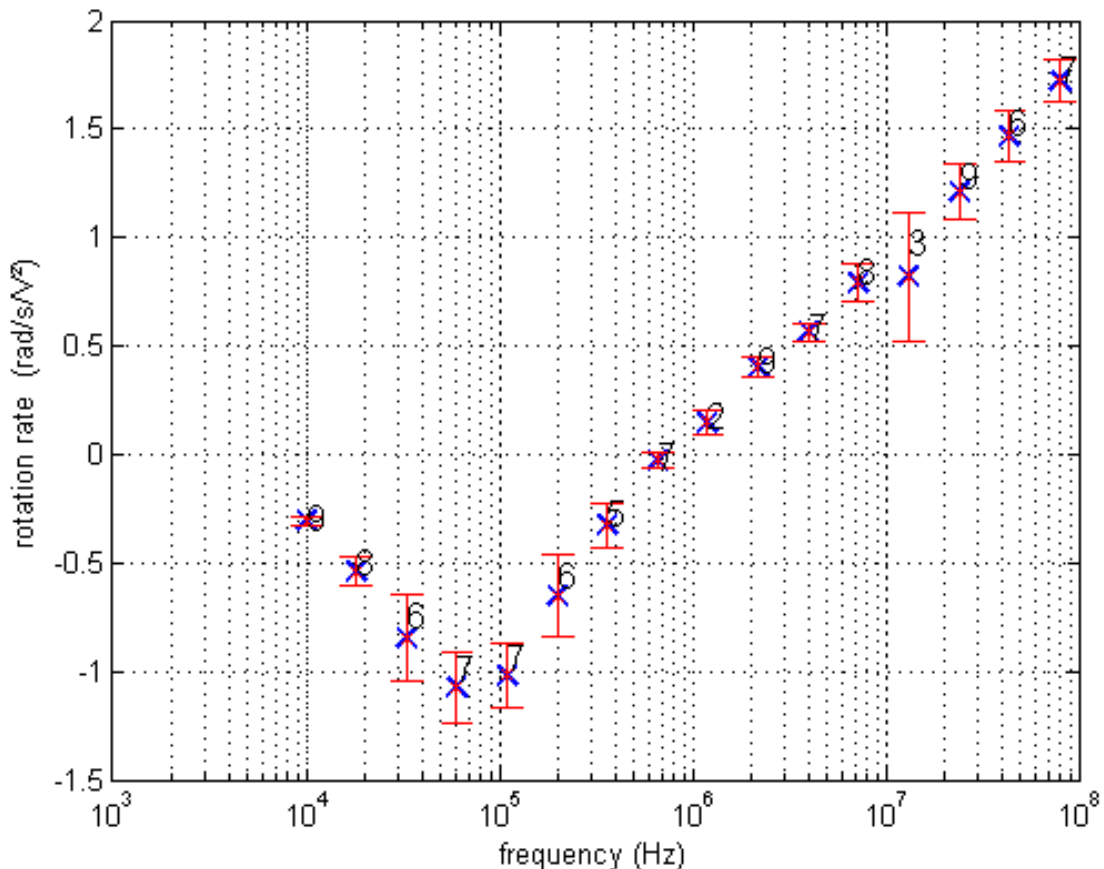


Figure II.69 : Tracé expérimental du spectre d'électrorotation

IV. CONCLUSION

Le dispositif mis en place permet de générer, via une interface graphique développée sous Labview[®], des tensions sinusoïdales en quadrature dans une gamme de fréquences étendue. De plus, un traitement d'images implémenté sous Matlab[®] permet, à partir des acquisitions vidéo réalisées, la mesure de la vitesse de rotation des cellules que nous souhaitons suivre pour chaque point de fréquence. Au final, nous avons mis au point un protocole expérimental couvrant de multiples aspects : de la génération du champ électrique à l'acquisition vidéo en passant évidemment par l'élaboration du milieu d'immersion et la préparation des cellules.

Ainsi, la plateforme expérimentale permet d'étudier le comportement en fréquence de cellules soumises à un champ électrique tournant d'amplitude constante. Nous étudierons dans le chapitre suivant la possibilité d'extraire les propriétés électriques issues des mesures faites par électrorotation.

CHAPITRE III : IDENTIFICATION PARAMETRIQUE

La caractérisation électrique des cellules repose sur l'étude de leur réponse à un champ électrique et sur l'analyse de leur comportement en fonction de leur état physiologique ou des transformations qui ont pu leur être apportées. Un des axes importants est donc l'étude des propriétés électriques basée sur l'identification paramétrique à partir du spectre d'électrorotation obtenu par la méthode décrite au chapitre précédent.

De nombreuses techniques de caractérisation ont vu le jour à partir des différents modèles mathématiques de cellules en exploitant la mesure :

- de la fréquence caractéristique (fréquence pour laquelle $\text{Re}(K(\omega)) = 0$) lorsque la conductivité du milieu varie : une méthode permet de déduire les propriétés électriques de la membrane (*cf.* équation I.13 aussi décrite dans les articles [43, 161, 162])
- du spectre d'électrorotation, donc de la vitesse de rotation en fonction de la fréquence, [124, 141, 158] : il est possible d'évaluer les paramètres électriques de la cellule à travers l'utilisation de méthodes de minimisation faisant coïncider le spectre théorique avec l'expérimental.

Il est intéressant d'analyser la sensibilité du spectre aux différentes propriétés électriques de la cellule. En effet, nous avons déjà vu en 1^{ère} approche (chapitre I partie I.2.3.), que les propriétés électriques de la membrane prédominent en basse fréquence tandis que celles du cytoplasme prévalent à plus haute fréquence. Les travaux suivants exploitent les méthodes d'optimisation proposées par D. Voyer [163].

I. CARACTERISATION

Afin d'extraire les paramètres électriques d'une cellule représentée par un modèle deux couches, l'approche considérée est basée sur des méthodes d'identification par minimisation de l'erreur entre spectre théorique et pratique. D'abord, nous analyserons l'influence des paramètres à extraire sur toute la gamme de fréquence balayée par une étude de sensibilité. Ensuite, nous présenterons les méthodes employées permettant l'extraction de ceux-ci : elles sont basées sur des spectres d'électrorotation théoriques ce qui nous permet d'analyser l'efficacité des optimisations proposées.

1. Méthodes appliquées au modèle à deux couches

A partir de l'expression de la vitesse de rotation en fonction de la fréquence du champ appliqué (Equation I.17), il est possible d'extraire les paramètres de la cellule en utilisant des algorithmes de minimisation ou de type « moindres carrés ». Afin d'obtenir un résultat fiable, le spectre est analysé dans son ensemble. Ainsi, la fonction à minimiser pour permettre l'extraction des paramètres précédemment listés est la suivante :

$$\sum_{i=1}^N [\Omega_{\text{exp}}(\omega_i) - \Omega_{\text{sim}}(\omega_i)]^2 \quad \text{Équation III.20}$$

avec Ω_{exp} et Ω_{sim} les vitesses de rotation expérimentales et théoriques aux différents points de fréquence de la gamme balayée.

Pour la plupart des cellules, l'épaisseur de la membrane est négligeable devant le rayon de la cellule ($d/R \ll 1$). Après un développement limité d'ordre 1, l'Équation I.1 devient [164] :

$$\varepsilon_p^* = \varepsilon_{\text{mem}}^* \frac{R\varepsilon_i^*}{R\varepsilon_{\text{mem}}^* + d\varepsilon_i^*} \quad \text{Équation III.21}$$

Les cinq paramètres que l'on cherche à extraire sont le facteur $\xi = \frac{\varepsilon_m E^2}{2\eta}$ et les propriétés électriques du cytoplasme (conductivité : σ_i (en S.m^{-1}) et permittivité relative : $\varepsilon_{i,r}$) et de la membrane : capacitance : C_{mem} et conductance : G_{mem} qui sont respectivement définies par :

$$C_{\text{mem}} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{\text{mem}}}{d} (\text{en } F.m^{-2}) \quad \text{Équation III.22}$$

$$G_{\text{mem}} = \frac{\sigma_{\text{mem}}}{d} (\text{en } S.m^{-2}) \quad \text{Équation III.23}$$

Dans ce qui suit, nous présentons les résultats issus d'études théoriques permettant de mettre en évidence la possibilité d'apporter des améliorations aux procédures d'extraction paramétrique habituellement employées. Dans ces études, certains paramètres ont été fixés dans un 1^{er} temps à des valeurs couramment rencontrés dans la littérature. Ainsi, le milieu d'immersion des cellules possède une permittivité relative $\varepsilon_{m,r}$ de 80 et sa conductivité σ_m est choisie égale à 50 mS.m^{-1} . Le rayon total de la cellule ($R + d$) est de $15 \mu\text{m}$. Par la suite, nous étudierons également l'influence d'une modification de σ_m et de R .

Comme vu dans la littérature [165], les paramètres à extraire peuvent varier suivant une loi uniforme dans tout l'intervalle donné de valeurs ; dans le cadre de nos simulations, les plages de variations sont :

- $C_{mem} \in [20;30] \text{ mF.m}^{-2}$ et $G_{mem} \in [0,8;1] \times 10^3 \text{ S.m}^{-2}$
- $\varepsilon_{i,r} \in [60;140]$ et $\sigma_i \in [0,6;0,9] \text{ S.m}^{-1}$
- $\xi \in [30;50] \text{ rad .s}^{-1}$

Gascoyne *et al.* ont étudié l'influence des conditions expérimentales sur la précision des paramètres extraits des mesures d'électrorotation [126]. Il s'avère que le résultat de la procédure d'extraction est parfois loin des attentes dans le cadre d'expérimentations : par exemple, le pourcentage des valeurs de la capacitance membranaire C_m estimé (appelé « niveau de confiance ») avec une erreur relative inférieure à 10 % (appelée « limite de confiance ») n'atteint pas 40 %. Cette étude repose sur une analyse théorique d'ensemble (les paramètres sont extraits simultanément) afin de connaître les niveaux fiables pour les paramètres issus des expériences. Ainsi, Gascoyne et ses collaborateurs concluent que la fiabilité de l'extraction de la conductance membranaire G_{mem} est mauvaise. Ils proposent, lors de l'utilisation de la méthode des moindres carrés, de sacrifier ce paramètre en utilisant un milieu de plus grande conductivité afin de minimiser la sensibilité du spectre à G_{mem} .

La procédure de minimisation est basée sur la méthode simplex d'optimisation de Nelder-Mead qui permet de trouver un minimum local d'une fonction de plusieurs variables [166]. Cette méthode est souvent utilisée pour minimiser la fonction donnée dans l'équation III.21.

1.1. Considérations par rapport au spectre

Afin d'étudier la dispersion du spectre, on introduit la variable aléatoire $\Omega_i = \Omega(f_i)$ correspondant à la vitesse de rotation pour chaque point de fréquence noté i , dont on peut obtenir la valeur moyenne et la variance par tirages au sort successifs via la méthode de Krige [167]. La Figure III.70 représente la dispersion du spectre d'électrorotation quand les paramètres varient dans leurs intervalles bornés ; on constate que cette dispersion des valeurs du spectre dépend de la fréquence. Le spectre médian présente deux pics de fréquence qui correspondent aux pics de résonance (basse et haute fréquences) et sont totalement découplés. La dispersion est maximale autour des pics et son importance est équivalente pour les deux pics. Par ailleurs, ceux-ci interviennent toujours à la même fréquence lorsque les paramètres de la cellule qui sont à extraire varient dans leurs intervalles bornés sachant que les propriétés du milieu sont fixées. La

1^{ère} résonance qui intervient en basse fréquence dépend des propriétés de la membrane, la 2^{nde} correspond à celles du cytoplasme (étude faite au 1^{er} chapitre partie I.2.3.).

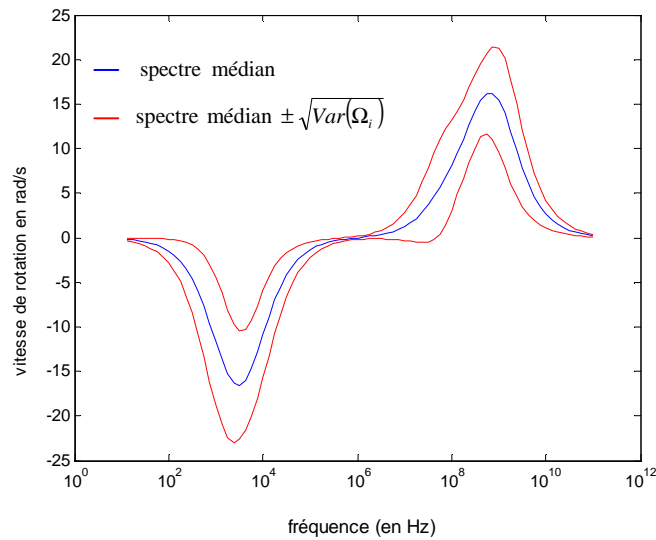


Figure III.70 : Spectre d'électrorotation : spectre médian et sa dispersion

1.2. Analyse de sensibilités à partir de la variance

Afin d'évaluer le poids attribuable à chaque paramètre impliqué, une étude de la sensibilité du spectre à chaque paramètre est réalisée. L'analyse de la variance permet donc d'évaluer la contribution de chaque paramètre à la dispersion du spectre. Ainsi, la répartition de la dispersion du spectre pourra être connue en fonction du poids des différents paramètres afin d'accorder plus d'importance aux plages de fréquences concernées. Cette analyse est aussi exploitable dans les étapes d'identification paramétrique : l'impact de chaque paramètre sur le spectre en fonction de la fréquence est pris en compte avec un coefficient approprié qui dépend de la fréquence.

Une approche globale permet de définir la répartition des variances (partielle et totale) de la grandeur de sortie en fonction des cinq paramètres à extraire. En effet, le théorème de la variance montre que celle-ci peut être décomposée en plusieurs termes (de variance partielle) représentant les influences respectives des différents paramètres ce qui permet de découpler leurs effets [168]. L'effet total imputé à un paramètre est défini comme la somme des variances partielles impliquant ce terme. L'Annexe IV présente les équations de la variance partielle et de l'effet total.

Ainsi, la variance partielle et l'effet total relatifs à un paramètre X sont définis respectivement par (calcul en pourcentage) :

$$P_{\text{var}}(\Omega_i | X) = 100 \times \frac{\text{Var}(\Omega_i | X)}{\text{Var}(\Omega_i)} \quad \text{Équation III.24}$$

$$T_{\text{var}}(\Omega_i | X) = 100 \times \frac{\text{Tot}(\Omega_i | X)}{\text{Var}(\Omega_i)} \quad \text{Équation III.25}$$

La dépendance de la vitesse de rotation à chacune des propriétés électriques du cytoplasme (σ_i et $\epsilon_{i,r}$, indépendamment l'un de l'autre) est illustrée Figure III.71. Ainsi, les propriétés électriques du cytoplasme ont bien un impact pour une gamme de fréquence supérieure à 1 MHz. De même, les propriétés électriques de la membrane interviennent bien en-dessous de 1 MHz (Figure III.72) ; la sensibilité du spectre à la conductance montre bien la difficulté à extraire ce paramètre en particulier.

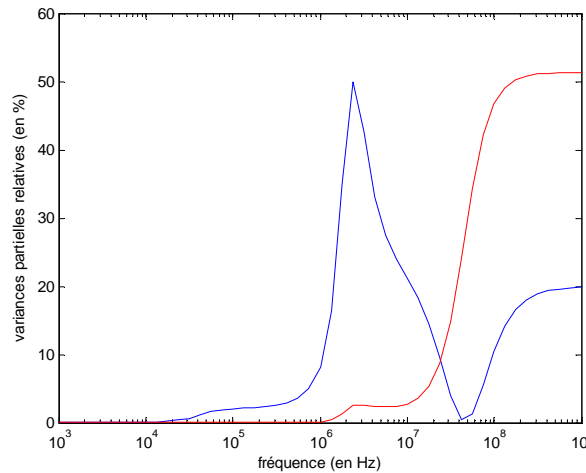


Figure III.71 : Variances partielles relatives aux propriétés électriques du cytoplasme (en bleu, celle due à la conductivité et en rouge, à la permittivité)

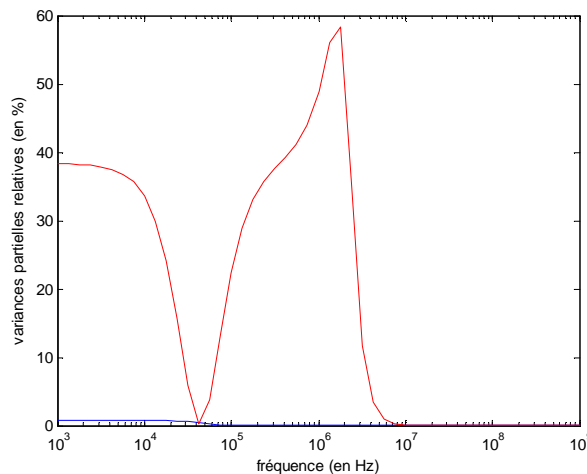


Figure III.72 : Variances partielles relatives aux propriétés électriques de la membrane (en bleu, celle due à la conductance et en rouge, à la capacitance)

Afin d'évaluer l'efficacité de la fonction minimisée, nous réalisons une étude théorique portant sur des spectres numériques. Ainsi, la fonction considérée à minimiser est la quantité globale (notée Y) définie par :

$$Y = \sum_i (\Omega_i - E(\Omega_i))^2 \quad \text{Équation III.26}$$

avec $E(\Omega_i)$ la valeur moyenne de la vitesse de rotation au point de fréquence considéré.

La contribution des paramètres à la dispersion de Y est évaluée d'après les équations III.24 et III.25 (Tableau III.5) ; X correspond au paramètre sur lequel l'analyse est effectuée. Le paramètre ξ a un effet prépondérant par rapport aux autres qui ont globalement une variance partielle inférieure à 5 % et un effet total inférieur à 10 % sauf pour $\varepsilon_{i,r}$. En effet, la vitesse de rotation est proportionnelle à ξ ce qui montre l'intérêt de conserver un champ constant dans la zone où le mouvement des cellules est observé expérimentalement.

X	$P_{\text{var}}(Y x)$ en %	$T_{\text{var}}(Y x)$ en %
σ_i	0,4	8,1
$\varepsilon_{i,r}$	4,4	25,6
G_{mem}	0,0	0,6
C_{mem}	1,5*	1,7
ξ	66,4	91,3

Tableau III.5 : Analyse de la variance de Y

Avec l'analyse de variance, il apparaît que les paramètres ont des poids différents suivant la fréquence. L'idée que nous avons développée est que la pondération du spectre par des coefficients judicieusement choisis pourrait augmenter la sensibilité par rapport à un paramètre et ainsi maximiser l'influence d'un paramètre lors de son extraction qui en serait améliorée. Dans cet objectif, il est intéressant de reconsidérer le problème non pas sur l'étude du spectre en entier mais en le pondérant par des poids appropriés dépendant de la fréquence. Cette approche présente un fort intérêt ; en effet, nous avons vu que l'influence des propriétés de la membrane et celles du cytoplasme n'intervenaient pas dans les mêmes gammes de fréquence.

1.3. Pondération

Il est donc utile de pondérer Y par un coefficient qui dépendra de la fréquence afin de focaliser le calcul dans une gamme de fréquence où un paramètre est significatif, ainsi, nous définissons la formulation suivante :

$$Y_{\text{pond}} = \sum_i \alpha_i (\Omega_i - E(\Omega_i))^2 \quad \text{Équation III.27}$$

D'après les résultats (Tableau III.5), le choix préliminaire du coefficient $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | X)$ qui mesure la dispersion du spectre due au paramètre X paraît intéressant. Par ce procédé, il est difficile d'estimer simultanément tous les paramètres. En le reconsidérant et en essayant d'extraire les paramètres en plusieurs étapes, il est possible d'appliquer cette procédure de minimisation aux différents paramètres à partir des contributions de chacun d'entre eux. Ainsi, l'analyse de la variance effectuée pour $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | X)$ avec $X \in \{\sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{\text{mem}}, C_{\text{mem}}, \xi\}$ pourra être utilisée et optimisée.

Le Tableau III.6 résume l'ensemble des résultats ainsi obtenus. Il s'avère que le coefficient $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | \xi)$ est un mauvais candidat ; en effet, le facteur ξ présente pour ce coefficient la variance partielle la plus importante (81 %) et l'effet total de $\varepsilon_{i,r}$ (12,5 %) montre l'existence d'une interaction entre les paramètres ξ et $\varepsilon_{i,r}$.

		$\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i X)$					
		X	σ_i	$\varepsilon_{i,r}$	G_{mem}	C_{mem}	ξ
$P_{\text{var}}(Y_{\text{pond}} X)$ en %	σ_i		1,6	0,8	0,0	0,2	0,2
	$\varepsilon_{i,r}$		14,0	14,7	0,0	0,0	1,9
	G_{mem}		0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
	C_{mem}		0,1	0,0	3,3	11,4*	1,6
	ξ		21,4	12,6	56,1	79,7	81,0
$T_{\text{var}}(Y_{\text{pond}} X)$ en %	σ_i		19,6	20,1	1,7	5,9	4,3
	$\varepsilon_{i,r}$		71,2	79,1	0,0	0,0	12,5
	G_{mem}		0,0	0,0	2,6	1,8	0,9
	C_{mem}		0,6	0,0	40,2	13,6	1,8
	ξ		72,7	73,5	96,1	87,3	95,6

Tableau III.6 : Analyse de la variance de Y_{pond} quand $\{\sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{\text{mem}}, C_{\text{mem}}, \xi\}$ sont inconnus

En comparant le Tableau III.6 avec le Tableau III.5, il s'avère que la variance partielle imputée à C_{mem} (cas où $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | C_{\text{mem}})$ repéré par le symbole « * ») est multiplié par environ 10 entre Y et Y_{pond} ; l'influence de tous les autres paramètres diminuent bien que celle de ξ demeure importante. Ce candidat est donc exploitable puisque les variances partielles dues à C_{mem} et à ξ sont respectivement de 11,4 % et 79,7 %. L'effet total couplé avec σ_i est de 5,9 % : afin de l'annuler, une solution consiste à choisir le coefficient $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | C_{\text{mem}}) / P_{\text{var}}(\Omega_i | \sigma_i)$.

En réalité, plusieurs choix guidés par le but d'annuler des effets sont possibles et amènent, au final, à des résultats analogues et à une procédure identique présentée ci-après. Il est ainsi possible de choisir le coefficient $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | C_{\text{mem}}) / P_{\text{var}}(\Omega_i | \sigma_i)$ comme nous l'avons auparavant présenté ou encore $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | \xi) / [P_{\text{var}}(\Omega_i | \sigma_i) \times P_{\text{var}}(\Omega_i | \varepsilon_i)]$ qui permet d'annuler l'effet total couplé de ξ avec σ_i et ε_i .

