



HAL
open science

Étude des effets d'impulsions électriques ultra-courtes sur des cellules vivantes : mise au point de nouveaux outils, développement théorique et premières applications in vivo

Julien Villemejeane

► **To cite this version:**

Julien Villemejeane. Étude des effets d'impulsions électriques ultra-courtes sur des cellules vivantes : mise au point de nouveaux outils, développement théorique et premières applications in vivo. Automatique / Robotique. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2010. Français. NNT : 2010DENS0021 . tel-00540353

HAL Id: tel-00540353

<https://theses.hal.science/tel-00540353v1>

Submitted on 26 Nov 2010

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.



ENSC-2010/01

**THESE DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN**

Présentée par

Monsieur Julien VILLEMEJANE

**pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN**

Domaine :
ELECTRONIQUE - ELECTROTECHNIQUE - AUTOMATIQUE

Sujet de la thèse :
**Etude des effets d'impulsions électriques ultra-courtes
sur des cellules vivantes**
Mise au point de nouveaux outils, développement théorique
et premières applications *in vivo*

Thèse présentée et soutenue à Cachan le 7 juillet 2010 devant le jury composé de :

Elisabeth DUFOUR-GERGAM	Professeur Paris XI	Présidente
Justin TEISSIE	Directeur Recherche CNRS	Rapporteur
Vincent SENEZ	Directeur Recherche CNRS	Rapporteur
Anne DENYS	Maitre de conférence Paris XIII	Examinatrice
Philippe LEVEQUE	Chargé Recherche CNRS	Examinateur
Bruno LE PIOUFLE	Professeur ENS Cachan	Directeur de thèse
Lluis M. MIR	Directeur Recherche CNRS	Directeur de thèse
Olivier FRANÇAIS	Maitre de conférence ENS Cachan	Invité
Lionel CIMA	Docteur ENS Cachan	Invité

Laboratoire Systèmes et Applications des Technologies de l'Information et de l' Energie
UMR 8029 SATIE / CNRS / ENS CACHAN
61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX (France)
Laboratoire Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses
UMR 8203 / CNRS / IGR
114, rue Edouard Vaillant, 94800 VILLEJUIF (France)

A Julien Ruffier

1995-2010

Mon ami

Mon p'tit frère de cœur

Si courageux

Merci pour cette leçon de vie

Je ne t'oublierai jamais



REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier les professeurs **Justin TEISSIE** et **Vincent SENEZ** d'avoir accepté et pris de leur précieux temps pour évaluer ce travail de thèse, ainsi que le professeur **Elisabeth DUFOR-GERGAM** (Présidente du jury), les docteurs **Anne DENYS** (Examinatrice) et **Philippe LEVEQUE** (Examineur) pour m'avoir fait l'honneur de leur présence au sein de ce jury.*

*Un grand merci aussi à mes deux directeurs de thèse **Bruno LE PIOUFLE** et **Lluís MIR**, pour leur soutien et leur confiance. Les réunions-café et les idées-congrès auront été pour beaucoup dans l'avancement de ces travaux. Et vous n'avez pas hésité à laisser libre court à mes idées, même les plus farfelues (pourquoi vouloir à tout prix isoler un conducteur...).*

Une thèse n'est pas une simple période de transition entre les études et la vie professionnelle, c'est avant toute chose une grande étape dans sa vie, sur le plan professionnel bien sûr, mais surtout sur le plan humain. Et son bon déroulement ne peut se faire qu'à travers des échanges perpétuels et sincères avec les personnes qui se succéderont au cours de ces trois années.

*Je tiens à remercier plus particulièrement **Vanessa JOUBERT**, qui m'aura laissé partager ses savoirs et savoir-faires biologiques, son bureau et sa voiture (pour les trajets retours après de longues journées de travail). Merci d'avoir pris le temps pour m'apprendre toutes les techniques de base de la biologie cellulaire et pour répondre à mes questions élémentaires sur la cellule.*

*Je remercie aussi **Guillaume MOTTET** pour m'avoir fait découvrir les joies de la salle blanche, des microtechnologies et des manips qui défient les lois de la physique, mais uniquement le vendredi soir... On l'aura un jour, on l'aura... le prix Nobel !*

*Merci à **Aude SILVE** pour son aide précieuse sur les aspects électrochimiques et pour sa parfaite maîtrise du DRASC. Mais aussi pour la mémorable course de canoë et les bains à 4h du matin (heure française) dans les piscines des hôtels de Boston. Bon courage pour la dernière année de ta thèse.*

*Merci aussi à **Jean-Pierre LEFEVRE**, un ingénieur hors pair, qui regorge d'astuces et de bons conseils sur tout ce qui touche de près ou de loin les microtechnologies et la mécanique. Merci pour ton aide et ton écoute tout au long de ce projet.*

*Merci à **Marion WOYTASIK** pour les plannings de travail intenable en salle blanche mais surtout pour avoir pris le temps de m'accompagner dans les différentes étapes de développement technologique de ce projet. Et j'ai enfin réussi à écrire ton nom sans faute !!*

*Merci à **Olivier FRANCAIS** pour son aide en microfluidique, en modélisation et en dessin de masques. Sans tes conseils avisés, je serai probablement encore en train de me battre avec le dessin des masques présentés dans cette thèse.*

*Merci enfin à **Claire DALMAY** pour sa maîtrise parfaite du plaqué or mais surtout pour son implication et son soutien dans les derniers instants de cette thèse.*

*En parallèle de ces trois années de thèse, j'ai aussi été amené à suivre le Diplôme Universitaire de Formation Supérieure BioMédicale à l'IFSBM, dirigé par le professeur **Claude MALVY**. Je le remercie ainsi que **Lilianne MASSADE** pour m'avoir donné l'opportunité de suivre les cours qu'ils proposaient. Merci aussi à **Christine HO** (Gestionnaire de l'IFSBM) pour son accueil chaleureux.*

Et bien entendu, la vie dans un laboratoire ne serait rien sans les collègues de travail. Je tiens donc à remercier l'ensemble des personnes qui travaillent ou ont travaillé dans les différents laboratoires que j'ai côtoyé.

*Au SATIE tout d'abord : **Denis LABROUSSE** et **Vincent THOMAS** (dit Milouse) : mes anciens collègues de promo qui vont aussi devoir défendre leur thèse d'ici peu et à qui je souhaite une bonne continuation dans leurs parcours professionnels, **Pierre-Yves JOUBERT**, **Eric VOURCH**, **Yohan LE DIRAISON**, **Jean-Pierre BARBOT**, **Bertrand REVOL** : pour avoir pris de votre temps pour répondre à mes questions. Merci aussi à **Pascal LARZABAL**, directeur du SATIE, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.*

*Du côté de l'IGR et de l'ex-UMR 8121 : **Bassim AL SAKERE** : pour le perfectionnisme et le professionnalisme de ses gestes auprès des souris de nos expériences et pour sa gentillesse en toute circonstance, **Antoni IVORRA** : pour sa maîtrise parfaite de Comsol, **Franck ANDRE**, **Jean-Rémi BERTRAND** : un autre ingénieur de recherche tout aussi débordant de bonnes astuces, **Marie GILBERT** : pour une préparation de colloque hors du commun, des bons moments de rigolade et pour son côté râleur qui me manquera, **Emilie GOBBO** et **Anne-Laure RAMON** : pour leur bonne humeur quotidienne et leur écoute, **Anastasia LANZY** et **Anna ALHADDAD** : pour les aller-retours d'un bout à l'autre du couloir de l'UMR 8203 et les pauses-rédaction, **Marion MAIRE** : pour m'avoir fait porté de lourds rapports de projet jusqu'au bâtiment d'en face et sous la pluie mais surtout pour sa gentillesse, **Betsy JULLIENNE** : pour ses conseils à mes débuts dans le monde de la biologie cellulaire, **Karim BENIHOUD**, **Christian BRESSY**, **Geneviève QUEAU** : une gestionnaire à toute épreuve. Merci à **Michel PERRICAUDET**, ancien directeur de l'unité, pour avoir accueilli un physicien supplémentaire dans son laboratoire de biologie (il paraît...).*