Quelles que soient les valeurs des autres paramètres, C_{mem} et ξ sont les premiers paramètres qu'il est possible d'estimer. En effet, les poids de la variance partielle et de l'effet total dus aux paramètres σ_i , $\varepsilon_{i,r}$ et G_{mem} sont inférieurs à 3%. Ainsi, lorsque les valeurs de C_{mem} et ξ sont auront été identifiées, les inconnues restantes seront alors σ_i , $\varepsilon_{i,r}$ et G_{mem} .

En reprenant l'étude pour $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | X)$ avec $X \in \{\sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{\text{mem}}\}$, il s'avère que l'effet total de G_{mem} est nul pour $\alpha_i = P_{\text{var}}(\Omega_i | \varepsilon_{i,r})$. Ainsi, l'estimation de σ_i et $\varepsilon_{i,r}$ est réalisable indépendamment de la valeur de G_{mem} . Il est enfin possible de déterminer G_{mem} à partir du spectre initial puisque tous les autres paramètres sont alors connus.

Les étapes successives exposées ci-avant au regard des variances dans lesquelles les paramètres sont impliqués est une procédure de minimisation qui permet, par des choix appropriés, de quantifier chaque paramètre et donc de caractériser la cellule d'après son spectre.

L'efficacité de l'approche proposée a été évaluée pour chaque paramètre à partir de l'élaboration de 200 échantillons de spectres numériques (Figure III.73).

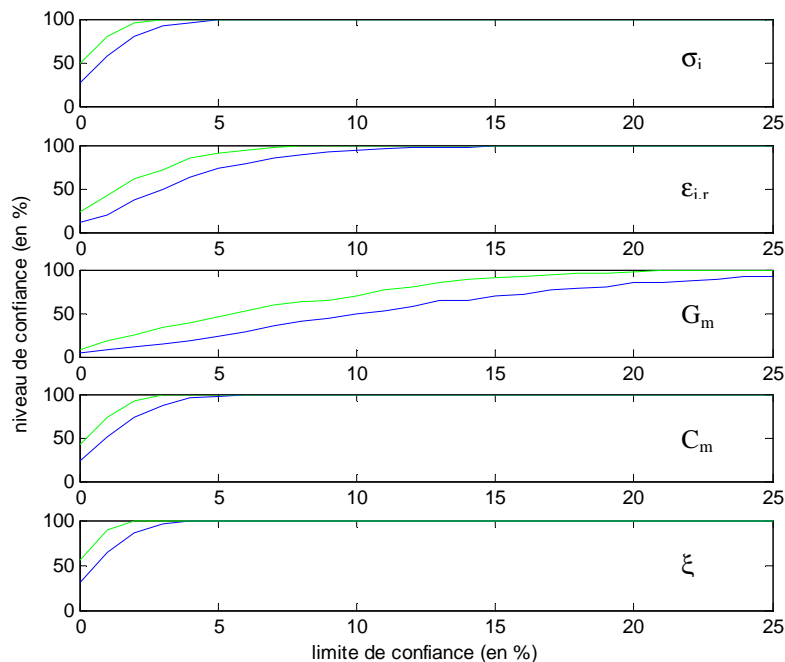


Figure III.73 : Résultats obtenus avec la méthode de minimisation non pondérée (bleu) et avec pondération (vert)

L'apport de la pondération se voit à travers la limite de confiance ; en effet, celle-ci est :

- ≈ 2 fois inférieure à celle obtenue sans pondération pour les valeurs de $\varepsilon_{i,r}$ estimées,
- équivalente et plus petite que 5 % pour σ_i, C_{mem} et ξ
- et pour G_{mem} , les valeurs estimées pour tous les échantillons sont atteintes pour un indice de confiance de 20 % contrairement à la méthode sans pondération.

La procédure de minimisation par pondération est plus précise et l'apport pour l'extraction des paramètres n'est donc pas négligeable.

1.4. Optimisation

Les résultats obtenus précédemment peuvent être améliorés en utilisant un outil mathématique plus approprié pour exécuter la minimisation. En effet, il est possible d'optimiser la méthode de Nelder-Mead avec de légères modifications. Cette méthode est très utilisée car elle est robuste, il s'agit d'une méthode d'ordre zéro qui présente donc l'avantage d'être rapide. Elle est locale et basée sur la comparaison des valeurs de la fonction aux $(n+1)$ sommets d'un simplexe, n étant le nombre de variables dont dépend la fonction à minimiser. Le minimum est cherché en modifiant le simplexe à travers des opérations (réflexion avec ou sans expansion, contraction). Un inconvénient est que cette technique s'applique à des problèmes dont les variables ne sont pas bornées d'où le risque de converger vers un minimum local sortant du domaine de variation des paramètres. Afin de prendre en compte les bornes de notre problème, nous utilisons une substitution de variable : la variable $X \in [X_{min}, X_{max}]$ peut être remplacée par la variable $\zeta \in]-\infty, +\infty[$ comme suit :

$$X(\zeta) = \frac{X_{max} + X_{min}}{2} + \frac{\zeta}{\sqrt{1 + \zeta^2}} \times \frac{X_{max} - X_{min}}{2} \quad \text{Équation III.28}$$

Cette substitution permet de changer un domaine contraint en un domaine qui ne l'est pas. Plus généralement, elle permet de changer un problème de minimisation libre en un problème de minimisation contraint. Ainsi, elle est appliquée aux deux méthodes de minimisation précédemment comparées. La procédure utilisée par Gascoyne [126] est appelée par la suite minimisation non pondérée et non contrainte, la procédure proposée précédemment est appelée minimisation pondérée et non contrainte. En utilisant la substitution, la première est alors nommée minimisation non pondérée et contrainte tandis que la seconde est nommée minimisation pondérée et contrainte. Les résultats sont présentés ci-après dans la Figure III.74.

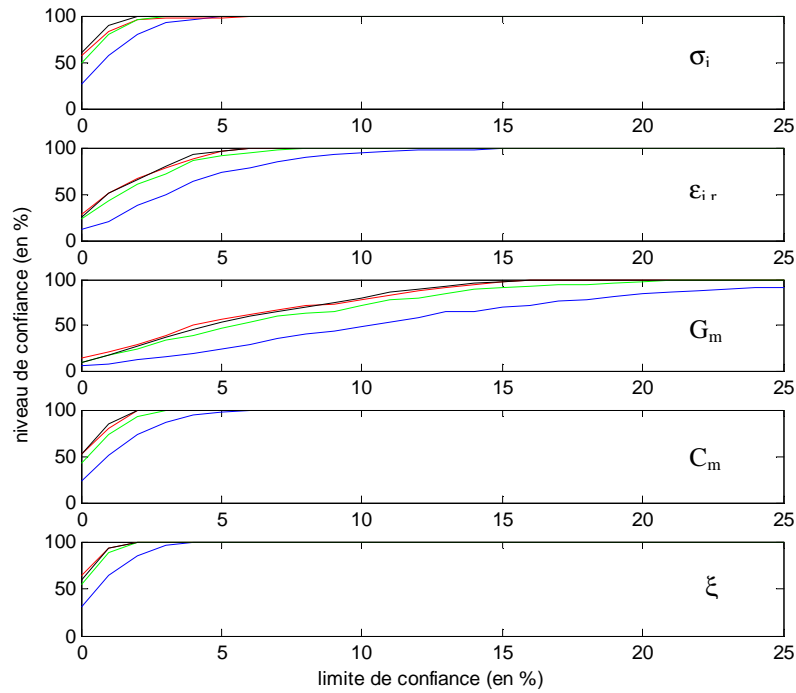


Figure III.74 : Résultats obtenus avec la minimisation ni pondérée ni contrainte (en bleu), pondérée et non contrainte (en vert), non pondérée et contrainte (en rouge) et pondérée et contrainte (en noir)

La substitution de variables apporte une meilleure précision des résultats dans les deux cas même si la technique de minimisation qui combine les deux améliorations (pondération et mise sous contrainte) donne des résultats équivalents à la méthode de minimisation non pondérée et contrainte.

La distance normalisée entre les spectres expérimentaux et ceux simulés est définie par $\sum_i [\Omega_{\text{exp}}(\omega_i) - \Omega_{\text{sim}}(\omega_i)]^2 / \sum_i [\Omega_{\text{exp}}(\omega_i)]^2$. En analysant cette distance, il apparaît que la distance atteinte, en utilisant la méthode de minimisation contrainte, est souvent inférieure quand le spectre est pondéré : la procédure de minimisation qui allie les améliorations proposées : pondération et substitution est meilleure mais n'implique pas que l'erreur sur l'identification de paramètres soit systématiquement et significativement réduite.

En conséquence, l'identification paramétrique habituellement utilisée peut donc être considérablement améliorée par :

- la réduction des interactions entre paramètres recherchés en appliquant des poids appropriés au spectre d'électrorotation : la pondération,
- la prise en compte des bornes des paramètres recherchés en combinant une simple opération mathématique appropriée avec la méthode de minimisation de Nelder-Mead : la substitution de variable.

Les résultats pour l'analyse de variance, la pondération et les diverses méthodes d'optimisation proposées ne sont pas influencés par l'approximation portant sur la permittivité équivalente de la cellule lorsque celle-ci est modélisée par un modèle monocouche dont l'épaisseur de la membrane est négligée (équation III.20).

2. Modèle à trois couches

Bien que les cellules soient des structures hétérogènes, un modèle à 2 couches (Figure I.11) est souvent utilisé pour leur caractérisation électrique [41]. Cependant, pour certaines cellules comme les levures (comportant une paroi en plus de leur membrane), un modèle à trois couches semble plus réaliste (Figure I.40).

Nous nous intéressons aux méthodes de minimisation n'utilisant pas la procédure de pondération malgré l'intérêt de l'analyse de variances ; en effet, dans le cadre d'un problème à 7 inconnues la méthode serait plus conséquente. L'équation I.15 qui consiste à considérer le modèle de la cellule à trois couches est ici utilisée.

Les plages de variations des paramètres recherchés sont (nous avons répertorié des données d'après les références suivantes : [122, 124, 136, 159]) :

- $C_{mem} \in [6;9] \text{ mF} \cdot \text{m}^{-2}$ et $G_{mem} \in [0,5;1] \text{ kS} \cdot \text{m}^{-2}$
- $\varepsilon_{i,r} \in [20;80]$ et $\sigma_i \in [0,9;1,5] \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$
- $\xi \in [1;5] \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\varepsilon_{i,w} \in [50;70]$ et $\sigma_i \in [1,6;3,6] \times 10^{-2} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$

Les données fixes du problème sont :

- $\varepsilon_{m,r} = 80$ et $\sigma_m = 50 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$
- $R = 3 \text{ } \mu\text{m}$,
- épaisseurs : $d = 8 \text{ nm}$ (membrane) et $e = 200 \text{ nm}$ (la paroi)

Les résultats obtenus pour les différents paramètres sont donnés sur la Figure III.75. Contraindre la minimisation donne un résultat meilleur et plus rapide pour la conductance membranaire qui est toujours le paramètre le plus difficile à obtenir. Les paramètres électriques de la paroi sont atteints pour une limite de confiance de 15 % dans le meilleur des cas. Ainsi, il est possible d'extraire les 7 paramètres mais il serait intéressant de développer la méthode de pondération dans le cadre de ces minimisations. En effet, l'influence du cytoplasme est clairement identifiée en haute fréquence pour la seconde partie du spectre mais l'ajout d'une couche autour de la membrane ne permet pas d'identifier clairement la contribution de celle-ci au

spectre étant donné que celui-ci comporte un seul pic de résonance pour la 1^{ère} partie du spectre qui correspond aux basses fréquences.

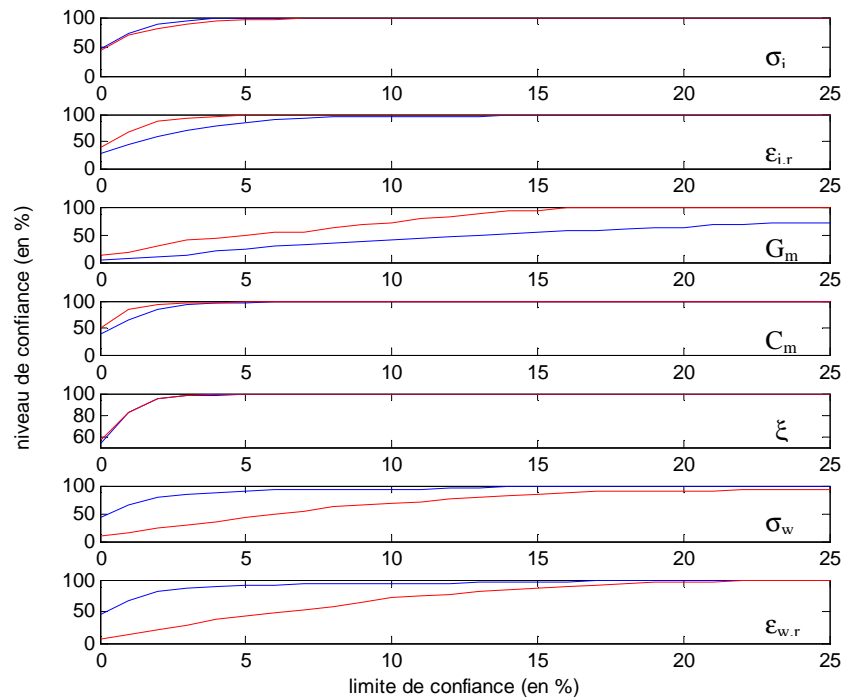


Figure III.75 : Résultats obtenus avec la méthode de minimisation contrainte (en rouge) ou non (en bleu)

II. SENSIBILITE

Après l'étude portant sur la comparaison de différentes approches permettant l'extraction des paramètres cellulaires pour un modèle 2 couches, nous évaluons l'influence de différents éléments à prendre en compte, tels que les plages de variation de paramètres à extraire, la conductivité du milieu d'immersion des cellules et la taille de celles-ci.

1. Influence du choix des plages de variations des paramètres

Les plages, dans lesquelles les paramètres recherchés varient, ont une influence sur la rapidité, la limite de confiance de la démarche d'identification paramétrique. Par ailleurs, la méthode d'optimisation pour l'identification la plus appropriée peut différer d'un paramètre à l'autre. Ainsi, à partir des valeurs moyennes précédemment obtenues, les plages des données étudiées correspondent à une bande de $\pm 10\%$ (Figure III.76) et $\pm 30\%$ (Figure III.77).

Pour une largeur de $\pm 10\%$, il apparaît que la méthode de minimisation pondérée et contrainte est la meilleure pour tous les paramètres et la seconde méthode est celle de la minimisation pondérée et non contrainte. La limite de confiance pour tous les paramètres est inférieure à 5% excepté pour la conductance membranaire ($< 20\%$).

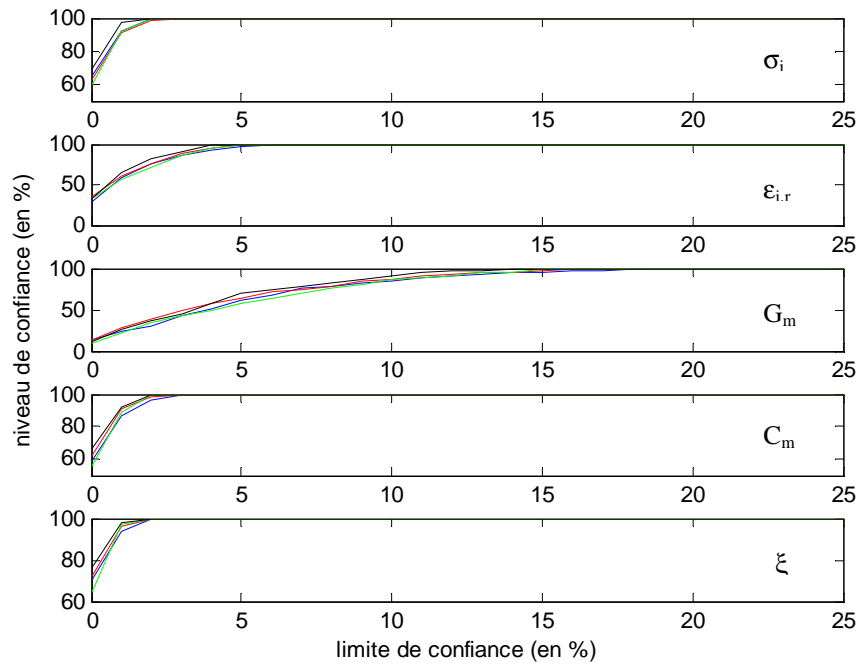


Figure III.76 : Minimisation ni pondérée ni contrainte (en bleu), pondérée et non contrainte (en vert), non pondérée et contrainte (en rouge) et pondérée et contrainte (en noir) pour une largeur de bande de $\pm 10 \%$

Pour une largeur de $\pm 30 \%$, la pondération apporte une meilleure efficacité, similaire dans les cas avec ou sans contrainte. Il en ressort que la substitution de variables donne de moins bons résultats pour l'ensemble des paramètres que pour une largeur de bande $\pm 10 \%$. La limite de confiance pour $\{\sigma_i, C_{mem}, \xi\}$ est inférieure à 10% , pour $\varepsilon_{i,r}$ elle avoisine les 20% tandis que pour G_{mem} , elle est supérieure à 25% (le niveau de confiance est $\approx 75 \%$ pour cette limite).

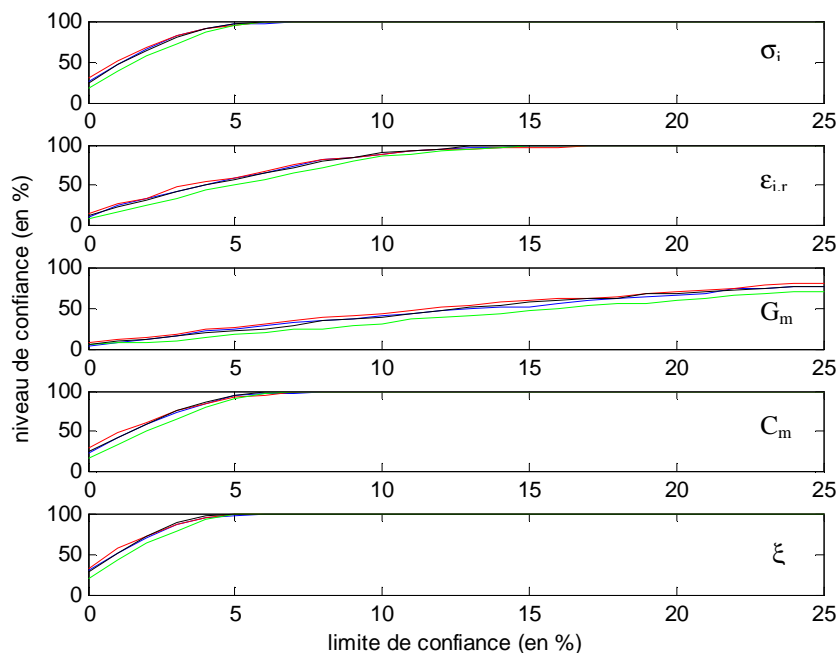


Figure III.77 : Minimisation ni pondérée ni contrainte (en bleu), pondérée et non contrainte (en vert), non pondérée et contrainte (en rouge) et pondérée et contrainte (en noir) pour une bande de $\pm 30 \%$

La sensibilité du spectre à $\{\sigma_i, C_{mem}, \xi\}$ indique que ces paramètres seront les plus faciles à extraire. Quant aux résultats obtenus pour G_{mem} , ils montrent bien la difficulté à extraire ce paramètre en particulier. Les paramètres ont un impact différent dans des plages de fréquences différentes du spectre, ainsi, une identification paramétrique en plusieurs étapes comme l'analyse de variance montre bien que la minimisation par pondération est optimale.

2. Effet de la conductivité du milieu de suspension

D'après l'analyse de variances, il apparaît une modification en faisant varier la conductivité du milieu (σ_m), condition que nous pouvons en effet ajuster pour nos expériences (par exemple, via ajout de KCl) (Figure III.78). En augmentant σ_m , dans les limites des conditions expérimentales possibles, l'identification paramétrique des propriétés membranaires est plus précise. En effet, l'impact du pic devient plus important par rapport au spectre d'électrorotation pris dans son ensemble. Comme vu Figure I.42, σ_m intervient sur le pic de basse fréquence sur lequel influent considérablement les propriétés membranaires.

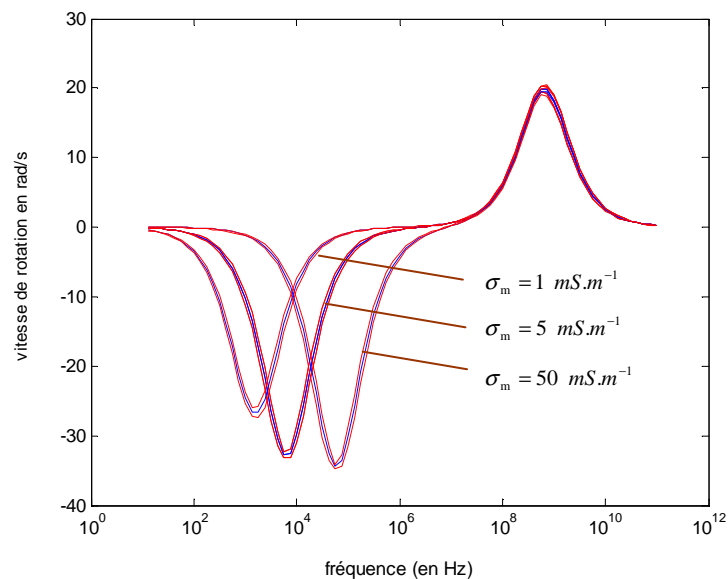


Figure III.78 : Influence de la conductivité du milieu d'immersion

En basse fréquence, la conductivité du milieu est un paramètre important : $\frac{\omega \epsilon_m}{\sigma_m} \ll 1$ ce

qui implique pour le facteur de Clausius-Mossotti : Equation I.10 $\Rightarrow \frac{\epsilon_p^* + j \frac{\sigma_m}{\omega}}{\epsilon_p^* - 2j \frac{\sigma_m}{\omega}}$ [116].

3. Sensibilités selon la taille de la cellule

A présent, nous conservons les plages de variation initiales (données partie I.1.1.), seul le rayon de la cellule est divisé par 3, pour être fixé à 5 μm (cas de nombreuses cellules eucaryotes). En comparant les analyses de variance initiales (Tableau III.5 et Tableau III.7), il s'avère que :

- les variances partielles de $\{C_{mem}, \xi\}$ augmentent légèrement,
- les variances partielles de $\{\sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}\}$ diminuent légèrement,
- les propriétés électriques du cytoplasme ont un effet total moindre contrairement à celles de la membrane.

X	$P_{\text{var}}(Y x)$ en %	$T_{\text{var}}(Y x)$ en %
σ_i	0,3	7,5
$\varepsilon_{i,r}$	3,8	21,3
G_{mem}	0,0	0,1
C_{mem}	1,8	2,0
ξ	71,0	92,1

Tableau III.7 : Analyse de la variance de Y pour un rayon de cellule de 5 μm

On peut voir une influence de la taille de la cellule sur le spectre d'électrorotation dans son ensemble (Figure III.79) : l'amplitude des pics reste similaire malgré une modification de leur position (même si les gammes de fréquence considérée restent quasi-inchangées). Cela pourrait expliquer les faibles différences au niveau de l'extraction des paramètres.

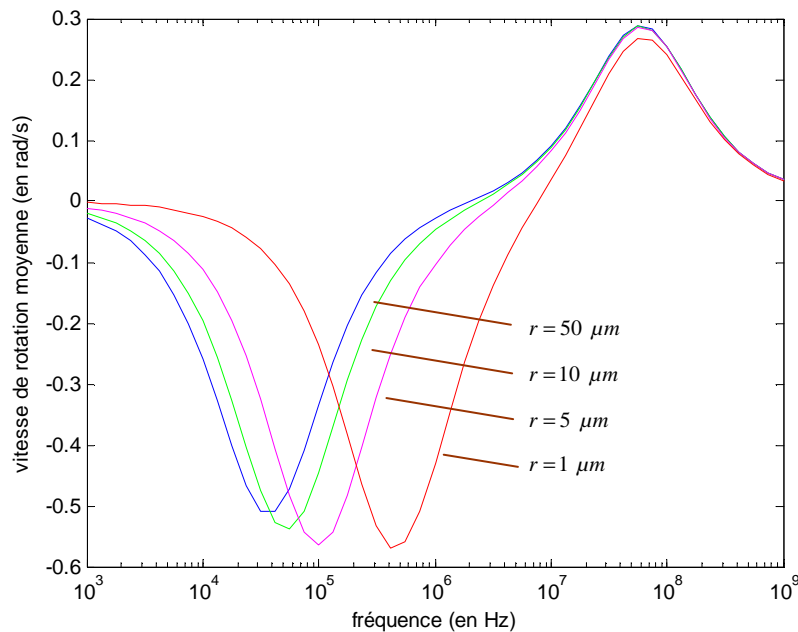


Figure III.79 : Simulation de spectres pour des cellules de rayon 1, 5, 10 et 15 μm

Par ailleurs, nous avons vérifié que la taille des cellules n'influence que très sensiblement l'efficacité des quatre méthodes de minimisation.

III. CONCLUSION

L'analyse de variance est un support pour les méthodes de minimisation ; en effet, grâce à cette approche, il est possible de déterminer les différents poids à appliquer au spectre au regard des variances partielles de chaque paramètre et des effets totaux dus aux interactions entre eux. Par ailleurs, elle permet aussi de visualiser l'impact des propriétés des différentes couches sur le spectre et donc de définir la gamme de fréquence où ceux-ci prédominent.

Les méthodes d'optimisation par minimisation proposées permettent d'améliorer considérablement les méthodes d'identification paramétrique habituellement utilisées, en particulier pour l'extraction de la conductance membranaire, paramètre le plus complexe à extraire. Ainsi, il apparaît en 1^{er} lieu que la pondération du spectre d'électrorotation par choix de coefficients appropriés dépendant de la fréquence permet de réduire les interactions entre paramètres recherchés. En 2nd lieu, la contrainte (les paramètres sont alors bornés via une substitution de variables) des méthodes (pondérée ou non) permet d'améliorer la procédure de minimisation sans pour autant améliorer nécessairement et significativement l'erreur sur les résultats obtenus.

La prise en compte des bornes est une étape pour laquelle nous devons apporter une attention particulière suivant le paramètre. En effet, une gamme de variation trop importante peut entraîner une incertitude sur le résultat obtenu (en particulier, pour la conductance membranaire). D'autre part, un choix approprié permet d'avoir une méthode de minimisation plus rapide. Répertorier les données de la littérature, comme nous l'avons fait, est donc nécessaire.

La distance entre électrodes du microsysteme n'a pas d'influence, le choix est donc laissé à l'utilisateur en fonction du champ électrique qu'il souhaite appliquer aux cellules, et de la taille des cellules, tout en garantissant un minimum d'interactions possibles entre celles-ci [152].

Le choix de la conductivité du milieu a son importance dans l'extraction des paramètres, notamment ceux de la membrane. En effet, plus la conductivité augmente, plus le poids du pic de basse fréquence augmente ; cependant, on doit veiller à garantir que l'élévation de température, faisant suite au choix d'une conductivité plus élevée, ne nuit pas à la viabilité cellulaire. Une solution pourrait être l'utilisation d'un module à effet Peltier pour le contrôle et le refroidissement du substrat en cours d'expérience. Pour des fréquences inférieures à quelques dizaines de MHz, le comportement diélectrophorétique de la cellule peut être modifié en faisant

varier la conductivité du milieu, en particulier celle-ci a une influence sur la valeur de la fréquence caractéristique. Ceci peut s'avérer utile, dans la mesure où notre instrumentation ne nous permet pas d'atteindre, pour des signaux sinusoïdaux, des fréquences dépassant les 80 MHz. Des chercheurs ont d'ailleurs mis au point leur propre carte électronique permettant de générer des signaux sinusoïdaux en quadrature pour l'électrorotation, dans une gamme de fréquences allant de 100 Hz à 1,6 GHz [136], ce qui permet d'affiner la mesure des paramètres du cytoplasme. La génération de signaux carrés en quadrature, plus simple, peut également être envisagée [127] mais elle risque d'impliquer la mise en œuvre d'une éventuelle compensation de l'influence des harmoniques générés.

Actuellement, la procédure de minimisation par la méthode de pondération se fait manuellement, la perspective serait de l'automatiser et ceci pour des modèles à n couches.

Nous avons regardé la différence entre le spectre moyen et le spectre médian ; les paramètres d'entrée varient dans les plages de variation données en I.1. Le premier est défini en prenant pour chaque point de fréquence la valeur moyenne de la vitesse de rotation pour les paramètres d'entrée. Le second est défini en prenant la valeur moyenne des paramètres d'entrée. Sur la Figure III.80, on constate un faible écart entre les spectres médian et moyen au voisinage des pics de résonance. Il faut noter par ailleurs que cet écart dépend de la plage de variation des paramètres d'entrée. Expérimentalement, nous faisons la moyenne de la vitesse de rotation des cellules pour chaque point de fréquence. Il serait intéressant d'opérer en faisant le suivi de cellules sur toute la gamme de fréquence puis en moyennant les spectres obtenus.

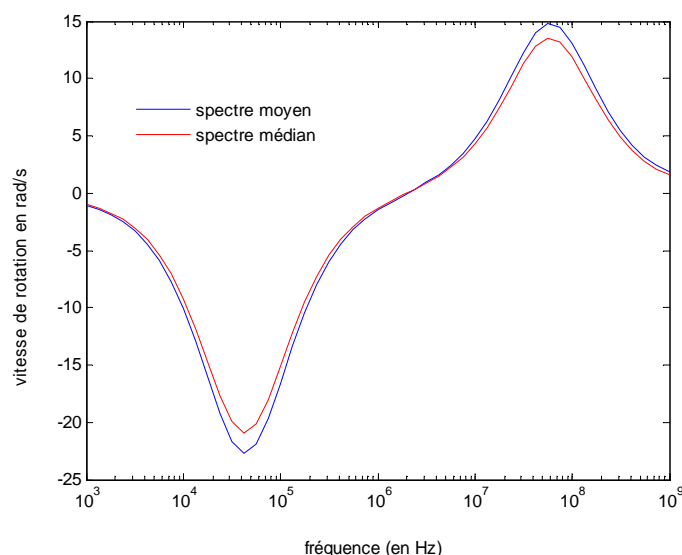


Figure III.80 : Spectre d'électrorotation : spectre moyen et spectre médian

CHAPITRE IV : APPLICATIONS ET DISCUSSION

A travers les deux chapitres précédents, nous avons décrit le déroulement de nos expériences et les moyens d'acquisition utilisés. Puis, nous avons réalisé une étude de techniques d'extraction des paramètres électriques des cellules par identification à partir des spectres d'électrorotation générés numériquement. Dans le cadre de nos expérimentations, le spectre d'électrorotation correspond au spectre moyen : pour chaque point de fréquence, on mesure la vitesse de rotation moyenne des cellules (Figure III.80).

Dans ce chapitre, le comportement diélectrophorétique des cellules est étudié d'après le relevé expérimental de leur spectre d'électrorotation, parfois complété par la mesure de la fréquence caractéristique obtenue à partir d'expériences de diélectrophorèse conventionnelle, qui correspond à la fréquence pour laquelle la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti s'annule.

Différents paramètres influant sur le comportement diélectrophorétique sont étudiés selon le type de cellules analysées comme :

- la conductivité électrique du milieu d'immersion
- l'effet d'un traitement thermique ou enzymatique
- la composition lipidique de la membrane
- la conductivité du milieu interne

I. COMPORTEMENT CELLULAIRE : LES LEVURES

1. Evolution fréquentielle

L'étude fréquentielle des levures vivantes permet de déterminer les gammes de fréquence pour lesquelles les propriétés des différentes couches prédominent. Ainsi, il serait possible d'envisager une détection des modifications de comportement diélectrophorétique des levures en fonction de leur état physiologique, d'identifier une espèce d'après des propriétés définies à une fréquence établie. Les milieux de suspension sont, sauf indication contraire, principalement composés d'eau distillée avec ajout de KCl pour ajuster sa conductivité.

1.1. Paramètres électriques

Les levures utilisées sont de type *Saccharomyces cerevisiae* et présentent une forme sphérique et des diamètres moyens de l'ordre de 6 μm . Ces cellules, de type eucaryote unicellulaire, présentent une structure composée d'un cytoplasme entouré d'une enveloppe externe comportant deux couches : la paroi cellulaire et la membrane. Le modèle analytique qui en résulte découle de celui décrit dans le 1^{er} chapitre pour la sphère à 3 couches (équation I.15).

L'homogénéité d'un type cellulaire comme celui-ci est telle que les spectres tracés présentent de faibles écarts-types (Figure IV.81) ; nous rappelons ici que le spectre relevé est obtenu en mesurant la vitesse moyenne de rotation de l'ensemble des cellules suivies par traitement d'images pour chaque point de fréquence. Les levures d'une même espèce, dans un même état physiologique et à des stades d'évolution semblables, présentent des comportements diélectrophorétiques analogues dans des conditions expérimentales identiques

Les levures vivantes manifestent une rotation dans le sens inverse du champ électrique tournant appliqué jusqu'à une fréquence de près de 2.10^7 Hz au-delà de laquelle le sens de rotation devient identique à celui du champ. Le pic de relaxation en basse fréquence est situé à 4.10^5 Hz et est principalement dû aux propriétés de la membrane qui est, ici, non-conductrice. Le pic de relaxation en haute fréquence n'est pas observable dans la gamme de fréquences que nous atteignons (80 MHz) mais le comportement à plus hautes fréquences est essentiellement induit par la différence entre les propriétés électriques du cytoplasme et celles du milieu d'immersion. Par ailleurs, l'ajout d'une couche au modèle n'implique pas l'apparition d'un pic de relaxation. D'après les données du paragraphe II.3.1. du chapitre II et l'étude faite au chapitre III II.2., la conductivité du milieu est choisie à 50 mS.m^{-1} .

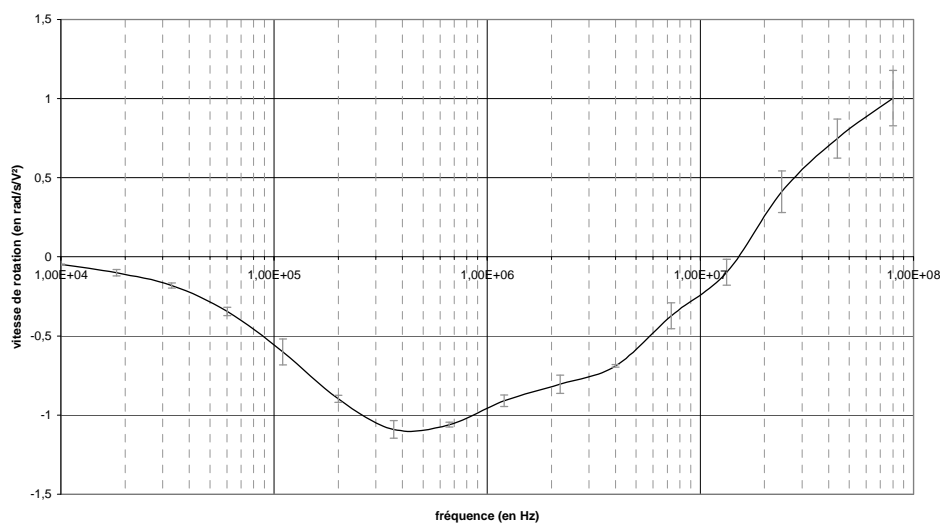


Figure IV.81 : Spectre d'électrorotation des levures vivantes : vitesses moyennes de rotation et écarts-types

Le rayon du cytoplasme est pris égal à $3 \mu\text{m}$ et les épaisseurs de la membrane et de la paroi sont respectivement de $3,5$ et 200 nm [129]. A partir du spectre relevé et en fixant G_{mem} à 1125 S.m^{-2} d'après [124], nous avons extrait les propriétés électriques suivantes :

- cytoplasme : $\sigma_i = 1,4 \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_{i,r} = 60$
- membrane : $C_{mem} = 7,6 \text{ mF.m}^{-2}$
- paroi : $\sigma_w = 11 \text{ mS.m}^{-1}$ et $\epsilon_{i,w} = 74,9$

Les paramètres électriques extraits pour les différents compartiments de la levure sont en accord avec la littérature [136]. La conductance membranaire est aussi extraite mais les deux méthodes d'optimisation utilisées ne permettent pas d'être affirmatif quant à cette donnée d'après l'étude faite dans le chapitre III ; ce pourquoi nous avons fixé cette inconnue. Il apparaît que le cytoplasme a une conductivité importante ce qui peut expliquer le comportement conducteur de la cellule à partir de 10 MHz et valider, en partie, l'étude en fréquence de la permittivité complexe de la cellule réalisée dans le 1^{er} chapitre (Figure I.12).

1.2. Influence du milieu

Le comportement diélectrophorétique des cellules dépend aussi des propriétés électriques de leur milieu d'immersion. Ainsi, le milieu de suspension composé principalement d'eau distillée a une permittivité relative de 80 ainsi qu'une conductivité électrique initialement nulle que l'on pourra ajuster avec précaution (se référer au chapitre II 2.1.).

Pour des levures vivantes soumises à des milieux de conductivités différentes (les autres conditions expérimentales restent inchangées), on observe une modification du spectre d'électrorotation comme cela apparaît sur la Figure IV.82. Le pic d'électrorotation en basse fréquence voit sa position décalée en fonction de la valeur de la conductivité du milieu comme vu au chapitre III II.2. De même, la fréquence pour laquelle se produit une inversion du sens de rotation des levures est aussi décalée. Dans la littérature, de nombreux travaux s'attachent à l'évaluation des propriétés électriques de la membrane ; ainsi, le choix de la conductivité du milieu permet un décalage de la partie basse du spectre et la détermination de ces propriétés. En effet, on peut voir que la fréquence de changement de sens de rotation des cellules passe de 1 MHz à 20 MHz pour des conductivités comprises entre 1,1 et 50 mS.m⁻¹.

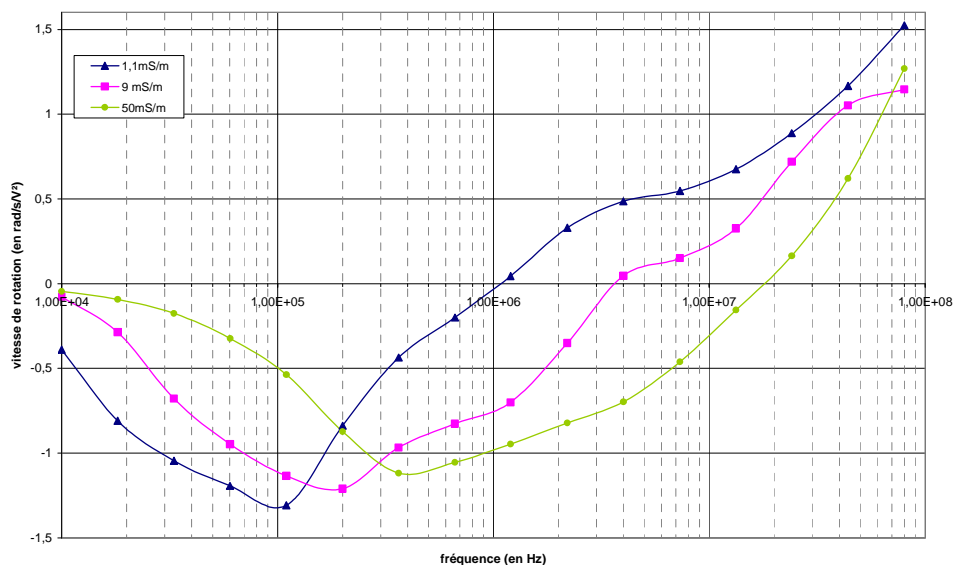


Figure IV.82 : Spectres d'électrorotation de levures dans des milieux présentant différentes conductivités

2. Intégrité membranaire

Afin d'étudier le comportement diélectrophorétique des levures en fonction de leur état physiologique, nous avons soumis les levures de type *Saccharomyces cerevisiae* à deux types de traitements différents : thermique et enzymatique.

2.1. Traitement thermique

Les échantillons de levures vivantes subissent un bain thermique à 75°C pendant trente minutes, ce traitement thermique ayant pour effet de tuer les levures. Pour mettre ceci en évidence, nous avons utilisé le colorant « bleu de Trypan », qui donne une teinte bleue aux cellules mortes. Ce colorant pénètre en effet dans l'ensemble des cellules, mais celles possédant une source d'ATP – molécule énergétique – peuvent le rejeter dans le milieu extérieur par l'action de leur barrière cytoplasmique active. Ainsi, une cellule vivante pourra exclure cette molécule et ne sera pas colorée ; à l'inverse, une cellule morte n'aura pas les moyens de l'expulser et deviendra bleue en raison de la déstructuration de ses couches externes. Par ce moyen, il nous est possible d'évaluer aisément au microscope la viabilité des cellules. Ce colorant nous a aussi permis de vérifier, au terme d'expérimentations conduites sur des levures vivantes, que la viabilité des cellules n'a pas été affectée par l'application du champ électrique ce qui est en accord avec les études répertoriées dans la revue écrite par Pethig et Marx [169].

Il apparaît sur la Figure IV.85 une nette différence de comportement diélectrophorétique entre des levures vivantes et des levures mortes. Les levures ayant subi un traitement thermique inversent leur sens de rotation dès 50 kHz. Pour la gamme de fréquences comprises entre 10^5 et 10^6 Hz, il est possible de distinguer les levures vivantes des mortes étant donné que les premières tournent dans le sens opposé au champ contrairement aux secondes.

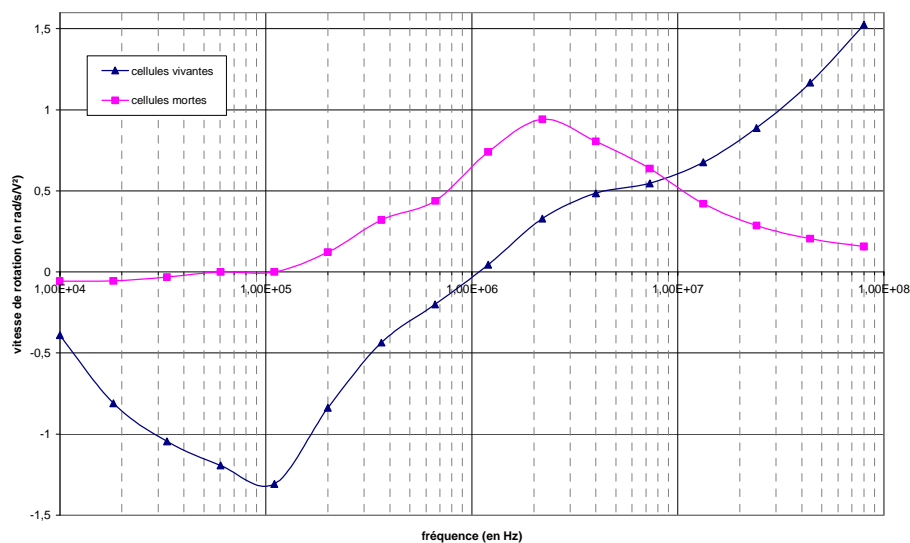


Figure IV.83 : Spectres d'électrorotation pour des levures vivantes et mortes à la suite d'un traitement thermique dans un milieu de suspension à $1,1 \text{ mS.m}^{-1}$

Les expériences sont ici réalisées dans un milieu de conductivité égale à $1,1 \text{ mS.m}^{-1}$ [124]. A partir du spectre relevé pour les levures mortes dans un milieu de conductivité égale à $1,1 \text{ mS.m}^{-1}$, nous avons extrait les propriétés électriques des différentes couches (Figure IV.84):

- cytoplasme : $\sigma_i = 0,03 \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_{i,r} = 70$
- membrane : $G_{mem} = 14 \text{ kS.m}^{-2}$ et $C_{mem} = 0,16 \text{ mF.m}^{-2}$
- paroi : $\sigma_w = 0,06 \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_{i,w} = 60$

Les levures présentent toujours une structure à 3 couches malgré une dégradation du mécanisme de la membrane : la chaleur modifie l'organisation des queues non polaires des lipides de la membrane et donc du système d'échange ionique [170, 171]. Il apparaît que les paramètres des levures sont modifiés par le traitement thermique. En effet, la conductivité du cytoplasme est plus faible ce qui explique en partie que le second pic soit décalé vers de plus basses fréquences. La conductance membranaire est plus importante : le comportement isolant de la membrane en est inhibé. Le pic de relaxation en basses fréquences est principalement dominé par les propriétés de la membrane ; en effet, la conductivité de la paroi modifie sensiblement l'amplitude du pic mais la position reste inchangée au regard de simulations de spectres théoriques à partir du modèle 3 couches.