*Et puis, ce n'est pas parce qu'on n'est pas du même laboratoire qu'on n'a pas le droit de côtoyer les personnes qui vivent dans le même bureau que vous. Merci donc à notre petite chinoise **Ting WU** (dite aussi Emma), au professeur (et nouveau thésard ???) **Jacques DELAIRE**, à **Valérie GENOT** et à **Joseph LAUTRU** du PPSM pour son aide en salle blanche.*

Il y a aussi ceux qui ne sont que de passage dans nos laboratoires, mais sans qui ce travail n'aurait pas pu être terminé dans les temps. Un grand merci à tous les stagiaires pour leur aide : An, Hsin-Ho, Vanessa, Hania, Ferial, Guillaume, Sophia, Pierre, Ranya, Thierry, Marion.

*Ceux aussi devant lesquels on passe tous les jours et qui distribue leurs bonnes ondes et leur bonne humeur tous les matins. Merci à **Béatrice**, notre hôtesse d'accueil du hall du pavillon de recherche à l'IGR.*

*Mais le choix de se lancer dans une telle aventure ne tient parfois qu'à peu de chose, une rencontre, un jour, une discussion. Et rien de tout cela n'aurait été possible sans le coup de pouce de **Lionel CIMA** qui a su mettre en avant mes compétences acquises en électronique pour les adapter à une cause, qui a mes yeux, vaut la peine d'être défendue : la lutte contre le cancer. Merci à toi de m'avoir donné cette opportunité de mettre au service de la biologie mes connaissances jusqu'alors futiles...*

*Et puis, il y a ces personnes qui ont toujours été là pour vous et qui le seront quelques soient les circonstances : ma **famille**. Un grand merci à mes parents, mon frère, mes grand-parents et tous les autres membres de ma famille qui m'auront soutenu et encouragé au cours de ces années. Cette aventure n'aurait pas non plus été possible sans le soutien, la patience et l'immense affection de celle qui deviendra un jour la femme de ma vie. Merci à toi **mon p'tit coeur** et tu pourras compter sur mon soutien, toi qui a aussi décidé de tenter l'aventure à ton tour...*

Il y a, enfin, ces rencontres, si particulières, qui font s'envoler tous vos doutes dans les moments un peu plus difficiles quant à votre choix de se lancer dans une telle odyssée. Et à les voir lutter contre la maladie avec autant de courage et de force, on ne peut que les admirer et poursuivre le travail entamé avec encore plus d'entrain.

*C'est pour avoir lutté sans relâche toi aussi durant ces trois années et m'avoir permis d'en arriver jusque là que je te dédies ce travail, **P'tit Juju**. Puisses-tu à présent reposer en paix et veiller sur ta famille, petit ange... mon p'tit frère de cœur.*



Cette thèse a été financée par l'Institut National du Cancer

SOMMAIRE

Liste des abréviations	1
Avant-propos	3
I Des microtechnologies à la bionanomanipulation	5
1 Champs électriques et objets vivants	7
1.1 Généralités sur les champs électriques	8
1.1.1 Champ électrostatique	9
1.1.2 Champ électrique induit et champ électromagnétique	10
1.1.3 Champs électriques en milieu électrolyte : électrochimie et toxicité	10
1.1.4 Conclusion	14
1.2 L'électroperméabilisation	15
1.2.1 Description du phénomène	16
1.2.2 De l'expérimentation vers la théorisation	18
1.2.3 Vers les applications	23
1.2.4 Conclusion	28
1.3 La nanomanipulation par application d'impulsions ultra-courtes	28
1.3.1 Description du phénomène	29
1.3.2 Avancées des travaux	30
1.3.3 Conclusion	35
2 L'apport des microtechnologies dans le domaine de la biologie	37
2.1 Des systèmes basés sur des techniques de fabrication de la microélectronique	38
2.1.1 Les premiers pas vers la microélectronique	39
2.1.2 Vers les premiers microsystèmes	41
2.1.3 Des techniques de fabrication à l'échelle micronique	42
2.1.4 Apport de la microfluidique	43
2.2 Vers le développement de biomicrosystèmes	45
2.2.1 L'intérêt de la miniaturisation	46
2.2.2 De la puce à ADN jusqu'au laboratoire sur puce	49
2.3 Champs électriques et biomicrosystèmes	52
2.3.1 Diélectrophorèse	53
2.3.2 Micro-électroporation	56
2.4 Conclusion	59