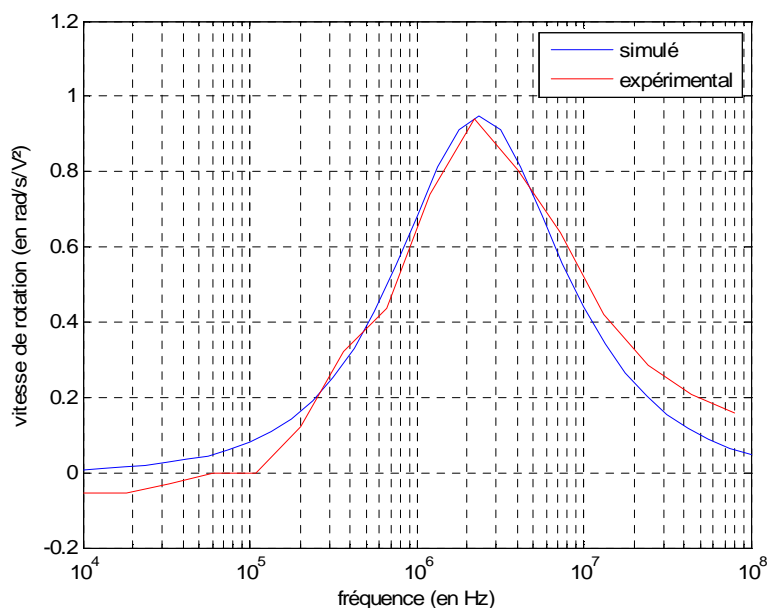


Figure IV.84 : Tracé des spectres simulé et expérimental des levures mortes

Les 1^{ers} essais réalisés sur des levures mortes avaient été effectués après avoir passé ces dernières au bleu de Trypan afin de s'assurer de l'efficacité du traitement. D'autres essais ont ensuite été accomplis sur des levures soumises au même traitement thermique, mais cette fois-ci

sans ajout de solution au bleu de Trypan dans l'échantillon. La Figure IV.85 montre l'influence de l'ajout de bleu de Trypan dans le cadre de nos expériences.

Le milieu de suspension utilisé a une conductivité de 9 mS.m^{-1} . Dans le cas de l'ajout du bleu de Trypan, il apparaît une faible modification du comportement des levures qui résulte en partie de la conductivité de la solution au bleu de Trypan qui porte ainsi la conductivité du milieu d'immersion à $7,2 \text{ mS.m}^{-1}$. La solution de bleu de Trypan (réalisée sous hotte) est obtenue de la façon suivante : 0,2 mg de poudre de Bleu de Trypan sont mis en suspension dans 10 mL d'eau distillée. Sa conductivité est mesurée à $1,7 \text{ mS.m}^{-1}$. La solution est ensuite diluée : $\frac{1}{4}$ en volume est ajouté à l'échantillon traité.

Les levures ayant absorbé du bleu de Trypan ne présentent pas de différences notables sur les hautes fréquences. Il est difficile d'interpréter ici l'influence du bleu de Trypan sur les propriétés de la cellule : en effet, nous ne pouvons estimer la quantité assimilée par le cytoplasme. Les comportements des levures mortes passées ou non au bleu de Trypan ont aussi été comparés par diélectrophorèse conventionnelle. Pour les 2 cas, la fréquence caractéristique relevée avoisine les 10 MHz.

De même, nous avons relevé les spectres pour des levures vivantes dont la solution d'immersion contenait du bleu de Trypan dans les mêmes proportions. Seules des modifications du spectre dues à la différence de conductivité du milieu d'immersion ont été remarquées : les spectres présentent une même allure ainsi que des vitesses de rotation similaires pour chaque point de fréquence étudié.

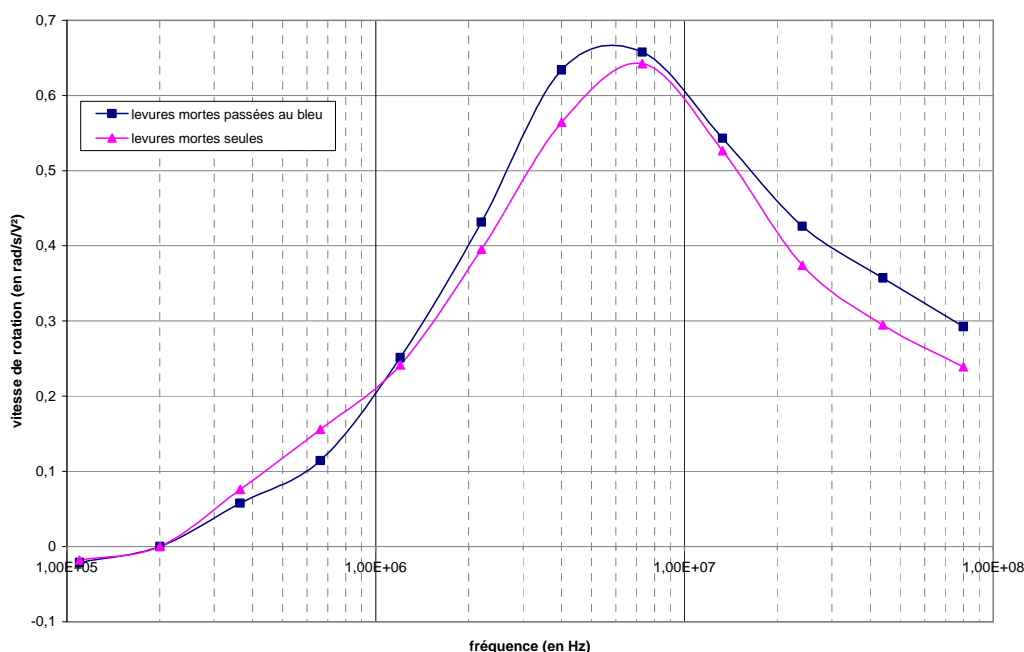


Figure IV.85 : Spectres d'électrorotation pour des levures mortes passées ou non au bleu de Trypan

2.2. Traitement enzymatique

Le traitement enzymatique permet d'obtenir des protoplastes de levures [172] c'est-à-dire des levures dénuées de leur paroi mais conservant une membrane plasmique intacte. La paroi est détruite par digestion grâce à utilisation d'une enzyme (la lyticase). Aucun changement de forme n'est observé sur les levures, seul le contraste au niveau membranaire est plus faible au microscope dans le cas des protoplastes ; cette observation (Figure IV.86) paraît tout à fait cohérente dans la mesure où la paroi est détruite.

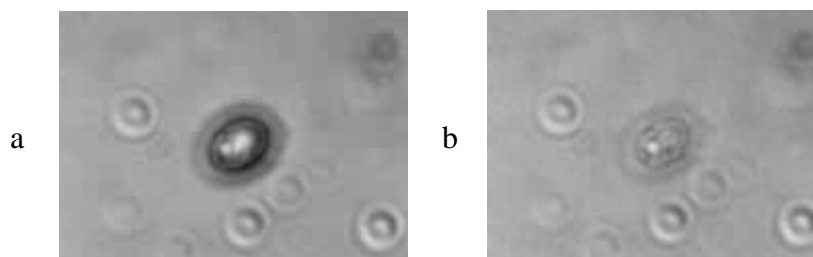


Figure IV.86 : Destruction de la paroi cellulaire : levure a) avant et b) après le traitement enzymatique

La Figure IV.87 présente le spectre moyen et les écarts-types obtenus pour des protoplastes de levures placés dans un milieu d'immersion de conductivité égale à 50 mS.m^{-1} .

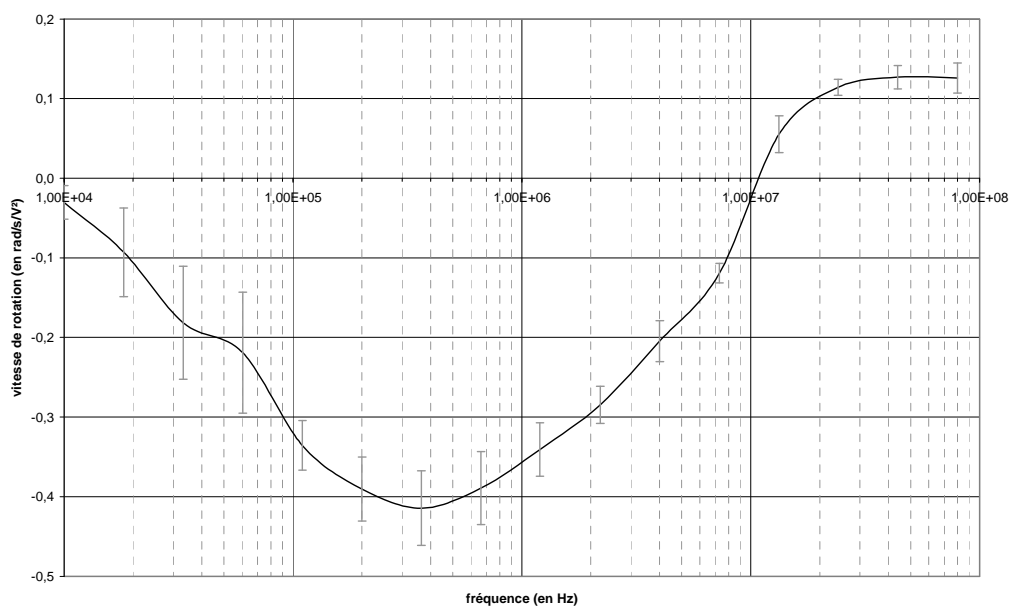


Figure IV.87 : Spectre d'électrorotation des protoplastes de levures : spectre moyen et écarts-types

Dans des conditions expérimentales similaires, il s'avère que la fréquence pour laquelle s'effectue le changement de rotation des cellules se situe autour de 10 MHz pour les protoplastes et de 15 MHz pour les levures vivantes intactes (Figure IV.88). Par ailleurs, les protoplastes ont un comportement similaire aux levures normales étant donné que la position du pic en basse fréquence ainsi que le sens de rotation est le même sur la gamme de fréquences étudiée. Il est à

noter que la vitesse de rotation est affectée : sa valeur est divisée par près de 2,6 fois pour le pic en basse fréquence et environ 8 fois pour la fréquence de 80 MHz.

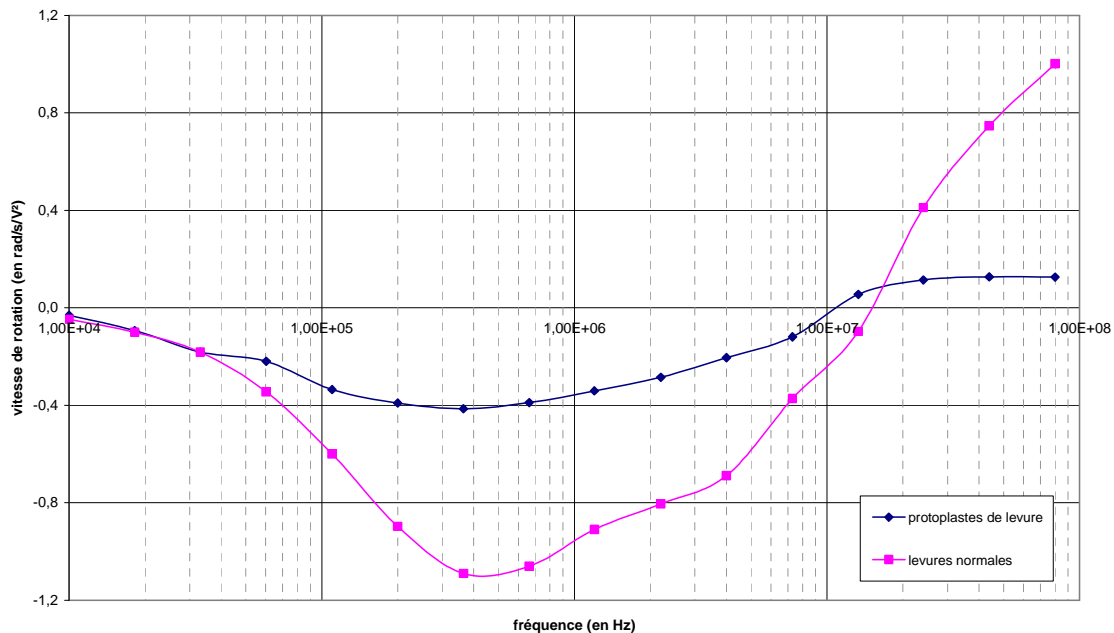


Figure IV.88 : Spectre d'électrorotation pour les levures normales et ayant subi un traitement enzymatique

Le traitement enzymatique n'affecte, d'un point de vue du comportement fréquentiel dans le cadre de nos essais, que très sensiblement les levures. Les propriétés électriques du milieu sont $\epsilon_{m,r} = 80$ et $\sigma_m = 50 \text{ mS.m}^{-1}$ et les paramètres géométriques des cellules sont $R = 3 \mu\text{m}$ et $d = 3,5 \text{ nm}$ (épaisseur de la membrane). Pour les protoplastes, les paramètres extraits sont :

- cytoplasme : $\sigma_i = 1,4 \text{ S.m}^{-1}$ et $\epsilon_{i,r} = 60$
- membrane : $C_{mem} = 9,1 \text{ mF.m}^{-2}$

Les paramètres électriques du cytoplasme correspondent en tout point à ceux extraits pour des levures normales. La capacitance membranaire obtenue ici est supérieure à celle des levures normales ($7,6 \text{ mF.m}^{-2}$). Par ailleurs, elle peut être comparée avec la valeur obtenue par le relevé de la fréquence caractéristique en diélectrophorèse conventionnelle qui est de $4 \cdot 10^5 \text{ Hz}$; ainsi, C_{mem} vaut $9,4 \text{ mF.m}^{-2}$ (déduite d'après l'équation I.13), valeur qui correspond à celle trouvée par l'intermédiaire du spectre d'électrorotation.

Le faible écart entre les capacitances membranaires des levures normales et des protoplastes est une première explication à la similitude de comportement diélectrophorétique. Malheureusement, l'extraction de la conductance membranaire n'est pas fiable et ne nous permet pas de conclure quant aux comportements observés des protoplastes.

La Figure IV.89 montre le tracé d'un spectre issu d'une simulation à partir du modèle 2 couches avec les paramètres du cytoplasme et de la membrane obtenus pour les levures vivantes

que l'on peut comparer au spectre expérimental des protoplastes. On constate que le pic en basse fréquence est décalé de + 0,2 décade tandis que le changement de rotation intervient exactement à la même fréquence. Par ailleurs, la courbe expérimentale indique des variations plus douces pour les vitesses de rotation. L'ajout d'une troisième couche au modèle des levures permet l'étude des propriétés électriques de la paroi même si celles-ci ne semblent pas apporter de modifications sur l'allure générale du spectre pour la gamme de fréquence étudiée. Asami *et al.* ignorent la paroi dans les modèles pour l'étude des levures : au regard des conductances de la membrane et de la paroi, cette dernière est négligée [173].

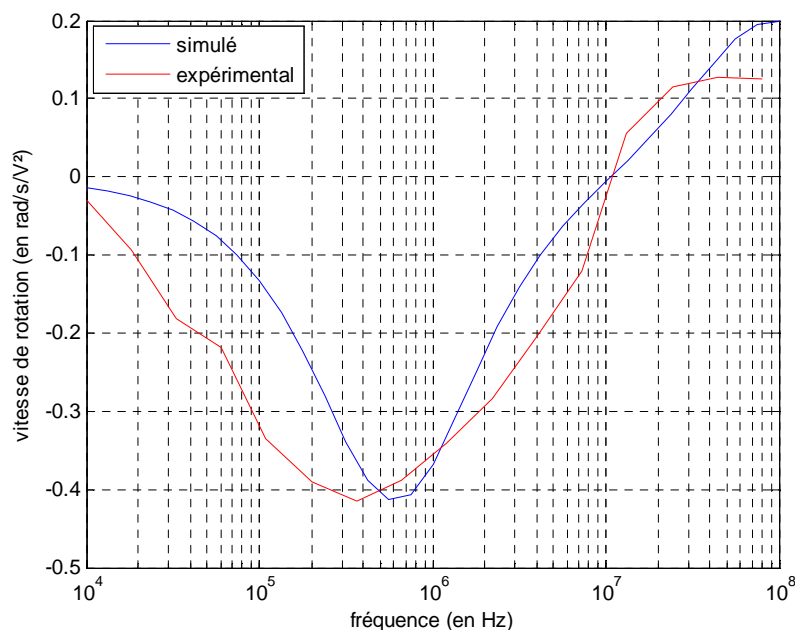


Figure IV.89 : Tracé des spectres simulé et expérimental des protoplastes de levures

II. MODIFICATION DE LA STRUCTURE : LES LIPOSOMES

L'étude des liposomes se révèle intéressante compte tenu de leur emploi comme modèles dans le domaine de la caractérisation cellulaire mais aussi de leur utilisation très répandue en pharmacologie (comme vecteurs de principes actifs) et en génétique (transfert de gènes)

Les milieux d'immersion des expériences présentées ci-après sont principalement composés d'eau distillée à laquelle on ajoute du saccharose afin d'assurer une osmolarité convenable pour les liposomes. La conductivité est parfois ajustée par ajout de KCl.

L'intérêt de l'étude du comportement diélectrique des liposomes réside dans la possibilité de contrôler certains paramètres contrairement aux cas des cellules. Ainsi, avec des liposomes unilamellaires, il nous est possible de mieux appréhender le modèle 2 couches et surtout, le comportement de la membrane.

1. Paramètres électriques

Les liposomes sont fabriqués par extrusion via une membrane en polycarbonate avec des trous de 10 μm de diamètre ; ainsi, ils ont des diamètres allant jusqu'à une quinzaine de micromètre et sont tous unilamellaires. Par ailleurs, d'après la littérature, leur épaisseur se situe autour de 3.8 nm[141].

La Figure IV.90 présente les spectres d'électrorotation expérimental et simulé pour des liposomes dont les caractéristiques sont les suivantes :

- la membrane est composée de DOPC et NBD-PC dans les conditions explicitées dans le chapitre « matériel et méthodes »,
- le milieu intérieur est constitué d'eau distillée dont l'osmolarité est ajustée par ajout de saccharose et dont la conductivité est élevée à $0,4 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$,
- le diamètre moyen des liposomes étudiés est de $10 \mu\text{m}$.

Nous avons étudié quatre liposomes aux caractéristiques similaires (taille et sphéricité) pour le spectre tracé. Le milieu de suspension est composé d'eau distillée, l'osmolarité est ajustée par ajout de sorbitol afin d'engendrer un écart de densité avec le milieu interne permettant aux liposomes de sédimenter. La conductivité est 10 fois inférieure à celle du milieu interne des liposomes.

Les liposomes manifestent une rotation dans le sens inverse à celui du champ tournant appliqué de 40 kHz à un peu plus de 10 MHz. Le pic de relaxation visible se situe à une fréquence de 2 MHz. Les propriétés du milieu interne sont aussi connues et le modèle utilisé est un modèle à 2 couches, représentant le milieu interne entouré de la membrane composée exclusivement de phospholipides. La capacitance membranaire est identifiée à $0,492 \text{ mF}\cdot\text{m}^{-2}$ tandis que l'estimation de la conductance dépend fortement des paramètres initiaux introduits malgré la connaissance des propriétés du milieu interne. En considérant les propriétés du milieu comme connues puis comme inconnues, nous constatons que seule la valeur de la conductance est modifiée. Celle-ci est respectivement estimée à 7,918 et $40 \text{ S}\cdot\text{m}^{-2}$.

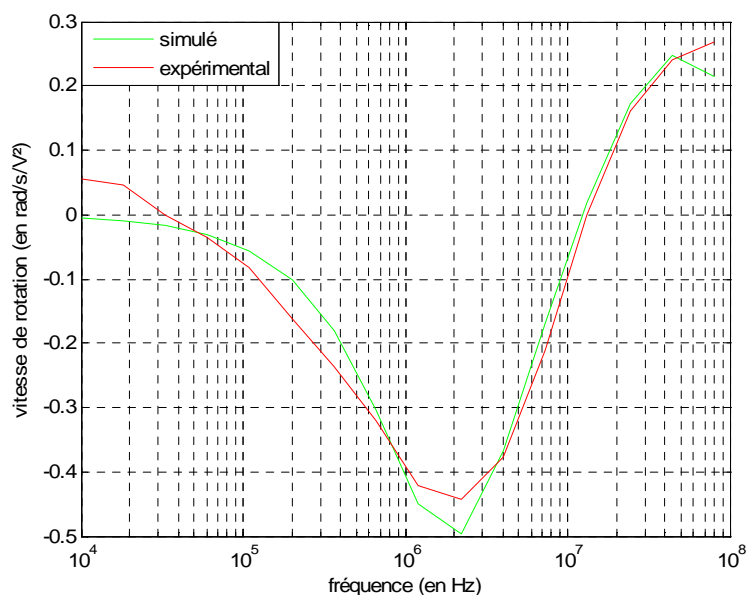


Figure IV.90 : Spectre d'électrorotation expérimental et simulé pour des liposomes dont la membrane contient des lipides marqués de type NBD-PC

La Figure IV.91 montre les spectres expérimentaux pour les liposomes suivants :

- membrane constituée de DOPC et NBD-PE,
- milieu intérieur à partir d'eau distillée dont l'osmolarité est ajustée par ajout de saccharose et dont la conductivité est nulle,
- le diamètre moyen des liposomes étudiés est aussi de 10 μm .

De même que précédemment, les spectres sont tracés pour trois liposomes dont les caractéristiques sont semblables. Le milieu de suspension est composé d'eau distillée, l'osmolarité est ajustée par ajout de sorbitol afin d'engendrer un écart de densité pour nos expériences et la conductivité est ajustée à 20 et 75 $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$.

Les liposomes tournent dans le sens inverse à celui du champ électrique à partir de 200 kHz et ce jusqu'à la fin de la gamme accessible (80 MHz). La Figure IV.91 montre que les pics de relaxation sont décalés, ce qui s'explique par une modification de la conductivité du milieu d'immersion dans lequel les liposomes sont étudiés, conformément à l'étude réalisée au chapitre III partie II.2. L'allure globale des spectres expérimentaux est similaire à l'allure du spectre tracé pour les liposomes dont la membrane est constituée de phospholipides marqués NBD-PC malgré la conductivité du milieu interne. Une 1^{ère} explication peut être apportée par l'influence des propriétés de la membrane sur la partie basse du spectre, à plus haute fréquence les spectres ont par contre des caractéristiques distinctes qui peuvent être dues à la différence entre les propriétés du cytoplasme et celles du milieu externe.

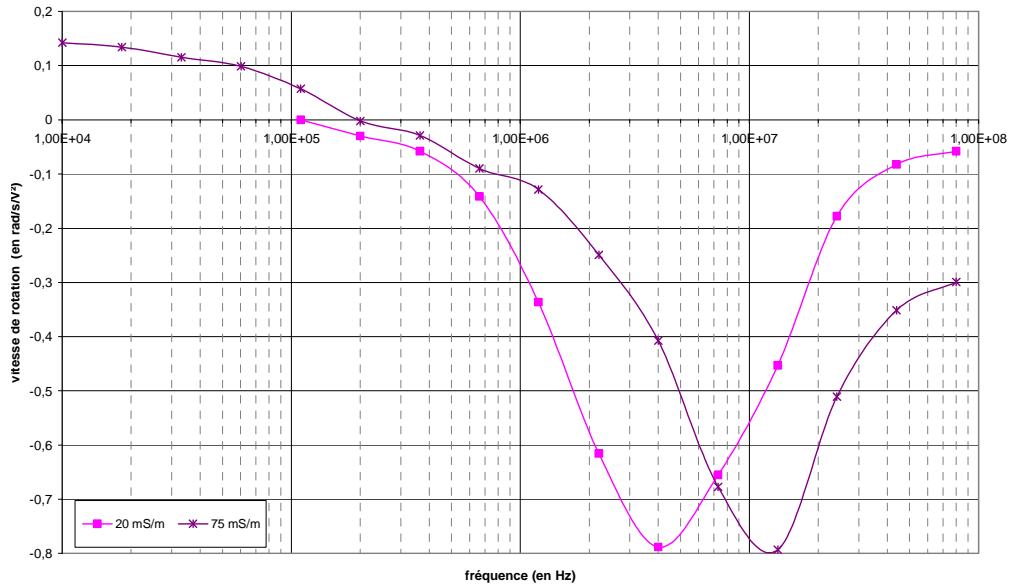


Figure IV.91 : Spectre d'électrorotation de liposomes dont la membrane contient des lipides marqués NBD-PE dans des milieux à différentes conductivités

Connaissant les propriétés du milieu interne, nous identifions ici la capacitance membranaire à $0,43 \text{ mF.m}^{-2}$ (Figure IV.92), valeur voisine de celle obtenue pour les liposomes dont la membrane est marquée avec des lipides NBD-PC. Nous étudions plus loin la sensibilité du spectre lorsque la conductivité du milieu interne est portée à zéro.