II Théorie, modèles et conception 61

3 Etude de la faisabilité d'exposer des cellules à l'aide d'électrodes isolées	63
3.1 L'isolation : un filtre électrique et chimique	63
3.2 Etude théorique de la faisabilité	65
3.3 Influence du matériau et de l'épaisseur de l'isolant	68
3.3.1 Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension dans le milieu	70
3.3.2 Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension dans l'isolant	72
3.4 Conclusion	73
4 Microdispositifs d'exposition de cellules pour la visualisation en temps réel	75
4.1 Objectifs et contraintes	75
4.1.1 Un microdispositif pour la visualisation en temps réel lors de l'exposition à des impulsions courtes	76
4.1.2 Contraintes environnantes	76
4.1.3 Caractéristiques des générateurs et signaux associés	78
4.1.4 Limitation technologique	78
4.2 Adaptation d'impédance	78
4.2.1 Approche basse fréquence : impédance de charge	80
4.2.2 Approche haute fréquence : micro-ligne de transmission	81
4.3 Conception des électrodes	83
4.3.1 Choix du type d'électrodes	84
4.3.2 Impédance du système	85
4.3.3 Calcul des paramètres géométriques	86
4.3.4 Validation par modélisation quasi-statique et dynamique par éléments finis	87
4.3.5 Masque pour les électrodes	89

III Matériels, méthodes et procédés de fabrication 93

5 Microsystèmes sur verre	95
5.1 Résines et substrats	95
5.2 Biopuce pour la visualisation en temps réel	96
5.2.1 Micromoulage et dépôt électrolytique de cuivre	97
5.2.2 Amélioration du profil de déposition	101
5.2.3 Packaging	105
5.3 Electrodes isolées pour l' <i>in vitro</i> et l' <i>in vivo</i>	107
5.3.1 Microsystème à électrodes liquides	109
5.3.2 Isolation par dépôt de parylène	120
6 Application d'impulsions ultra-courtes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	123
6.1 Systèmes d'exposition et de génération d'impulsions électriques	123
6.1.1 Générateurs pour l'électrotransfert de gènes	124
6.1.2 Générateur pour l'électrochimiothérapie	126
6.1.3 Générateur pour l'application en microsystème	126
6.2 Electrotransfert de gènes	126

6.2.1	Support de l'information	127
6.2.2	Electrotransfert <i>in vitro</i>	128
6.2.3	Electrotransfert <i>in vivo</i>	130
6.2.4	Exposition au trans-cyclohexane-1, 2-diol (TCHD)	131
6.2.5	Détermination de l'expression de la luciférase	131
6.3	Visualisation de la perméabilisation cellulaire <i>in vitro</i> par suivi de fluorescence	132
6.3.1	Prototypage millimétrique	133
6.3.2	Utilisation d'un marqueur fluorescent	133
6.3.3	Suivi de la fluorescence et cartographie de la distribution de champ électrique	134
6.4	Electrochimiothérapie nouvelle <i>in vivo</i>	135
6.4.1	Modèles de tumeurs murines	136
6.4.2	Traitement par impulsions ultra-courtes	136
6.4.3	Suivi de croissance tumorale	136
6.5	Analyses statistiques	136