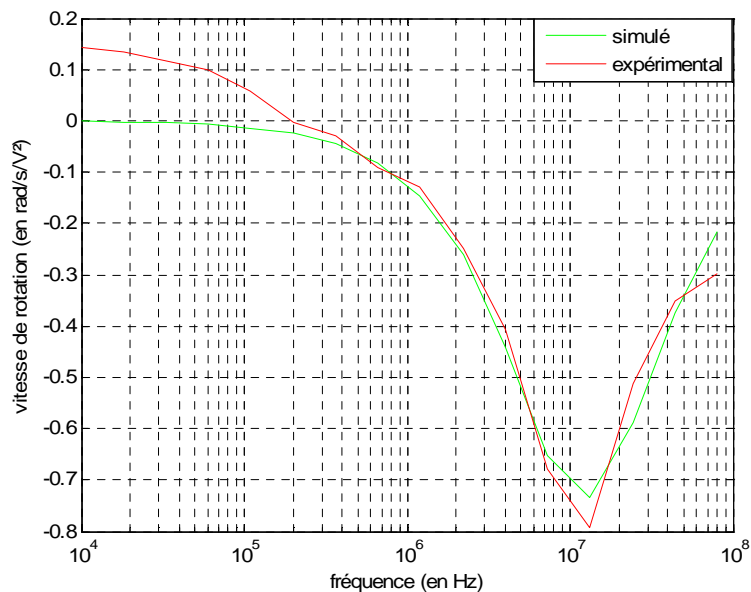


Figure IV.92 : Spectre d'électrorotation expérimental et simulé, cas où la conductivité du milieu vaut 75 mS.m^{-1}

Il est intéressant de reprendre l'étude réalisée au chapitre III (Tableau III.5) sur l'analyse de sensibilité lorsque la conductivité du milieu interne ou du milieu externe est nulle (Tableau IV.8). En effet, il apparaît que le spectre est moins sensible aux propriétés de la membrane (même dans le cas où $\sigma_i = 0$ et est donc connu) et que celles-ci seront donc plus difficilement estimables que dans le cas de cellules vivantes immergées dans un milieu à faible conductivité.

X	Cas où $\sigma_m = 0$		Cas où $\sigma_i = 0$	
	$P_{\text{var}}(Y x)$ en %	$T_{\text{var}}(Y x)$ en %	$P_{\text{var}}(Y x)$ en %	$T_{\text{var}}(Y x)$ en %
σ_i	1,2	4,8	-	-
$\varepsilon_{i,r}$	10,9	70,1	18,2	84,4
G_{mem}	0,0	0,0	0,0	0,0
C_{mem}	$0,10 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$0,020 \cdot 10^{-3}$	$0,30 \cdot 10^{-3}$
ξ	28,6	84,4	15,6	81,8

Tableau IV.8 : Analyse de la variance de Y quand $\sigma_m=0$ ou $\sigma_i=0$

Les capacitances estimées dans les cas précédemment exposés ont des valeurs élevées en partie dues à l'extrême finesse de la membrane des liposomes (de l'ordre de 3,5 nm). Les phospholipides NBD-PC et NBD-PE sont de charge neutre ; la bicouche lipidique est donc constituée de phospholipides non conducteurs donnant des propriétés capacitives à la membrane. Cette analyse nous conduit à considérer avec précaution les paramètres extraits pour la membrane malgré la capacitance, obtenue d'après la Figure IV.92, qui est voisine de celle extraite pour un milieu interne et externe conducteur (Figure IV.90).

2. Liposomes électroformés

Les liposomes unilamellaires géants fabriqués selon la méthode d'électroformation n'ont pu être étudiés d'après le principe de l'électrorotation. En effet, la rotation des liposomes obtenus par cette méthode n'a pas pu être mise en évidence : la sphéricité et le contraste accessible – même par fluorescence – ne permettaient pas de constater de façon catégorique un mouvement de rotation sur des liposomes isolés (en revanche, des agrégats de liposomes ont pu être observés en rotation). De plus, les liposomes ainsi formés ont un milieu interne non conducteur ; le protocole d'électroformation exige en effet l'utilisation de solutions non conductrices ou éventuellement très faiblement conductrices.

Des liposomes ont été créés à partir de lipides de type DOPC qui est le lipide constituant principalement la membrane avec ajout de lipides de type NBD-PE à 2,5 % qui permettent de marquer de manière homogène la membrane (fluorescence dans le vert) et comportant ou non du cholestérol (qui a pour propriété de rigidifier les membranes).

Des essais de diélectrophorèse dite conventionnelle ont été conduits dans un milieu non conducteur ou faiblement conducteur, les dimensions des électrodes utilisées sont :

- distance entre électrodes rectangulaires adjacentes : 60 μm
- distance entre deux branches voisines : 100 μm

Lorsque les liposomes sont suspendus dans un milieu non conducteur, ils sont soumis à la diélectrophorèse positive sur toute la gamme de fréquence étudiée (Figure IV.93). A 10 kHz, le phénomène d'électro-osmose est observable (Figure IV.93 à droite). Celui-ci se traduit par la formation de rouleaux de liquide au-dessus des électrodes, dirigés du bord des électrodes vers leur centre [174]. Ainsi, des liposomes normalement attirés sur le bord par diélectrophorèse positive peuvent être happés par ces rouleaux et collectés vers la partie centrale des électrodes. Les expériences n'ont pas montré de fréquence où les liposomes seraient soumis à la diélectrophorèse négative. Par étude de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti, il n'apparaît pas en effet de fréquence caractéristique dans le cas d'un modèle 2 couches en considérant les conductivités du milieu interne et externe nulles.

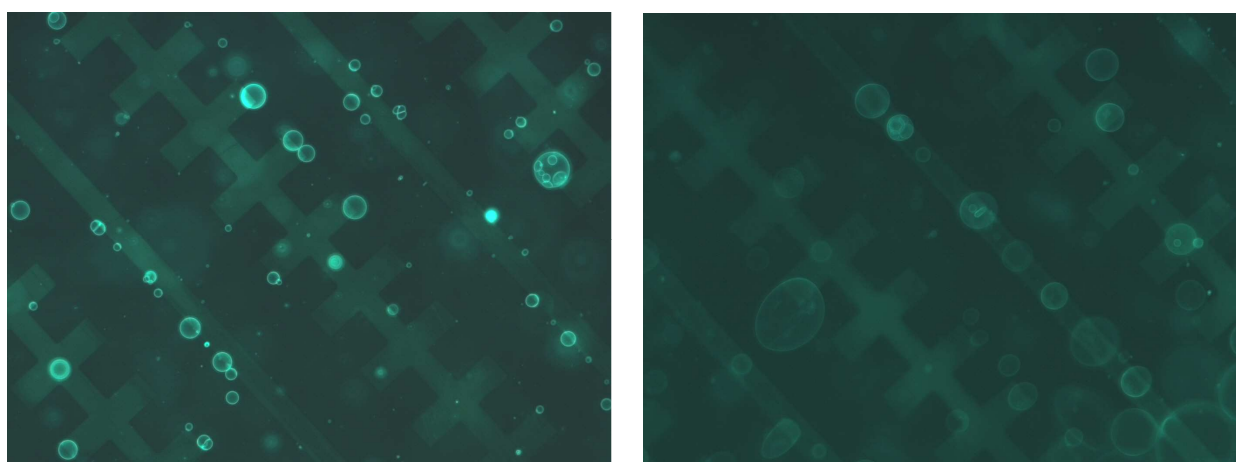


Figure IV.93 : à gauche, les liposomes électroformés sont soumis à la diélectrophorèse positive ; à droite, ils sont aussi soumis à l'électro-osmose

Les liposomes sont ici suspendus dans un milieu faiblement conducteur, la conductivité du milieu d'immersion est alors portée à $0,1 \text{ mS.m}^{-1}$. A partir de 10 kHz et jusqu'à 1 MHz, ils sont soumis à la diélectrophorèse positive (Figure IV.94 à gauche) tandis qu'à partir de 5 MHz, ils sont soumis à la diélectrophorèse négative, c'est-à-dire repoussés du bord des électrodes (Figure IV.94 à droite). Ce comportement diélectrophorétique est opposé à celui des cellules : elles sont classiquement soumises à la diélectrophorèse négative en basses fréquences et à la positive en hautes fréquences. Dans le cas des liposomes, le milieu interne est non conducteur contrairement aux cellules où les valeurs sont souvent supérieures à $0,3 \text{ S.m}^{-1}$ (Tableau I.2). Nous avons réalisé des essais dans un milieu plus conducteur, la conductivité étant alors portée à 45 mS.m^{-1} , nous avons alors constaté que les liposomes étaient soumis à la diélectrophorèse négative. Les liposomes étaient repoussés des électrodes et mis en lévitation au-dessus du microsysteme.

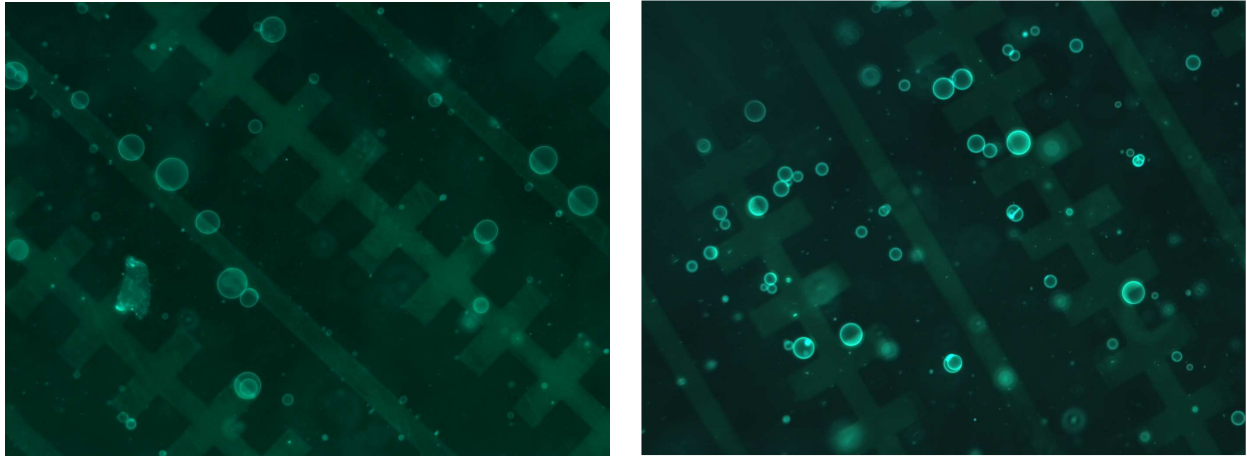


Figure IV.94 : à gauche, les liposomes électroformés sont soumis à la diélectrophorèse positive ; à droite, ils sont soumis à la diélectrophorèse négative

Au cours des expériences, des liposomes de petites tailles (de l'ordre du micromètre) se sont concentrés par électro-osmose de manière significative et ont formé des agrégats à une fréquence de 10 kHz (Figure IV.95).

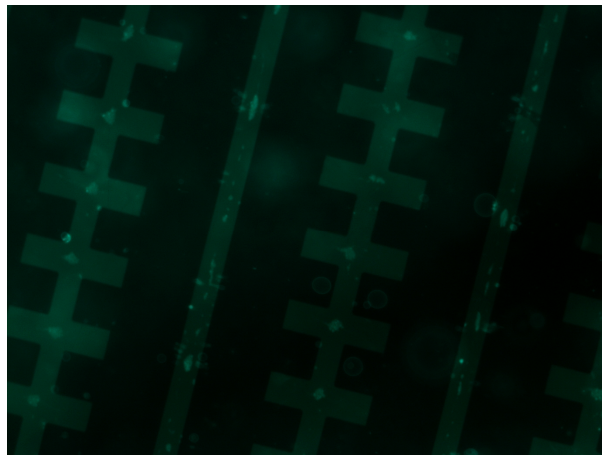


Figure IV.95 : Phénomène d'électro-osmose

Nous n'avons pas constaté de différence de comportement diélectrophorétique entre des liposomes contenant ou non du cholestérol (constitue 30 % de la composition lipidique). Cela confirme le constat effectué sur la sensibilité aux paramètres avec un milieu non conducteur. De même, lors de leurs études sur des liposomes, élaborés d'après un protocole basé sur la formation spontanée qui ne permet de contrôler l'obtention de liposomes unilamellaires, Chan *et al.* n'avaient pas constaté d'influence quant à la présence de cholestérol sur la mesure de fréquence caractéristique [141]. Ils ont également remarqué que la membrane laissait passer des ions entre le milieu interne et le milieu de suspension malgré l'ajout de cholestérol qui a pour effet de réduire les fuites d'ions à travers la membrane [175].

Des essais ont aussi été réalisés sur des liposomes dont le milieu interne contient des nanoparticules (200 nm) immergés dans un milieu non conducteur. Les liposomes ne sont plus

ici exclusivement soumis à la diélectrophorèse positive (cas des liposomes dont les milieux interne et externe sont non conducteurs) ; en effet, à 10 kHz, ils sont soumis à la diélectrophorèse négative (Figure IV.96).

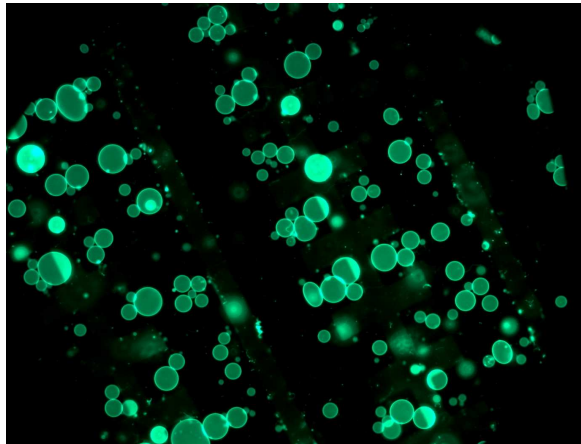


Figure IV.96 : Liposomes électroformés contenant des nanoparticules soumis à la diélectrophorèse négative

III. DEVELOPPEMENT EN COURS ET PERSPECTIVES

Les études menées au sein du laboratoire concernant l'électrorotation sont en pleine expansion du fait de l'installation d'une salle de culture pour cellules animales mais aussi grâce à la collaboration entretenue avec l'équipe de modélisation. Le développement de l'axe « interaction champ-cellule » passe aussi par l'étude des effets des champs magnétiques sur les cellules.

1. Modélisation de l'électrorotation

Les méthodes théoriques permettant de calculer le couple d'électrorotation (tenseur de Maxwell ou méthode utilisant les moments multipolaires [176, 177]) sont exploitées en vue d'étudier le phénomène d'électrorotation. Pour la modélisation du phénomène d'électrorotation, les travaux actuellement menés portent sur l'emploi des éléments finis pour le calcul du potentiel induit par une cellule quand celle-ci est soumise à un champ dit tournant. Ainsi, le moment dipolaire est estimable et cette approche permet de considérer des formes de cellules variées (ici, la propriété de symétrie axiale est importante pour le problème considéré) : sphérique, cylindrique et biconcave (cas des globules rouges).

Le cas du sphéroïde est particulièrement intéressant étant donné sa géométrie ; en effet, l'existence d'une expression semi-analytique pour le couple permet de mieux apprécier les résultats numériques obtenus. Par ailleurs, en changeant des paramètres géométriques tels que l'excentricité pour les ellipses en 2 dimensions, il est possible d'étudier les paramètres influant sur le couple et donc la vitesse de rotation en fonction de ces paramètres.

La poursuite du travail de thèse d'A. Ogbi (thèse en cours) portera sur l'étude des mécanismes de polarisation des cellules avec les représentations multicouches pour avoir des modèles qui décrivent (qualitativement et quantitativement) l'interaction du champ électrique avec les cellules par des réponses cinétiques. L'étude du problème inverse est une étape majeure de modélisation numérique de l'électrorotation afin d'identifier les paramètres des cellules en fonction de différents facteurs tels que la nature du champ, les propriétés du milieu de suspension et la morphologie générale des cellules étudiées. Actuellement, une méthode stochastique a été mise en place comme nous l'avons montré dans le chapitre III ; elle sera reprise dans un 1^{er} temps et une étude déterministe viendra la compléter dans un 2nd temps.

2. Effets des champs magnétiques

Une première expérience a été conduite, afin d'évaluer l'effet d'une exposition à un champ magnétique statique sur le spectre d'électrorotation de levures. La source de champ utilisée ici est un aimant permanent rectangulaire (Figure IV.97 :). Nous avons mesuré le champ magnétique à l'aide d'un Gaussmètre FH-26, mesure en DC : à distance nulle, l'aimant produit un champ magnétique normal à la surface de 330 mT et de 180 mT à une distance de 4 mm.



Figure IV.97 : Aimant permanent rectangulaire en Neodyme-Fer-Bore (dimension 2×4 cm)

Les levures ont été mises en culture dans deux boîtes de Pétri, une a été placée sous champ magnétique perpendiculaire à la surface de la boîte et l'autre non soumise à ce champ. Plusieurs contrôles visuels de la croissance des isolats ont été réalisés afin de voir si le champ pouvait avoir une influence sur celle-ci. Aucune influence n'a pu être constatée : la croissance s'est avérée normale dans les 2 cas.

Des essais sur microsysteme ont été effectués à plusieurs jours d'intervalle (6 jours en bilan). Après avoir centrifugé et lavé à trois reprises les levures, celles-ci ont été mise en suspension dans un milieu de conductivité 55 mS.m^{-1} . Les spectres d'électrorotation recueillis dans les deux cas sont fortement semblables sur la totalité de la gamme de fréquence étudiée ainsi que la mesure de la fréquence caractéristique en diélectrophorèse. Ainsi, ces premiers essais préliminaires n'ont pas démontré d'effets du champ magnétique sur les levures.

Il serait intéressant, dans des expériences futures sur des cellules humaines, de varier les sources de champ (intensité, fréquence) et, dans le cas statique, de regarder si l'orientation du champ a une influence tant sur la croissance des levures sous boîte de Pétri que sur le comportement diélectrophorétique.

IV. CONCLUSION

D'un point de vue expérimental, les levures présentent de nombreux avantages : elles sont aisément cultivables, elles ne présentent aucune contrainte d'utilisation lors de nos expériences sous champ. Par ailleurs, elles sont facilement assimilables à un modèle cellulaire sphérique à 3 couches concentriques composé du cytoplasme, de la membrane et de la paroi. Les essais nous ont permis de valider en partie l'identification paramétrique malgré des difficultés certaines à extraire la conductance membranaire. La pondération des méthodes de minimisation pourrait être appliquée afin d'extraire ce paramètre et d'augmenter l'efficacité de l'identification. Cependant, cette méthode sera plus lourde à mettre en place et nécessiterait que la méthode actuellement existante pour un modèle à 2 couches soit automatisée. Le cytoplasme des levures présente un fort caractère conducteur qui s'exprime à partir de 10^7 Hz ; la membrane et la paroi laissent alors les lignes de champ électrique passer.

L'effet de la conductivité du milieu de suspension sur le comportement diélectrophorétique des levures a été mis en évidence. Les levures présentent alors différentes fréquences de changement de sens de rotation dans leur spectre, celui-ci étant décalé vers de plus hautes fréquences en augmentant la valeur de la conductivité. Ainsi, étant donné que les propriétés électriques de la membrane interviennent principalement en basse fréquence, il est plus intéressant de les identifier pour la plus grande conductivité afin d'avoir le plus de poids possible sur le spectre étudié. Il s'avère que le pic à haute fréquence n'est jamais atteint lors de nos expériences, le choix de la conductivité du milieu n'ayant pas d'influence au-delà d'une dizaine de MHz.

L'intégrité membranaire des levures peut facilement être étudiée par mesure du spectre d'électrorotation ; en effet, nous avons constaté que des levures mortes présentent un comportement diélectrophorétique complètement différent de celui des levures vivantes pour des conditions expérimentales sur microsysteme identiques. Ainsi, on peut affirmer que la structure membranaire est fortement altérée par le traitement thermique même si les levures mortes conservent leur structure en 3 couches. Le traitement enzymatique a quant à lui pour effet de détruire la couche externe des cellules : la paroi. Les spectres relevés pour des levures normales

ou sans paroi ont une allure similaire ; seule la vitesse de rotation est moindre dans le cas des protoplastes de levures. Ainsi, le traitement enzymatique n'a pas des effets irréversibles sur les levures et des études montrent d'ailleurs que les protoplastes de levures remis en culture se développent normalement [172].

L'étude de l'effet d'un champ magnétique sur les levures n'a pas montré d'impact particulier tant sur la croissance des levures que sur leur comportement diélectrophorétique. Le champ de 330 mT a été appliqué radialement à la boîte de Pétri dans laquelle les levures étaient mises en culture.

Nous avons donc étudié les levures afin de valider dans un 1^{er} temps le fonctionnement de notre plateforme expérimentale et d'étudier le comportement diélectrophorétique de cellules facilement cultivables et utilisables en laboratoire. Dans un 2nd temps, nous nous sommes intéressés à l'influence de traitements sur les levures en particulier l'impact sur les couches externes. Ces études et caractérisations ont facilité l'identification paramétrique des levures. Les liposomes, quant à eux, constituent un sujet d'étude particulièrement intéressant, étant donné l'utilisation faite dans de nombreux domaines. En effet, ils sont extrêmement peu étudiés à l'heure actuelle du point de vue du comportement diélectrique.

La technique d'extrusion nous a permis d'étudier des liposomes de tailles équivalentes à celles des cellules biologiques tout en ayant la possibilité d'intervenir sur la composition du milieu interne en particulier la conductivité. Par ailleurs, l'extrusion a permis d'élaborer des liposomes unilamellaires sans obstacle apparent. A chaque échantillon étudié, le nombre de liposomes était de l'ordre de l'unité. En effet, les échantillons étaient constitués de manière à ne pas avoir trop de liposomes car nous avons pu remarquer lors des expériences qu'ils s'agrégeaient rapidement et facilement.

L'utilisation du modèle 2 couches est un cas typique pour les liposomes unilamellaires, l'extraction est facilitée par la connaissance des propriétés du milieu interne. Malgré cela, nous avons constaté que, dans le cas d'un milieu interne et d'un milieu externe non conducteurs, la sensibilité du spectre à la conductance membranaire est fortement influencée. La capacitance membranaire reflète en partie le comportement isolant de la membrane, pour les liposomes comme pour les levures. Il serait intéressant d'incorporer des protéines [178], molécules chargées électriquement contenues habituellement dans les membranes biologiques (chapitre I I.1.1.), dans la composition de la membrane des liposomes afin d'étudier l'influence de celles-ci au niveau des propriétés membranaires.

Les liposomes élaborés par électroformation présentent l'intérêt d'une grande taille accessible malgré l'impossibilité actuelle de les étudier avec notre microsystème basé sur le

principe de l'électrorotation étant donné le peu de contraste et la sphéricité de ces liposomes. Les essais en diélectrophorèse ont montré un comportement particulier : les liposomes sont soumis à la diélectrophorèse positive dans toute la gamme lorsqu'ils sont immergés dans un milieu non conducteur. Il est intéressant de voir la faible sensibilité du spectre aux propriétés des membranes malgré un milieu interne non conducteur.

La modélisation de l'électrorotation pourra apporter beaucoup dans la compréhension des phénomènes existants tels que l'interaction entre cellules ou encore les effets thermodynamiques associés. Par ailleurs, l'étude de la caractérisation électrique sera reprise en vue d'être tout d'abord améliorée et automatisée dans la saisie des données d'entrée et ensuite de mieux prendre en compte la morphologie de la cellule. De plus, la distribution réaliste du champ pourra être prise en compte dans les différents calculs.

CONCLUSION

Dans le 1^{er} chapitre, nous avons présenté les différentes techniques de caractérisation des propriétés physiques – mécanique, diélectriques et magnétiques – des cellules. Nous nous sommes intéressés à l'étude des techniques de caractérisation électrique des cellules déjà explorées dans le monde du bioélectromagnétisme. Nous avons axé notre travail sur l'exploitation du phénomène de diélectrophorèse et principalement de l'électrorotation pour l'étude du comportement diélectrophorétique et plus précisément la mesure des paramètres électriques des différentes couches constituant les cellules. Pour les levures, nous avons montré que suivant son état physiologique et son stade d'évolution, le type cellulaire possédait sa propre identité diélectrophorétique. Par ailleurs, quelques exemples d'applications de l'électrorotation nous ont permis de mettre en avant les atouts de la mise en œuvre de ce principe dans l'exploitation du comportement des cellules.

Dans un second chapitre, nous avons décrit le matériel utilisé : des cellules étudiées à la plateforme mise en place. Les modèles cellulaires choisis et leur protocole de préparation ont été présentés. Nous avons mis en avant l'avantage de l'utilisation de levures – pour leur simplicité d'utilisation – et de liposomes – pour leur structure simple et ajustable et la possibilité de contrôler la composition des différents compartiments formés. Puis nous avons détaillé les équipements de la plateforme : les générateurs synchronisés capables de balayer une gamme de fréquences allant de 1 μHz à 80 MHz couplés avec l'utilisation d'un oscilloscope pour la visualisation des signaux en quadrature ; le matériel optique qui permet de contrôler en temps réel le mouvement des cellules mais également d'acquérir des vidéos de nos expériences. Nous avons aussi décrit les méthodes utilisées pour le traitement automatique des images qui nous offre la possibilité, après acquisition des séquences d'images, de suivre les cellules afin d'obtenir, pour chaque point de fréquence étudié, la mesure des vitesses de rotation évaluée par un programme développé sous Matlab[®]. Avec notre plateforme expérimentale, il serait envisageable de faire des essais par diélectrophorèse à ondes progressives sur des bactéries, cellules difficilement caractérisables par électrorotation : leur taille qui est de l'ordre du micromètre ne permet pas une observation aisée de celles-ci, en particulier en rotation. L'emploi et la réalisation d'un microsystème d'électrodes rectangulaires disposées en lignes seraient alors à envisager. L'étude des communautés bactériennes, présentes par exemple dans le sol, pourrait permettre d'appréhender leur comportement suite à l'application d'une contrainte électromagnétique.

Nous avons développé, dans un troisième chapitre, les méthodes d'identification paramétrique par minimisation dans le cadre d'un modèle cellulaire à 2 compartiments. L'influence de certains paramètres intrinsèques des cellules sur leur spectre est ainsi mise en évidence. A partir de ces méthodes et d'une étude d'analyse de variances, nous avons mis en avant l'influence de la conductivité du milieu sur le spectre d'électrorotation : ajuster ce paramètre permet d'étendre la gamme de basses fréquences où les propriétés électriques de la membrane prédominent. Nous avons également montré qu'étant donné la faible épaisseur de la membrane et son caractère fortement résistif, il était parfois difficile d'extraire la conductance membranaire. La plateforme expérimentale permet l'acquisition automatique et fiable des spectres d'électrorotation ainsi que l'exploitation des paramètres diélectriques de cellules en vue d'alimenter le développement des modèles cellulaires.

Enfin, dans un dernier chapitre, nous avons tout d'abord étudié les levures dont nous avons extrait les paramètres électriques qui nous ont permis de valider en partie notre identification paramétrique malgré l'incertitude sur la conductance membranaire. L'étude portant sur l'influence de la conductivité du milieu indique qu'il est plus intéressant d'identifier les propriétés électriques de la membrane pour la plus grande conductivité accessible afin d'avoir le plus de poids possible sur le spectre étudié. Nous avons montré qu'un traitement thermique avait un effet irréversible sur les levures et les détruisait. Un traitement enzymatique n'a pas un effet aussi radical : seule la couche externe est détruite et nous avons ainsi pu montrer la pertinence des modèles à 2 et 3 couches pour les levures. L'étude fréquentielle du comportement diélectrophorétique des levures mortes est formellement différent de ceux des protoplastes ou des levures n'ayant subi aucun traitement. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'étude des liposomes. En effet, la composition lipidique des membranes biologiques dépend du type cellulaire auquel elle est associée [179]. Il est donc intéressant de voir l'impact de la présence de certains lipides dans la membrane : les phospholipides PC et PE font souvent partie de la composition lipidique des cellules. Comme prévu, la membrane des liposomes est isolante du fait de la présence des lipides qui la constituent.

L'investigation du comportement diélectrophorétique des liposomes nous permet principalement d'étudier les propriétés des membranes, puisque les propriétés électriques du milieu interne peuvent être contrôlées, en modifiant leur composition lipidique. Nous avons constaté que le protocole d'extrusion répondait à nos attentes ; en effet, il est possible d'élaborer des liposomes dont le milieu interne est conducteur, cas représentatif du cytoplasme des cellules. Ainsi, nous pouvons envisager l'étude de l'influence de l'insertion de certains lipides comme le cholestérol. Afin de finaliser cette étude, une perspective serait l'insertion de protéines,

contenues habituellement dans les membranes biologiques, dans les bicouches lipidiques des liposomes afin de mieux investiguer les propriétés des membranes. Il pourrait être intéressant de voir si l'orientation des protéines dans la membrane joue un rôle sur leur comportement diélectrophorétique en particulier sur sa polarisation. La complexité du comportement de la matière vivante passe par la maîtrise des interactions au niveau de la cellule. Ainsi, l'étude d'agrégats cellulaires, à partir de la connaissance de la caractérisation d'un type cellulaire, serait une première étape à l'étude des tissus.

En ce qui concerne l'effet des champs magnétiques, de nouvelles sources d'exposition seraient à considérer pour l'étude de l'impact sur le comportement diélectrophorétique des cellules vivantes. Dans la continuité et en parallèle de cette thèse, des travaux portant sur la modélisation de l'électrorotation sont développés afin de mieux appréhender les phénomènes existants lors des expérimentations (effets thermiques et électro-hydrodynamiques). L'approfondissement de l'identification paramétrique est aussi à développer en vue de mieux prendre en compte la morphologie cellulaire. Pour l'avenir, la mise en place d'une salle de culture permet d'envisager l'étude de cellules biologiques plus variées, dont des cellules humaines, et permettra à terme d'élaborer des modèles comportementaux d'un plus grand nombre de types cellulaires. De plus, l'impact de champs magnétiques pourra être apprécié tout comme l'effet d'autres traitements sur les cellules.

TABLE DES FIGURES

Chapitre I :

Figure I.1 : Dimensions caractéristiques des structures biologiques et technologiques.....	4
Figure I.2 : Structure d'une membrane : toute bicouche peut se refermer sur elle-même pour former une cellule.....	5
Figure I.3 : Structure d'une cellule eucaryote	5
Figure I.4 : Structure d'une cellule procaryote	6
Figure I.5 : La cellule adhère sur le substrat via des complexes d'adhésion	7
Figure I.6 : (a) Isovaleurs de la densité de flux magnétique issu d'une source magnétique. Modification de cartographie suite à la présence d'un corps (b) ferromagnétique (c) paramagnétique (d) diamagnétique.....	8
Figure I.7 : Echelle de susceptibilités magnétiques (unité SI).....	8
Figure I.8 : Bactéries magnétotactiques : <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	9
Figure I.9 : Lignes de champ électrique (a) cas où la particule est plus (b) ou moins polarisable que le milieu.....	10
Figure I.10 : Modèle de circuit équivalent pour une cellule en suspension	10
Figure I.11 : Modèle monocouche d'une cellule de forme supposée sphérique	10
Figure I.12 : La permittivité complexe est fonction de la fréquence ; comportement pour une cellule à 2 couches	12
Figure I.13 : Différences biophysiques et diélectriques entre des cellules atteintes ou non de paludisme	13
Figure I.14 : a) Attraction d'une particule magnétique suspendue dans un milieu diamagnétique b) Répulsion d'une particule diamagnétique suspendue dans un milieu paramagnétique	15
Figure I.15 : Grenouille en lévitation au-dessus d'une bobine qui produit un champ magnétique de 16T	15
Figure I.16 : Micro positionnement en 2D et sans contact de billes de latex	15
Figure I.17 : Micro positionnement sans contact de levures	16
Figure I.18 : Principe de la balance de Gouy	16
Figure I.19 : Balance d'Evans : mesure de susceptibilité magnétique volumique	17
Figure I.20 : Principe d'un magnétomètre à SQUID	17
Figure I.21 : Schéma du dispositif de mesure magnétique sur des microsphères	19
Figure I.22 : Dispositif générant un champ magnétique constant	19
Figure I.23 : Illustration de la composante « radiative » (à gauche) et « gradient » (à droite) de la force optique.....	21
Figure I.24 : Manipulation de particules d'indice de réfraction plus grand que celui du milieu.....	21
Figure I.25 : Schéma descriptif simplifié de l'expérience de magnétocytométrie	23
Figure I.26 : (a) Aspiration de l'échantillon (b) Modèle aux éléments finis, l'aspiration est représentée par une pression ΔP appliquée à l'intérieur d'une région circulaire délimitée par le rayon interne de la micropipette	23
Figure I.27 : Etirement d'une cellule par des microplaques de verre	23
Figure I.28 : Schéma d'un dispositif de spectroscopie électrique d'impédance	24
Figure I.29 : Spectres d'impédance électrique en amplitude et en phase pour différentes populations de cellules	25
Figure I.30 : Spectre de taux de collecte de cellules K652 et K652AR	25
Figure I.31 : (A) Séquences d'images montrant le comportement de particules de latex à différentes fréquences (B) Tracé du taux de collecte en fonction de la fréquence,.....	26
Figure I.32 : Particule passant deux électrodes dans un micro canal et signal d'impédance de la cellule.....	27
Figure I.33 : Prototype de microcapteur combinant une partie microfluidique et une partie hyperfréquence	27
Figure I.34 : Schéma de principe de la séparation flux-force	28
Figure I.35 : De gauche à droite : la particule est moins, plus et autant polarisable que le milieu environnant	31
Figure I.36 : Electrodes rectangulaires interdigitées	32
Figure I.37 : Principe de l'électrorotation.....	32
Figure I.38 : Evolution typique des parties réelle et imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence pour une cellule vivante dans un milieu aqueux peu conducteur	33
Figure I.39 : Modèle et distribution de charges à proximité de la paroi d'un diélectrique immergé dans un milieu conducteur	35
Figure I.40 : Différentes types de réponse de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (A) sphère homogène (B) sphère monocouche (C) sphère à trois couches	36
Figure I.41 : Spectre d'électrorotation expérimental (o) et théorique (-) d'une cellule DS19 modélisée par le modèle monocouche.....	37
Figure I.42 : Spectres d'électrorotation de levures dans quatre milieux de conductivités différentes	39
Figure I.43 : Tracé de l'opposé de $\text{Im}(K(\omega))$ de cellules Jurkat dans quatre milieux de conductivités différentes.....	40
Figure I.44 : Image au microscope optique de la séparation de cellules de <i>Listeria</i> mortes et vivantes à 50 kHz.....	41

Chapitre II :

Figure II.45 : Formules chimiques du DOPC, NBD PE et NBD PC	45
Figure II.46 : Décollement des bicouches par application d'un champ perpendiculairement aux feuillets	45
Figure II.47 : Chambre d'électroformation lors de la phase de remplissage de celle-ci	46
Figure II.48 : Observation de liposomes lors de l'électroformation	46
Figure II.49 : Assemblage de l'extruder	47
Figure II.50 : Extrusion.....	47
Figure II.51 : Dispositif expérimental	48
Figure II.52 : Forme d'électrodes étudiées pour l'électrorotation	48
Figure II.53 : Electrodes polynomiales : carte du module de E^2	49
Figure II.54 : Alimentation des électrodes (a) cas de la diélectrophorèse (b) cas de l'électrorotation.....	49
Figure II.55 : Cage octopole 3D	50
Figure II.56 : Etapes de réalisation des motifs des électrodes	51
Figure II.57 : Electrodes polynomiales (a) microsystème, (b) branchement	51
Figure II.58 : Connexion du matériel électrique	52
Figure II.59 : Interface graphique pour l'utilisateur.....	52
Figure II.60 : Principe de transmission optique d'un microscope inversé	53
Figure II.61 : Influence de la conductivité sur l'osmolarité (conductivité ajustée par ajout de KCl)	55
Figure II.62 : A gauche, image d'origine en niveau de gris et à droite, effet du filtrage passe-haut	59
Figure II.63 : Traitement d'images : binarisation, suppression du bruit et remplissage des contours	59
Figure II.64 : Détermination de l'orientation de l'objet sous Matlab	59
Figure II.65 : Étiquetage des objets	60
Figure II.66 : Repérage des cellules isolées	61
Figure II.67 : Traitement des données de mesure d'orientation des cellules suivies	62
Figure II.68 : Suivi des sept cellules isolées identifiées dans la séquence	62

Chapitre III :

Figure III.69 : Spectre d'électrorotation : spectre médian et sa dispersion	68
Figure III.70 : Variations partielles relatives aux propriétés électriques du cytoplasme	69
Figure III.71 : Variations partielles relatives aux propriétés électriques de la membrane	69
Figure III.72 : Résultats obtenus avec la méthode de minimisation non pondérée et avec pondération	72
Figure III.73 : Résultats obtenus avec les quatre méthodes de minimisation	74
Figure III.74 : Résultats obtenus avec la méthode de minimisation contrainte ou non	76
Figure III.75 : Résultats obtenus avec les quatre méthodes de minimisation pour une largeur de bande de ± 10 %	77
Figure III.76 : Résultats obtenus avec les quatre méthodes de minimisation pour une largeur de bande de ± 30 %	77
Figure III.77 : Influence de la conductivité du milieu d'immersion	78
Figure III.78 : Simulation de spectres pour des cellules de rayon 1, 5, 10 et 15 μm	79
Figure III.79 : Spectre d'électrorotation : spectre moyen et spectre médian	81

Chapitre IV :

Figure IV.80 : Spectre d'électrorotation des levures vivantes : vitesses moyennes de rotation et écarts-types.....	84
Figure IV.81 : Spectres d'électrorotation de levures dans des milieux présentant différentes conductivités	85
Figure IV.82 : Spectres d'électrorotation pour des levures vivantes et mortes à la suite d'un traitement thermique	86
Figure IV.83 : Tracé des spectres simulé et expérimental des levures mortes.....	87
Figure IV.84 : Spectres d'électrorotation pour des levures mortes passées ou non au bleu de Trypan	88
Figure IV.85 : Destruction de la paroi cellulaire : levure a) avant et b) après le traitement enzymatique	89
Figure IV.86 : Spectre d'électrorotation des protoplastes de levures : spectre moyen et écarts-types.....	89
Figure IV.87 : Spectre d'électrorotation pour les levures normales et ayant subi un traitement enzymatique	90
Figure IV.88 : Tracé des spectres simulé et expérimental des protoplastes de levures.....	91
Figure IV.89 : Spectre d'électrorotation expérimental et simulé pour des liposomes (lipides de type NBD-PC).....	93
Figure IV.90 : Spectres d'électrorotation de liposomes dont la membrane contient des lipides marqués NBD-PE.....	94
Figure IV.91 : Spectre d'électrorotation expérimental et simulé, cas où la conductivité du milieu vaut 75 mS.m^{-1}	94
Figure IV.92 : Liposomes électroformés soumis à la diélectrophorèse positive et aussi à l'électro-osmose.....	96
Figure IV.93 : Liposomes électroformés soumis à la diélectrophorèse positive et à la diélectrophorèse négative.....	97
Figure IV.94 : Phénomène d'électro-osmose.....	97
Figure IV.95 : Liposomes électroformés contenant des nanoparticules soumis à la diélectrophorèse négative	98
Figure IV.96 : Aimant permanent rectangulaire en Neodyme-Fer-Bore (dimension $2 \times 4 \text{ cm}$)	99

TABLE DES TABLEAUX

Chapitre I :

Tableau I.1 : Valeurs numériques obtenues pour les fréquences extrêmes	11
Tableau I.2 : Caractéristiques de cellules Jurkat et de cellules sanguines	12
Tableau I.3 : Lois d'échelles pour différentes grandeurs physiques	29

Chapitre II :

Tableau II.4 : Résolution de la taille des pixels en fonction de l'objectif correspondant.....	58
--	----

Chapitre III :

Tableau III.5 : Analyse de la variance de Y	70
Tableau III.6 : Analyse de la variance de Y_{pond} quand $\{\sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}, C_{mem}, \xi\}$ sont inconnus	71
Tableau III.7 : Analyse de la variance de Y pour un rayon de cellule de 5 μm	79

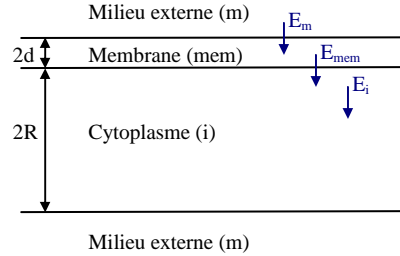
Chapitre IV :

Tableau IV.8 : Analyse de la variance de Y quand $\sigma_m=0$ ou $\sigma_i=0$	95
---	----

ANNEXE I : Modèle analytique de ε_{eq}^* d'une sphère à deux couches

- Approche 1D

En approche 1D, la cellule peut être vue comme suit, chaque milieu ayant ses propres propriétés électriques (conductivité et permittivité) :



La relation du potentiel est donnée par $V = 2d E_{mem} + 2R E_i$. Or, les relations de passage du champ électrique d'une couche à l'autre nous permettent d'écrire les relations : $\varepsilon_m^* E_m = \varepsilon_{mem}^* E_{mem} = \varepsilon_i^* E_i$. Ainsi, on arrive à la relation :

$$V = 2d \frac{\varepsilon_m^*}{\varepsilon_{mem}^*} E_m + 2R \frac{\varepsilon_m^*}{\varepsilon_i^*} E_m = \varepsilon_m^* E_m \left(\frac{2d}{\varepsilon_{mem}^*} + \frac{2R}{\varepsilon_i^*} \right).$$

Les relations équivalentes de notre approche sont $V = (2d + 2R)E_{eq}$ pour l'expression du potentiel et $\varepsilon_m^* E_m = \varepsilon_{eq}^* E_{eq}$ pour les relations de passage.

Au final, la permittivité complexe équivalente d'une cellule modélisée par une sphère à 2 compartiments est : $\varepsilon_{eq}^* = \frac{2R + 2d}{\left(\frac{2d}{\varepsilon_{mem}^*} + \frac{2R}{\varepsilon_i^*} \right)} = \frac{\varepsilon_i^* \varepsilon_{mem}^* (2R + 2d)}{2d\varepsilon_i^* + 2R\varepsilon_{mem}^*}$.