IV Résultats 139

7	Optimisation de l'électrotransfert de gènes rapporteurs <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	141
7.1	Résultats <i>in vitro</i>	141
7.1.1	Influence du nombre d'impulsions	142
7.1.2	Influence de la quantité d'ADN par cuvette	143
7.1.3	Influence de la fréquence de répétition des impulsions	143
7.1.4	Influence du délai entre l'électrotransfert et l'application d'impulsions ultra-courtes	144
7.2	Validation de l'utilisation d'électrodes isolées	144
7.3	Augmentation de l'efficacité de l'électrotransfert de gènes <i>in vivo</i>	145
7.4	Données complémentaires	148
7.4.1	Influence de la distance inter-électrodes sur la production de luciférase	149
7.4.2	Rôle des nsPEF dans l'ouverture des pores nucléaires	150
7.5	Discussion	150
8	Exposition de cellules dans des microsystèmes	155
8.1	Microsystèmes équipés d'électrodes non isolées	155
8.1.1	Visualisation de la perméabilisation par suivi de fluorescence	156
8.1.2	Article : Nanomanipulation de cellules vivantes par champs électriques en microsystème	159
8.2	Microsystèmes à électrodes isolées	165
8.3	Discussion	166
9	Electrochimiothérapie par applications d'impulsions ultra-courtes en présence de bléomycine	171
9.1	Combinaison bléomycine et impulsions ultra-courtes	171
9.2	Influence des paramètres électriques	172
9.2.1	Amplitude des impulsions	173
9.2.2	Nombre d'impulsions et fréquence de répétition	174

9.3 Discussion	175
Synthèse et perspectives	181
Références	187
Les différents articles	i
Revue : Physical methods of nucleic acid transfer : general concepts and applications - <i>British Journal of Pharmacology</i> / 2009 / 157	iii
Article : Nanosecond pulsed electric field delivery to biological samples : difficulties and potential solutions - <i>Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine</i> / CRC Press - M. Markov / 2010 / Chapter 18	xix
Article : A technique to design complex 3D lab on a chip involving multilayered fluidics, embedded thick electrodes and hard packaging—application to dielectrophoresis and electroporation of cells - <i>Journal of Micromechanics and Microengineering</i> / 2010 / 20	xxxvii
Liste des communications et publications	xlvii
Publications	xlvii
Communications avec acte (DOI)	xlvii
Communications avec acte	xlvii
Communications sans acte	xlviii

LISTE DES FIGURES

1.1	Classification des ondes électromagnétiques	11
1.2	Modèle classique de l'interface milieu/électrode	13
1.3	Impédance d'une solution électrolytique soumise à une tension électrique en fonction de la fréquence	15
1.4	Potentiels transmembranaires lors de l'application d'un champ électrique	16
1.5	Effet de la durée et du nombre d'impulsions à diverses fréquences sur la perméabilisation et la transfection de cellules	20
1.6	Effet de la polarité et de la fréquence de répétition sur l'interaction ADN/membrane et l'expression génique de cellules CHO	22
1.7	Effet de la température sur la perméabilisation cellulaire	24
1.8	Influence de l'intensité d'une impulsion longue de bas voltage sur l'expression de la GFP après électrotransfert	26
1.9	Modèle électrique équivalent d'une cellule	30
2.1	Evolution du nombre de transistors dans les microprocesseurs Intel	40
2.2	Premier microsystème : un transistor à grille résonante	41
2.3	Procédés de fabrication de microsystèmes	42
2.4	Exemple de parallélisation : culture et lyse cellulaires	47
2.5	Exemple de travail sur cellule unique : imagerie optique sur un réseau de cellules	49
2.6	Puce à ADN : principe de fabrication, principe de fonctionnement et biopuces commerciales	50
2.7	Lab-on-Chip permettant la purification d'ARN	52
2.8	Séparation de globules blancs dans le sang par champ électrique	54
2.9	Force de diélectrophorèse : facteur de Clausius-Mossoti	55
2.10	Exemples de positionnement par diélectrophorèse	57
2.11	Microsystème μ PREP intégré pour l'électroperméabilisation de cellules	58
3.1	Modèle électrique de deux milieux conducteurs séparés par un isolant	64
3.2	Modèle électrique d'un milieu biologique soumis à une impulsion électrique à travers des isolants	66
3.3	Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la forme de l'impulsion dans le milieu par simulation	67
3.4	Impédance d'un système d'exposition isolé en fonction de l'épaisseur de l'isolant	68
3.5	Schéma de l'application d'une tension sur un milieu diélectrique hétérogène	69
3.6	Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension appliquée sur le milieu	70
3.7	Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension à ses bornes	73
4.1	Schéma du support de la biopuce au niveau du microscope DRASC	77
4.2	Signaux ultra-courts délivrés par les générateurs	79