Pour rappel, la permittivité complexe d'un milieu est notée $\varepsilon^* = \varepsilon_r - j \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega}$ avec ε_r la permittivité relative (ε_0 la permittivité du vide) et σ la conductivité. Ainsi, en substituant cette expression dans la relation précédente et en développant celle-ci, on obtient :

$$\varepsilon_{eq}^* = \frac{\left(\varepsilon_i \varepsilon_{mem} - \frac{\sigma_i \sigma_{mem}}{\varepsilon_0^2 \omega^2} \right) - \frac{j}{\varepsilon_0 \omega} (\sigma_i \varepsilon_{mem} + \sigma_{mem} \varepsilon_i)}{2d\varepsilon_i + 2R\varepsilon_{mem} - \frac{j}{\varepsilon_0 \omega} (2d\sigma_i + 2R\sigma_{mem})} (2R + 2d).$$

- Hypothèses

Au regard de paramètres des cellules utilisés, les hypothèses suivantes peuvent-être établies :

$$\begin{aligned} \sigma_{mem} \varepsilon_i \ll \sigma_i \varepsilon_{mem} & \quad \frac{(\sigma_i \varepsilon_{mem} + \sigma_{mem} \varepsilon_i)}{\varepsilon_0 \omega} & \quad \frac{\sigma_i \varepsilon_{mem}}{\varepsilon_0 \omega} \\ 2d \varepsilon_i \ll 2R \varepsilon_{mem} & \quad \text{d'où le terme } 2d\varepsilon_i + 2R\varepsilon_{mem} & \quad \text{tend vers } 2R\varepsilon_{mem} \\ 2R \sigma_{mem} \ll 2d \sigma_i & \quad \frac{(2d\sigma_i + 2R\sigma_{mem})}{\varepsilon_0 \omega} & \quad \frac{2d\sigma_i}{\varepsilon_0 \omega} \end{aligned}$$

- Equation finale de la permittivité

$$\varepsilon_{eq}^* = \left[\frac{\left(\varepsilon_i \varepsilon_{mem} - \frac{\sigma_i \sigma_{mem}}{\varepsilon_0^2 \omega^2} \right) 2R\varepsilon_{mem} + \frac{2d\varepsilon_{mem} \sigma_i^2}{\varepsilon_0^2 \omega^2}}{(2R\varepsilon_{mem})^2 + \left(\frac{2d\sigma_i}{\varepsilon_0 \omega} \right)^2} + j \frac{\left(\varepsilon_i \varepsilon_{mem} - \frac{\sigma_i \sigma_{mem}}{\varepsilon_0^2 \omega^2} \right) \left(\frac{2d\sigma_i}{\varepsilon_0 \omega} \right) - \frac{2R\varepsilon_{mem}^2 \sigma_i}{\varepsilon_0 \omega}}{(2R\varepsilon_{mem})^2 + \left(\frac{2d\sigma_i}{\varepsilon_0 \omega} \right)^2} \right] (2R + 2d)$$

- En basse fréquence

$$\begin{aligned} \text{Les termes} & \quad (2R\varepsilon_{mem})^2 + \left(\frac{2d\sigma_i}{\varepsilon_0 \omega} \right)^2 & \quad \text{tendent vers} & \quad \left(\frac{2d\sigma_i}{\varepsilon_0 \omega} \right)^2 \\ & \quad \varepsilon_i \varepsilon_{mem} - \frac{\sigma_i \sigma_{mem}}{\varepsilon_0^2 \omega^2} & & \quad - \frac{\sigma_i \sigma_{mem}}{\varepsilon_0^2 \omega^2} \end{aligned}$$

Par substitution, la permittivité est équivalente à :

$$\varepsilon_{eq,BF}^* = \left[\frac{\frac{\sigma_i \varepsilon_{mem}}{\varepsilon_0^2 \omega^2} (2d\sigma_i - 2R\sigma_{mem})}{\left(\frac{2d\sigma_i}{\varepsilon_0 \omega} \right)^2} + j \frac{-\frac{2d\sigma_{mem} \sigma_i^2}{\varepsilon_0^3 \omega^3}}{\left(\frac{2d\sigma_i}{\varepsilon_0 \omega} \right)^2} \right] (2R + 2d) \text{ que l'on peut simplifier afin}$$

$$\text{d'obtenir } \varepsilon_{eq,BF}^* = \left[\frac{\varepsilon_{mem}}{4d^2 \sigma_i} (2d\sigma_i - 2R\sigma_{mem}) - \frac{j}{\varepsilon_0 \omega} \frac{\sigma_{mem}}{2} \right] (2R + 2d).$$

Or, les propriétés géométriques et électriques de la cellule nous donnent les approximations suivantes : $2d\sigma_i \gg 2R\sigma_{mem}$ et $2R + 2d \rightarrow 2R$ et par conséquent, on en déduit :

- $\sigma_{eq,BF} = \frac{\sigma_{mem} 2R}{2d}$
- $\varepsilon_{eq,BF,r} = \frac{\varepsilon_{mem} 2R}{2d}$

- **En haute fréquence**

Les termes $(2R\epsilon_{mem})^2 + \left(\frac{2d\sigma_i}{\epsilon_0\omega}\right)^2$ tendent vers $(2R\epsilon_{mem})^2$

$\epsilon_i\epsilon_{mem} - \frac{\sigma_i\sigma_{mem}}{\epsilon_0^2\omega^2}$ $\epsilon_i\epsilon_{mem}$

Par substitution, la permittivité est équivalente à :

$$\epsilon_{eq,HF}^* = \left[\frac{2R\epsilon_i\epsilon_{mem}^2}{(2R\epsilon_{mem})^2} + j \frac{\sigma_i\epsilon_{mem}(2\epsilon_i - 2R\epsilon_{mem})}{(2R\epsilon_{mem})^2(\epsilon_0\omega)} \right] (2R + 2d) \text{ que l'on peut simplifier afin}$$

$$\text{d'obtenir } \epsilon_{eq,HF}^* = \left[\frac{\epsilon_i}{2R} - \frac{j}{\epsilon_0\omega} \frac{\sigma_i}{(2R)^2\epsilon_{mem}} (2R\epsilon_{mem} - 2d\epsilon_i) \right] (2R + 2d).$$

Or, d'après les propriétés géométriques et électriques de la cellule, nous savons que :

$2d\epsilon_i \ll 2R\epsilon_{mem}$ et $2R + 2d \rightarrow 2R$ et par conséquent, on en déduit :

- $\sigma_{eq,HF} = \sigma_i$
- $\epsilon_{eq,HF,r} = \epsilon_i$

ANNEXE II : Protocole d'électroformation

- Préparation des plaques ITO

Les essuyer, les faire tremper dans de l'eau distillée avec quelques gouttes de tampon TWEEN, les rincer à l'eau distillée et essuyer. Si nécessaire, les passer à l'éthanol 70% puis les sécher sous jet. Avec un multimètre, repérer la face conductrice et placer les plaques dans le dessiccateur face conductrice vers le haut.

- Préparation de la solution lipidique

Préparer une solution notée S à base de chloroforme et de méthanol (rapport volumique 9:1). Réaliser :

- la solution mère à partir de 100 mg de DOPC en poudre dilué dans 10 mL de solution S
- la solution de travail à $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ en la diluant avec la solution S

Pour toute combinaison de lipides, établir un protocole au préalable.

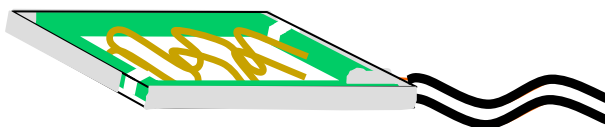
- Dépôt de la solution sur les plaques

Déposer $10 \mu\text{L}$ de solution lipidique sur les faces conductrices sans entremêler la solution, il faut étirer chaque goutte déposée. Mettre sous vide pendant 2 heures.

- Préparation de la solution « interne » : milieu à 50 mM

- Préparation de la chambre d'électroformation

Poser 1 bande de cuivre sur un bord de chaque face conductrice. Mettre le joint autocollant en place sur une des 2 plaques et fermer la chambre avec la 2nde plaque. Placer 2 aiguilles en vis-à-vis à travers l'épaisseur du joint et sceller la chambre avec de la bougie.



- Procédé final

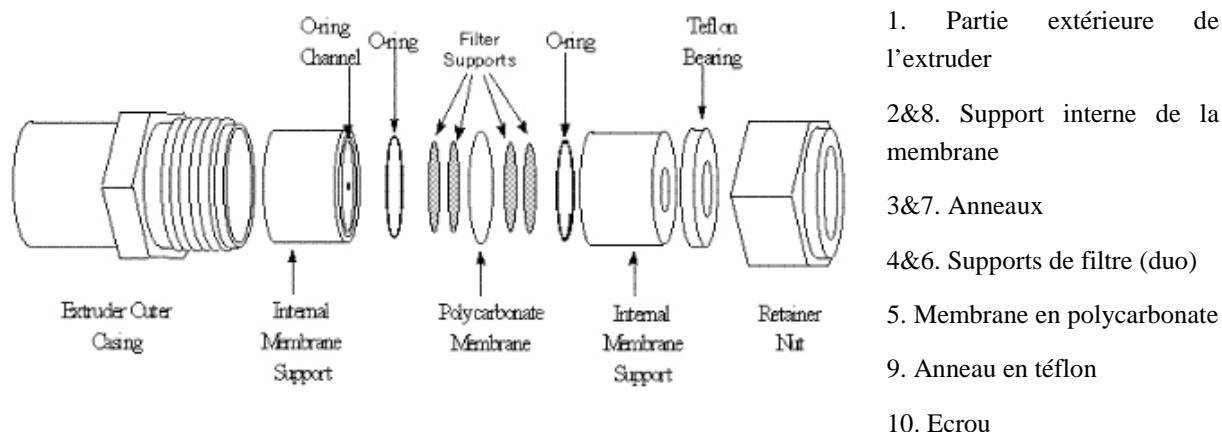
Mettre en place le câble bi-coaxial et le brancher sur les 2 fils de cuivre puis, pour le générateur, appliquer $0,2 V_{\text{rms}}$ sous 10 Hz. Remplir lentement la chambre avec la solution « interne ». Ensuite, suivre la procédure suivante pour l'évolution des signaux, tout en veillant à surveiller la formation des liposomes :

- $0,2 \text{ V } 10 \text{ Hz}$: pendant 15 min
- $0,5 \text{ V } 10\text{Hz}$: pendant 30 min
- $1 \text{ V } 10 \text{ Hz}$: pendant 15 min
- $1,3\text{V } 10 \text{ Hz}$: pendant 1 à 2 h
- $0,3 \text{ V } 4 \text{ Hz}$: pendant 15 min

ANNEXE III : Protocole d'extrusion

- Assemblage de l'extruder

Placer les éléments comme ci-dessous, les filtres devant être humidifiés avant d'être insérés dans l'ensemble.



- Préparation de l'extruder

Placer le support de l'extruder, l'extruder assemblé et les seringues dans un four à 45°C.

- Préparation de la solution « interne » :

Préparer une solution aqueuse dont l'osmolarité et la conductivité sont ajustées selon le choix de l'utilisateur.

- Préparation de la solution lipidique

Le volume utile est 1 mL mais la préparation est identique à celle présentée dans l'Annexe II. Evaporer les solvants puis hydrater le mélange avec la solution « interne » pendant au moins 30 minutes à 45°C. Puis la soumettre à 4 cycles de gel/dégel de plusieurs minutes chacun.

- Procédé final

Remplir une des seringues avec la solution précédemment préparée. Placer les seringues (l'une remplie, l'autre vide) dans l'extruder. Insérer l'ensemble dans le support chauffant. Pousser doucement le piston de la seringue remplie jusqu'au transfert complet et faire de même avec la seringue alternée jusqu'à la seringue originale. Répéter cette opération 6 fois. L'extrusion finale devant remplir la seringue alternée. Stocker la préparation de vésicules au-dessus de la température de transition du lipide pendant l'expérience. Quand la solution n'est pas utilisée, stocker la solution à 4°C.

ANNEXE IV : Variance et effet total

- Variance

Le théorème de la variance montre que la variance peut être décomposée en des termes dus à l'effet de chaque paramètre et aux interactions entre eux (ce qui permet de découpler les effets des paramètres par rapport aux autres) :

$$\begin{aligned} Var(\Omega_i) = & Var(\Omega_i | \sigma_i) + Var(\Omega_i | \varepsilon_{i,r}) + Var(\Omega_i | G_{mem}) + Var(\Omega_i | C_{mem}) + Var(\Omega_i | \xi) + \\ & Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, G_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, C_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, \xi) + \\ & Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, C_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, \xi) + \\ & Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}, C_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}, \xi) + \\ & Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}, C_{mem}, \xi) \end{aligned}$$

où $Var(\Omega_i | \sigma_i)$ représente la variance partielle de Ω_i en fonction de σ_i seul et $Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r})$ la variance partielle due à σ_i et $\varepsilon_{i,r}$ et ainsi de suite.

- Effet total imputé à σ_i

Il est défini comme la somme des variances partielles impliquant ce terme :

$$\begin{aligned} Tot(\Omega_i | \sigma_i) = & Var(\Omega_i | \sigma_i) + \\ & Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, G_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, C_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, \xi) + \\ & Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, C_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, \xi) + \\ & Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}, C_{mem}) + Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}, \xi) + \\ & Var(\Omega_i | \sigma_i, \varepsilon_{i,r}, G_{mem}, C_{mem}, \xi) \end{aligned}$$

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. Salomé, P.-F. Lenne, and N. Destainville, "Membranes biologiques : vers un modèle physique," *Images de la physique*, pp. 74-79, 2006.
- [2] N. Minc and J.-L. Viovy, "Microfluidique et applications biologiques : enjeux et tendances," *Comptes Rendus Physique*, vol. 5, pp. 565-575, 2004.
- [3] J. P. Desai, A. Pillarisetti, and A. D. Brooks, "Engineering approaches to biomanipulation," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 9, pp. 35-53, 2007.
- [4] P. Tracqui and J. Ohayon, "Transmission of Mechanical Stresses within the Cytoskeleton of Adherent Cells: A Theoretical Analysis Based on a Multi-Component Cell Model," *Acta Biotheoretica*, vol. 52, pp. 323-341, 2004.
- [5] R. M. Hochmuth, N. Mohandas, and P. L. Blackshear Jr, "Measurement of the Elastic Modulus for Red Cell Membrane Using a Fluid Mechanical Technique," *Biophysical Journal*, vol. 13, pp. 747-762, 1973.
- [6] A. Iglic, P. Veranic, U. Batista, and V. Kralj-Iglic, "Theoretical analysis of shape transformation of V-79 cells after treatment with cytochalasin B," *Journal of Biomechanics*, vol. 34, pp. 765-772, 2001.
- [7] G. N. Maksym, B. Fabry, J. P. Butler, D. Navajas, D. J. Tschumperlin, J. D. Laporte, and J. J. Fredberg, "Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz," *J Appl Physiol*, vol. 89, pp. 1619-1632, 2000.
- [8] O. P. Hamill and B. Martinac, "Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells," *Physiol. Rev.*, vol. 81, pp. 685-740, 2001.
- [9] S. Portet, "Caractérisation et modélisation de l'organisation morphofonctionnelle du cytosquelette lors des processus de mécanotransduction," 2001.
- [10] A. Saez, M. Ghibaudo, B. Ladoux, A. Buguin, and P. Silberzan, "Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat."
- [11] M. C. Frame, V. J. Fincham, N. O. Carragher, and J. A. Wyke, "v-SRC'S hold over actin and cell adhesions," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, pp. 233-245, 2002.
- [12] C.-M. Lo, H.-B. Wang, M. Dembo, and Y.-l. Wang, "Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate," *Biophysical Journal*, vol. 79, pp. 144-152, 2000.
- [13] S. Portet, J. Vassy, M. Beil, G. Millot, A. Hebbache, J. P. Rigaut, and D. Schoëvaërt, "Quantitative analysis of cytokeratin network topology in the MCF7 cell line," *Cytometry*, vol. 35, pp. 203-213, 1999.
- [14] E. Velzenberger, M. Vayssade, G. Legeay, and M.-D. Nagel, "Study of cell behaviour on a cellulose anti-adhesive substratum," *Cellulose*, vol. 15, pp. 347-357, 2008.
- [15] R. H. Carlson, C. V. Gabel, S. S. Chan, R. H. Austin, J. P. Brody, and J. W. Winkelman, "Self-sorting of white blood cells in a lattice," *Physical review letters* vol. 79, pp. 2149-2152, 1997.
- [16] M. Godin, A. K. Bryan, T. P. Burg, K. Babcock, and S. R. Manalis, "Measuring the mass, density, and size of particles and cells using a suspended microchannel resonator," *Applied Physics Letters*, vol. 91, pp. 123121-3, 2007.
- [17] M. Toubal, M. Asmani, E. Radziszewski, and B. Nongaillard, "Acoustic measurement of compressibility and thermal expansion coefficient of erythrocytes," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 44, pp. 1277-1287, 1999.
- [18] T. Laurell, F. Petersson, and A. Nilsson, "Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, pp. 492-506, 2007.
- [19] J. C. Jeffrey, H. Seungjoo, Z. Yang, M. Kara, M. Lee, Z. Maciej, and P. S. Williams, "Quantification of cellular properties from external fields and resulting induced

- velocity: Magnetic susceptibility," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 64, pp. 519-526, 1999.
- [20] J. F. Schenck, "Safety of Strong, Static Magnetic Fields," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 12, pp. 2-19, 2000.
- [21] E. Wajnberg, L. H. S. de Souza, H. G. P. L. de Barros, and D. M. S. Esquivel, "A Study of Magnetic Properties of Magnetotactic Bacteria," *Biophysical Journal*, vol. 50, pp. 451-455, 1986.
- [22] V. Zablotskii, V. Yurchenko, Y. Kamysa, and M. Chelombetskaya, "Calculations of magnetic susceptibility of magnetotactic bacteria culture," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 234, pp. 575-583, 2001.
- [23] H. Lee, A. M. Purdon, V. Chu, and R. M. Westervelt, "Controlled assembly of magnetic nanoparticles from magnetotactic bacteria using microelectromagnets arrays," *Nanoletters*, vol. 4, pp. 995-998, 2004.
- [24] E. M. Haacke, L. Weili, H. Xiaoping, and T. Keith, "A current perspective of the status of understanding BOLD imaging and its use in studying brain function: a summary of the workshop at the University of North Carolina in Chapel Hill, 26-28 October, 2000," *NMR in Biomedicine*, vol. 14, pp. 384-388, 2001.
- [25] K. R. Thulborn, J. C. Waterton, P. M. Matthews, and G. K. Radda, "Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 714, pp. 265-270, 1982.
- [26] R. Fernández-Prini and R. B. Dooley, "Release on the Refractive Index of Ordinary Water Substance as a Function of Wavelength, Temperature and Pressure," *International Association for the Properties of Water and Steam*, pp. 1-7, 1997.
- [27] B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuhe, Y. Emery, C. Depeursinge, and P. J. Magistretti, "Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy " *Optics express*, vol. 13, pp. 9361-9373, 2005.
- [28] X. J. Liang, A. Q. Liu, C. S. Lim, T. C. Ayi, and P. H. Yap, "Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 133, pp. 349-354, 2007.
- [29] Y. L. Jin, J. Y. Chen, L. Xu, and P. N. Wang, "Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection,," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 51, pp. 371-379, 2006.
- [30] K. M. Tyner, R. Kopelman, and M. A. Philbert, "'Nanosized Voltmeter' Enables Cellular-Wide Electric Field Mapping," *Biophysical Journal*, vol. 93, pp. 1163-1174, 2007.
- [31] J. Gimsa, "Particle characterization by AC-electrokinetic phenomena: 1. A short introduction to dielectrophoresis (DP) and electrorotation (ER)," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 149, pp. 451-459, 1999.
- [32] H. Fricke, "The Electric Capacity of Suspensions of Red Corpuscles of a Dog," *Physical Review*, vol. 26, pp. 682, 1925.
- [33] T. Sun, S. Gawad, C. Bernabini, N. G. Green, and H. Morgan, "Broadband single cell impedance spectroscopy using maximum length sequences: theoretical analysis and practical considerations," *Measurement Science and Technology*, vol. 18, pp. 2859-2868, 2007.
- [34] M. P. Hughes, X.-B. Wang, F. F. Becker, P. R. C. Gascoyne, and R. Pethig, "Computer-aided analyses of electric fields used in electrorotation studies," *J.Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 27, pp. 1564-1570, 1994.

- [35] A. Di Biasio and C. Cametti, "Effect of shape on the dielectric properties of biological cell suspensions," *Bioelectrochemistry*, vol. 71, pp. 149-156, 2007.
- [36] O. G. Martinsen, S. Grimnes, and H. P. Schwan, "Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue," *Encyclopedia of surface and colloid science*, pp. 2643-2652, 2002.
- [37] N. Siauve, R. Scorretti, N. Burais, L. Nicolas, and A. Nicolas, "Electromagnetic fields and human body: a new challenge for the electromagnetic field computation," *The International Journal for Computation and Mathematics in Electrical and Electronic Engineering*, vol. 22, pp. 457-469, 2003.
- [38] A. M. Bottreau, J. M. Moreau, J. M. Laurent, and C. Marzat, "A method analyzing the dielectric relaxation spectra of mixtures by decomposition into Debye elementary domains. Application to the study of the water spectrum," *The journal of chemical physics*, vol. 62, pp. 360-365, 1975.
- [39] T. S. light, S. Licht, A. C. Bevilacqua, and K. R. Morash, "The fundamental conductivity and resistivity of water," *Electrochemical and Solid-State Letters*, vol. 8, pp. 16-19, 2005.
- [40] C. Dalton, A. D. Goater, J. P. H. Burt, and H. V. Smith, "Analysis of parasites by electrorotation," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 96, pp. 24-32, 2004.
- [41] P. R. C. Gascoyne and J. Vykoukal, "Dielectrophoresis-based sample handling in general-purpose programmable diagnostic instruments," presented at IEEE, 2004.
- [42] G. M. Whitesides, R. J. Kazlauskas, and L. Josephson, "Magnetic separation in biotechnology," *Trends in Biotechnology*, vol. 1, pp. 144-148, 1983.
- [43] P. Gascoyne, R. Pethig, J. Satayavivad, F. F. Becker, and M. Ruchirawat, "Dielectrophoretic detection of changes in erythrocyte membranes following malarial infection," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1323, pp. 240-252, 1997.
- [44] L. M. Broche, N. Bhadal, M. P. Lewis, S. Porter, M. P. Hughes, and F. H. Labeed, "Early detection of oral cancer - Is dielectrophoresis the answer?," *Oral Oncology*, vol. 43, pp. 199-203, 2007.
- [45] P. M. Patel, A. Bhat, and G. H. Markx, "A comparative study of cell death using electrical capacitance measurements and dielectrophoresis," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 43, pp. 523-530, 2008.
- [46] H. Andersson and A. van den Berg, "Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 15, pp. 44-49, 2004.
- [47] M. Kersaudy-Kerhoas, R. Dhariwal, and M. P. Y. Desmulliez, "Recent advances in microparticle continuous separation," *IET Nanobiotechnology*, vol. 2, pp. 1-13, 2008.
- [48] H. Watarai and M. Namba, "Magnetophoretic fractionation of microparticles in aqueous media in capillary flow system," *Analytical sciences*, vol. 17, pp. 169-171, 2001.
- [49] U. O. Häfeli, M. A. Lobedann, J. Steingroewer, L. R. Moore, and J. Riffle, "Optical method for measurement of magnetophoretic mobility of individual magnetic microspheres in defined magnetic field," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 293, pp. 224-239, 2005.
- [50] H. Watarai, M. Suwa, and Y. Iguni, "Magnetophoresis and electromagnetophoresis of microparticles in liquids," *Abal Bioanal Chem*, vol. 378, pp. 1693-1699, 2004.
- [51] S. A. Peynam, E. Y. Kwan, O. Margaron, A. Iles, and N. Pamme, "Diamagnetic repulsion : a versatile tool for label-free particle handling in microfluidic devices," *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, pp. 9055-9062, 2009.
- [52] Dynal, "Human cell separation and expansion with Dynabeads," Invitrogen 2006.

- [53] M. V. Berry and A. K. Geim, "Of flying frogs and levitrons," *European Journal of Physics*, vol. 18, pp. 307-313, 1997.
- [54] H. Chetouani, "Microsystèmes et micromanipulation à lévitation diamagnétique : conception, réalisation et application à la microfluidique digitale et à la biologie," in *Institut National Polytechnique de Grenoble*, 2007.
- [55] M. Frénéa-Robin, H. Chetouani, N. Haddour, H. Rostaing, J. Laforet, and G. Reyne, "Contactless diamagnetic trapping of living cells onto a micromagnet array," presented at 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2008.
- [56] A. Pacault, H. Gasparoux, and F. Hardouin, "Magnétométrie et Thermomagnétométrie," *Techniques de l'ingénieur*, vol. P535, pp. 1-16, 1987.
- [57] G. inc., "Magnetic susceptibility balance : instruction manual (Maqway MSB Mk1)," 2004.
- [58] U. O. Häfeli, R. Ciocan, and J. P. Dailey, "Characterization of magnetic particles and microspheres and their magnetophoretic mobility using a digital microscopy method," *European Cells and Materials*, vol. 3, pp. 24-27, 2002.
- [59] J. J. Chalmers, Y. Zhao, M. Nakamura, K. Melnik, L. Lasky, L. Moore, and M. Zborowski, "An instrument to determine the magnetophoretic mobility of labeled, biological cells and paramagnetic particles," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 194, pp. 231-241, 1999.
- [60] L. R. Moore, M. Zborowski, M. Nakamura, K. McCloskey, S. Gura, M. Zuberi, S. Margel, and J. J. Chalmers, "The use of magnetite-doped polymeric microspheres in calibrating cell tracking velocimetry," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 44, pp. 115-130, 2000.
- [61] A. Ashkin, "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure," *Physical Review Letters*, vol. 24, pp. 156, 1970.
- [62] M. Nieto-Vesperinas, P. Chaumet, and A. Rahmani, "Near-field photonic forces," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 362, pp. 719-737, 2004.
- [63] M. Ozkan, M. Wang, C. Ozkan, R. Flynn, and S. Esener, "Optical Manipulation of Objects and Biological Cells in Microfluidic Devices," *Biomedical Microdevices*, vol. 5, pp. 61-67, 2003.
- [64] R. A. Flynn, A. L. Birkbeck, M. Gross, M. Ozkan, B. Shao, M. M. Wang, and S. C. Esener, "Parallel transport of biological cells using individually addressable VCSEL arrays as optical tweezers," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 87, pp. 239-243, 2002.
- [65] J. Alexandr and Z. Pavel, "Light at work: The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis," *ELECTROPHORESIS*, vol. 29, pp. 4813-4851, 2008.
- [66] M. Lahmani, P. Boisseau, and P. Houdy, *Les nanosciences Tome 3 Nanobiotechnologies et nanobiologie* 2007.
- [67] O. Thoumine, P. Kocian, A. Kottelat, and J.-J. Meister, "Short-term binding of fibroblasts to fibronectin: optical tweezers experiments and probabilistic analysis " *European Biophysics Journal*, vol. 29, pp. 398-408, 2000.
- [68] G. Lenormand, S. Hénon, A. Richert, J. Siméon, and F. Gallet, "Direct Measurement of the Area Expansion and Shear Moduli of the Human Red Blood Cell Membrane Skeleton " *Biophysical Journal* vol. 81, pp. 43-56, 2001.
- [69] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T. J. Moon, C. C. Cunningham, and J. Käs, "The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells " *Biophysical Journal*, vol. 81, pp. 767-784, 2001.

- [70] A. Kamgoué, J. Ohayon, and P. Tracqui, "Caractérisation des propriétés mécaniques de cellules adhérentes : interprétation des mesures issues de la technique des pinces optiques," presented at 18ème Congrès Français de Mécanique, 2007.
- [71] S. Umehara, Y. Wakamoto, I. Inoue, and K. Yasuda, "On-chip single-cell microcultivation assay for monitoring environmental effects on isolated cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 305, pp. 534-540, 2003.
- [72] F. H. C. Crick and A. F. W. Hughes, "The Physical Properties of Cytoplasm: A Study by Means of the Magnetic Particle Method, Part I. Experimental," *Experimental Cell Research*, pp. 37-80, 1950.
- [73] T. R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette, "The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule " *Science* vol. 271, pp. 1835-1837, 1996.
- [74] C. Gosse and V. Croquette, "Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level," *Biophys J.*, vol. 82, pp. 3314-3329, 2002.
- [75] B. Fabry, G. N. Maksym, R. D. Hubmayr, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, "Implications of heterogeneous bead behavior on cell mechanical properties measured with magnetic twisting cytometry," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 194, pp. 120-125, 1999.
- [76] V. Laurent, "Apports en mécanique cellulaire de la micromanipulation par magnétocytométrie et par micropipette : applications à l'étude de la cellule épithéliale dans son microenvironnement," in *Université de Paris 06*, 2000.
- [77] T. Boudou, J. Ohayon, Y. Arntz, G. Finet, C. Picart, and P. Tracqui, "An extended modeling of the micropipette aspiration experiment for the characterization of the Young's modulus and Poisson's ratio of adherent thin biological samples: Numerical and experimental studies," *Journal of Biomechanics*, vol. 39, pp. 1677-1685, 2006.
- [78] N. Desprat, A. Richert, J. Simeon, and A. Asnacios, "Creep Function of a Single Living Cell," *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 2224-2233, 2005.
- [79] J.-L. Viovy, "Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms," *Reviews of Modern Physics*, vol. 72, pp. 813, 2000.
- [80] L. L. Sohn, O. A. Saleh, G. R. Facer, A. J. Beavis, R. S. Allan, and D. A. Notterman, "Capacitance cytometry: Measuring biological cells one by one," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, pp. 10687-10690, 2000.
- [81] S. K. Mohanty, S.K. Ravula, K. Engisch, and A. B. Frazier, "Micro electrical impedance spectroscopy of bovine chromaffin cells," *IEEE-EMB Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology 2nd Annual International*, pp. 485-488, 2002.
- [82] K. Asami, "Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 305, pp. 268-277, 2002.
- [83] H. Hillebrandt, A. Abdelghani, C. Abdelghani-Jacquín, M. Aepfelbacher, and E. Sackmann, "Electrical and optical characterization of thrombin-induced permeability of cultured endothelial cell monolayers on semiconductor electrode arrays " *Applied Physics A*, vol. 73, pp. 539-549, 2001.
- [84] H. E. Ayliffe, A. B. Frazier, and R. D. Rabbitt, "Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrater metal electrodes," *IEEE Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 8, pp. 50-57, 1999.
- [85] A. Han, K.-H. Han, S. K. Mohanty, and A. B. Frazier, "Microsystems for whole blood purification and electrophysiological analysis," *Journal of Semiconductor Technology and Science*, vol. 5, pp. 1-10, 2005.

- [86] K. Asami and T. Yonezawa, "Dielectric behavior of non-spherical cells in culture," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1245, pp. 317-324, 1995.
- [87] G. H. Markx and C. L. Davey, "The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 25, pp. 161-171, 1999.
- [88] H. A. Pohl and J. S. Crane, "Dielectrophoresis of Cells," *Biophysical Journal*, vol. 11, pp. 711-727, 1971.
- [89] D. J. Bakewell and H. Morgan, "Quantifying dielectrophoretic collections of sub-micron particles on microelectrodes," *Measurement Science and Technology*, vol. 15, pp. 254-266, 2004.
- [90] L. M. Broche, F. H. Labeed, and M. P. Hughes, "Extraction of dielectric properties of multiple populations from dielectrophoretic collection spectrum data," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 50, pp. 2267-2274, 2005.
- [91] F. H. Labeed, H. M. Coley, H. Thomas, and M. P. Hughes, "Assessment of multidrug resistance reversal using dielectrophoresis and flow cytometry," *Biophys J.*, vol. 85, pp. 2028-2034, 2003.
- [92] J. P. H. Burt, T. A. K. Al-Ameen, and R. Pethig, "An optical dielectrophoresis spectrometer for low-frequency measurements on colloidal suspensions," *J. Phys. E. : Sci. Instrum.*, vol. 22, pp. 952-957, 1989.
- [93] N. G. Green and H. Morgan, "Dielectrophoretic investigations of sub-micrometre latex spheres," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 30, pp. 2626-2633, 1997.
- [94] M. P. Hughes and H. Morgan, "An evanescent-field technique for dielectrophoresis studies of colloidal particles," *Measurement Science and Technology*, vol. 10, pp. 759-762, 1999.
- [95] J. Suehiro, R. Yatsunami, R. Hamada, and M. Hara, "Quantitative estimation of biological cell concentration suspended in aqueous medium by using dielectrophoretic impedance measurement method," *J. Phys. D: Appl. Phys*, vol. 32, pp. 2814-2820, 1999.
- [96] S. Gawad, M. Wüthrich, and L. Schild, "On chip impedance-spectroscopy for flow-cytometry using a differential electrode sensor," presented at Transducers '01, 2001.
- [97] T. Sun, C. van Berkel, N. Green, and H. Morgan, "Digital signal processing methods for impedance microfluidic cytometry," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 6, pp. 179-187, 2009.
- [98] G. R. Facer, D. A. Notterman, and L. L. Sohn, "Dielectric spectroscopy for bioanalysis: From 40 Hz to 26.5 GHz in a microfabricated wave guide," *Applied Physics Letters*, vol. 78, pp. 996-998, 2001.
- [99] A. Treizebre, "BioMEMS Terzhertz pour l'étude du trafic informationnel de cellules biologiques," 2007.
- [100] A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, N.-E. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko, and B. Bocquet, "Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 154-160, 2009.
- [101] G. H. Markx, R. Pethig, and J. Rousselet, "The dielectrophoretic levitation of latex beads, with reference to field-flow fractionation," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 30, pp. 2470-2477, 1997.
- [102] G. Fuhr, W. N. Arnold, and R. Hagedorn, "Levitation, holding and rotation of cells within traps made by high-frequency fields," *Biochem Biophys Acta*, vol. 1108(2), pp. 215-23, 1992.
- [103] C. Li, H. David, and M. Hywel, "The dielectrophoretic levitation and separation of latex beads in microchips," *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 3893-3901, 2001.

- [104] M. P. Hughes, "Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems," *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 2569-2582, 2002.
- [105] J. Vykoukal, J. Yang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, "A combined dielectrophoretic and field-flow fractionation microsystem for biomedical separation and analysis," presented at Micro Total Analysis Systems, 2000.
- [106] Y. Huang, X. B. Wang, F. F. Becker, and P. R. Gascoyne, "Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation," *Biophysical Journal*, vol. 73, pp. 1118-1129, 1997.
- [107] P. Wanichapichart, S. Bunthawin, A. Kaewpaiboon, and K. Kanchanapoom, "Determination of cell dielectric properties using dielectrophoretic technique," *Science Asia*, vol. 28, pp. 113-119, 2002.
- [108] P. Tabeling, *Introduction à la microfluidique*, 2003.
- [109] J. Voldman, "Electrical forces for microscale cell manipulation," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 8, pp. 425-454, 2006.
- [110] D. Kell, A. Woodward, E. Davies, R. Todd, M. Evans, and J. Rowland, "Nonlinear Dielectric Spectroscopy of Biological Systems: Principles and Applications," in *Nonlinear Dielectric Phenomena in Complex Liquids*, 2005, pp. 335-344.
- [111] K. Asami and T. Yonezawa, "Dielectric behavior of wild-type yeast and vacuole-deficient mutant over a frequency range of 10 kHz to 10 GHz," *Biophysical Journal*, vol. 71, pp. 2192-2200, 1996.
- [112] T. Mahaworasilpa, H. Coster, and E. George, "Forces on biological cells due to applied alternating (AC) electric fields. I. Dielectrophoresis," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1193, pp. 118-126, 1994.
- [113] L. Cui and H. Morgan, "Design and fabrication of travelling wave dielectrophoresis structures," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 10, pp. 72-79, 2000.
- [114] T. B. Jones, *Electromechanics of particles*, 1995.
- [115] M. Frenea-Robin, J. Laforet, G. Robin, B. Le Pioufle, and L. Nicolas, "Selecting an electrode structure for cell sorting by differential dielectric affinity," *Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 6310 - 6313, 2007.
- [116] M. P. Hughes, *Nanoelectromechanics in engineering and biology*: CRC Press, 2002.
- [117] W. M. Arnold and U. Zimmermann, "Electro-rotation: development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles," *Journal of Electrostatics*, vol. 21, pp. 151-191, 1988.
- [118] T. Mahaworasilpa, H. Coster, and E. George, "Forces on biological cells due to applied alternating (AC) electric fields. II. Electro-rotation," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1281, pp. 5-14, 1996.
- [119] P. Marszalek, J. J. Zielinsky, M. Fikus, and T. Y. Tsong, "Determination of electric parameters of cell membranes by a dielectrophoresis method," *Biophys J*, vol. 59, pp. 982-987, 1991.
- [120] J. Wu, "Interactions of electrical fields with fluids: laboratory-on-a-chip applications," *IET Nanobiotechnology*, vol. 2, pp. 14-27, 2007.
- [121] A. D. Goater and R. Pethig, "Electrorotation and dielectrophoresis," *Parasitology*, vol. 117, pp. 177-189, 1998.
- [122] V. Raicu, G. Raicu, and G. Turcu, "Dielectric properties of yeast cells as simulated by the two-shell model," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1274, pp. 143-148, 1996.
- [123] A. Irimajiri, T. Hanai, and A. Inouye, "A dielectric theory of "multi-stratified shell" model with its application to a lymphoma cell," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 78, pp. 251-269, 1979.

- [124] C. D. Falokun and G. H. Markx, "Electrorotation of beads of immobilized cells," *Journal of Electrostatics*, vol. 65, pp. 475-482, 2007.
- [125] W. Bai, K. S. Zhao, and K. Asami, "Dielectric properties of E. coli cell as simulated by the three-shell spheroidal model " *Biophysical Chemistry*, vol. 122, pp. 136-142, 2006.
- [126] P. R. C. Gascoyne, F. F. Becker, and X.-B. Wang, "Numerical analysis of the influence of experimental conditions on the accuracy of dielectric parameters derived from electrorotation measurements," *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, vol. 36, pp. 115-125, 1995.
- [127] J. Gimsa, R. Glaser, and G. Fuhr, "Theory and application of the rotation of biological cells in rotating electric fields (electro-rotation)," *Physical Characterization of Biological Cells*, pp. 295-323, 1991.
- [128] D. Mietchen, T. Schnelle, T. Muller, R. Hagedorn, and G. Fuhr, "Automated dielectric single cell spectroscopy - temperature dependence of electrorotation," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 35, pp. 1258-1270, 2002.
- [129] X.-F. Zhou, G. H. Markx, and R. Pethig, "Effect of biocide concentration on electrorotation spectra of yeast cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1281, pp. 60-64, 1996.
- [130] Y. Huang, R. Hölzel, R. Pethig, and X.-B. Wang, "Differences in the AC electrodynamic properties of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies," *Phys. Med. Biol.*, vol. 37, pp. 1499-1517, 1992.
- [131] P. Patel and G. H. Markx, "Dielectric measurement of cell death," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 43, pp. 463-470, 2008.
- [132] E. Dopp, L. Jonas, B. Nebe, A. Budde, and E. Knippel, "Dielectric changes in membrane properties and cell interiors of human mesothelial cells in vitro after crocidolite asbestos exposure," *Environ Health Perspect.*, vol. 108, pp. 153-158, 2000.
- [133] J. Sudsiri, D. Wachner, J. Donath, and J. Gimsa, "Can molecular properties of human red blood cells be accessed by electrorotation?," *J. Sci. Technol.*, vol. 24, pp. 785-789, 2003.
- [134] Y. Huang, X.-B. Wang, P. R. C. Gascoyne, and F. F. Becker, "Membrane dielectric responses of human T-lymphocytes following mitogenic stimulation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1417, pp. 51-62, 1999.
- [135] J. Sudsiri, D. Wachner, and J. Gimsa, "On the temperature dependence of the dielectric membrane properties of human red blood cells," *Bioelectrochemistry*, vol. 70, pp. 134-140, 2007.
- [136] R. Hölzel, "Electrorotation of single yeast cells at frequencies between 100 Hz and 1.6 GHz," *Biophys J.*, vol. 73, pp. 1103-1109, 1997.
- [137] P. Gascoyne, C. Mahidol, M. Ruchirawat, J. Satayavivad, P. Watcharasit, and F. F. Becker, "Microsample preparation by dielectrophoresis: isolation of malaria," *Lab Chip*, vol. 2, pp. 70-75, 2002.
- [138] S. Archer, H. Morgan, and F. J. Rixon, "Electrorotation studies of baby hamster kidney fibroblasts infected with Herpes Simplex Virus Type 1," *Biophys J.*, vol. 76, pp. 2833-2842, 1999.
- [139] T. Müller, T. Schnelle, and G. Fuhr, "Dielectric single cell spectra in snow algae," *Polar Biology*, vol. 20, pp. 303-310, 1998.
- [140] J. Yang, Y. Huang, X. Wang, X.-B. Wang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, "Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by

- Electrorotation as a Cell Separation Criterion," *Biophysical Journal*, vol. 76, pp. 3307-3314, 1999.
- [141] K. L. Chan, P. R. C. Gascoyne, F. F. Becker, and R. Pethig, "Electrorotation of liposomes: verification of dielectric multi-shell model for cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1349, pp. 182-196, 1997.
- [142] G. H. Markx, Y. Huang, and X.-F. Zhou, "Dielectrophoretic characterization and separation of micro-organisms," *Microbiology*, vol. 140, pp. 585-591, 1994.
- [143] Y. Kang, D. Li, S. A. Kalams, and J. E. Eid, "DC-Dielectrophoretic separation of biological cells by size," *Biomed Microdevices*, vol. 10, pp. 243-249, 2008.
- [144] H. Li and R. Bashir, "Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *Listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 86, pp. 215-221, 2002.
- [145] S. E. Szabo, "Comparison of the efficacy of various yeast viability stains."
- [146] G. Redziniak, "Liposomes et peau : passé, présent, futur," *Pathologie Biologie*, vol. 51, pp. 279-281, 2003.
- [147] M. I. Angelova, S. Soléau, P. Méléard, J. F. Faucon, and P. Bothorel, "Preparation of giant vesicles by external ac electric fields," *Trends in Colloid and Interface Science*, vol. 89, pp. 127-131, 1992.
- [148] T. Boulesteix, "Microscopie non linéaire : chiralité et génération de second harmonique," in *Université Paris XI Orsay*, 2004.
- [149] D. J. Estes and M. Mayer, "Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1712, pp. 152-160, 2005.
- [150] K. Kuribayashi, G. Tresset, P. Coquet, H. Fujita, and S. Takeuchi, "Electroformation of giant liposomes in microfluidic channels," *Measurement Science and Technology*, vol. 17, pp. 3121-3126, 2006.
- [151] Y. Huang and R. Pethig, "Electrode design for negative dielectrophoresis," *Meas.Sci.Technol.*, vol. 2, pp. 1142-1146, 1991.
- [152] M. P. Hughes, "Computer-aided analysis of conditions for optimizing practical electrorotation," *Physics in medicine and biology*, vol. 43, pp. 3639-3648, 1998.
- [153] C. Reichle, T. Muller, T. Schnelle, and G. Fuhr, "Electro-rotation in octopole micro cages," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 32, pp. 2128-2135, 1999.
- [154] A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green, and A. Castellanos, "Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 31, pp. 2338-2353, 1998.
- [155] F. Zernike, "How I discovered phase contrast," 1953.
- [156] C. Reichle, T. Schnelle, M. Torsten, T. Leya, and G. Fuhr, "A new microsystem for automated electrorotation measurements using laser tweezers," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1459, pp. 218-229, 2000.
- [157] G. De Gasperis, X.-B. Wang, J. Yang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, "Automated electrorotation: dielectric characterization of living cells by real-time motion estimation," *Meas.Sci.Technol.*, vol. 9, pp. 518-529, 1998.
- [158] A. Budde, G. Grümmer, and E. Knippel, "Electrorotation of cells and particles: an automated instrumentation," *Instrumentation Science & Technology*, vol. 27, pp. 59-66, 1999.
- [159] X.-F. Zhou, J. P. H. Burt, and R. Pethig, "Automatic cell electrorotation measurements: studies of the biological effects of low-frequency magnetic fields and of heat shock," *Phys Med Biol*, vol. 43, pp. 1075-1090, 1998.
- [160] R. Nakamura, S. Shoji, and A. Yotsumoto, "Integrated mixing/reaction micro flow cell for chemical and biochemical applications," *MEMS*, vol. 1, pp. 265-268, 1999.

- [161] X. Wang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, "Membrane dielectric changes indicate induced apoptosis in HL-60 cells more sensitively than surface phosphatidylserine expression or DNA fragmentation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1564, pp. 412-420, 2002.
- [162] K. Ratanachoo, P. R. C. Gascoyne, and M. Ruchirawat, "Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1564, pp. 449-458, 2002.
- [163] D. Voyer, M. Frénéa-Robin, F. Buret, and L. Nicolas, "Improvements in the extraction of cell electric properties from their electrorotation spectrum," *Bioelectrochemistry*, vol. In Press, Corrected Proof.
- [164] T. B. Jones, "Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation," *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, pp. 33-42, 2003.
- [165] T. Kotnik and D. Miklavcic, "Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields," *Biophys J.*, vol. 90, pp. 480-491, 2006.
- [166] J. H. Mathews and K. K. Fink, "Numerical Methods Using Matlab, 4th Edition," pp. 430-436, 2004.
- [167] T. O'Hagan and M. Kennedy, "Gaussian emulator machine software," in <http://www.tonyohagan.co.uk/academic/GEM/index.html>.
- [168] I. Sobol, "Sensitivity estimates for non linear mathematical models," *Mathematical Modelling and Computational Experiments*, vol. 1, pp. 407-414, 1993.
- [169] R. Pethig and G. Marx, "Applications of dielectrophoresis in biotechnology (Review)," *Trends Biotechnol.*, vol. 15(10), pp. 426-32, 1997.
- [170] S. Guyot, E. Ferret, J.-B. Boehm, and P. Gervais, "Yeast cell inactivation related to local heating induced by low-intensity electric fields with long-duration pulses," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 112, pp. 180-188, 2007.
- [171] P. Gervais and I. M. d. Maranon, "Effect of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1235, pp. 52-56, 1995.
- [172] O. Necas, "Cell wall synthesis in yeast protoplasts," *Bacteriological reviews*, vol. 35, pp. 149-170, 1971.
- [173] K. Asami, T. Hanai, and N. Koizumi, "Dielectric properties of yeast cells," *Journal of Membrane Biology*, vol. 28, pp. 169-180, 1976.
- [174] N. G. Green, A. Ramos, A. Gonzalez, H. Morgan, and A. Castellanos, "Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. III. Observation of streamlines and numerical simulation," *Physical Review E*, vol. 66, pp. 026305.1 - 026305.11, 2002.
- [175] J. P. Reeves and R. M. Dowben, "Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 73, pp. 49-60, 1969.
- [176] R. Paul and K. V. I. S. Kaler, "Effects of particle shape on electromagnetic torques : a comparison of the effective-dipole-moment method with the Maxwell-stress-tensor method," *Physical Review E*, vol. 48, pp. 1491-1496, 1993.
- [177] A. M. Benselama, P. Pham, and P. Atten, "Calcul de la force diélectrophorétique dans les microsystèmes biologiques : comparaison du modèle dipolaire avec le modèle du tenseur de Maxwell," *Journal of Electrostatics*, vol. 64, pp. 437-444, 2006.
- [178] H. Suzuki and S. Takeuchi, "Microtechnologies for membrane protein studies," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, pp. 2695-2702, 2008.
- [179] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, *Molecular biology of the cell*, 1994.