4.3	Diagramme de Bode théorique du système adapté en basse fréquence	80
4.4	Modèle de ligne à constantes réparties	81
4.5	Distribution du champ électrique dans le cas d'électrodes 2D ou 3D	85
4.6	Impédance d'une ligne à électrodes épaisses et électrodes fines	86
4.7	Modèle géométrique du microsystème pour la simulation par FEM	88
4.8	Simulation par éléments finis d'une structure microsystème	88
4.9	Impédance calculée par FDTD de la géométrie proposée pour le microdispositif	90
4.10	Simulation par FDTD de l'application d'une impulsion de 10 ns sur la géométrie proposée pour le microdispositif	90
4.11	Masque pour la réalisation d'un microdispositif à électrodes épaisses	91
4.12	Masque pour la réalisation d'un microdispositif à électrodes découpées	92
5.1	Procédé de fabrication d'électrodes épaisses par électrodéposition	98
5.2	Description du système d'électrodéposition	100
5.3	Electrodes épaisses de cuivre réalisées par dépôt électrolytique	101
5.4	Profil de dépôt d'une couche épaisse de cuivre par dépôt électrolytique	101
5.5	Distribution du champ électrique associée à l'électrodéposition de métaux	102
5.6	Profil d'un dépôt électrolytique de cuivre en plusieurs couches	103
5.7	Profil d'un dépôt électrolytique de cuivre en présence d'un motif leurre	104
5.8	Profil d'un dépôt électrolytique de cuivre à l'aide d'électrodes fractionnées	105
5.9	Support de la biopuce, incluant la connectique fluide et électrique	107
5.10	Connectique fluide par la tranche d'un microsystème	108
5.11	Test de la connectique fluide par moulage	108
5.12	Principe de dépôt du parylène	120
6.1	Générateur Cliniporator™ pour l'électrotransfert	125
6.2	Système d'exposition à des impulsions ultra-courtes	125
6.3	Carte du plasmide codant pour la luciférase	128
6.4	Systèmes d'exposition de cellules "conventionnels" et isolés	129
6.5	Système d'exposition isolé pour les applications <i>in vivo</i>	131
6.6	Système pour la visualisation de la perméabilisation cellulaire	133
6.7	Suivi de fluorescence - Principe et routine d'analyse	134
7.1	Influence du nombre d'impulsions ultra-courtes sur la production de luciférase	142
7.2	Influence de la quantité d'ADN sur la production de luciférase après application d'impulsions ultra-courtes	143
7.3	Influence de la fréquence de répétition d'impulsions ultracourtes sur la production de luciférase	144
7.4	Influence du délai entre l'EGT et l'application d'impulsions ultra-courtes sur la production de luciférase	145
7.5	Validation de l'utilisation d'électrodes isolées <i>in vitro</i> pour l'exposition à des impulsions ultra-courtes	146
7.6	Augmentation de la production de luciférase <i>in vivo</i> après exposition à des impulsions ultra-courtes. Injection rapide	147
7.7	Augmentation de la production de luciférase <i>in vivo</i> après exposition à des impulsions ultra-courtes. Injection lente	148

7.8	Influence de la distance inter-électrodes sur la production de luciférase	149
7.9	Exposition de cellules à du TCHD	151
8.1	Niveau de fluorescence avant et 2 min après l'exposition de cellules marqués à la calcéine à des nsPEF dans un microsystème de 1 mm de gap	157
8.2	Evolution de la fluorescence pendant 20 min après l'exposition de cellules marqués à la calcéine à des nsPEF dans un microsystème de 1 mm de gap	158
8.3	Niveau de fluorescence avant et après l'exposition de cellules marqués à la calcéine à des nsPEF dans un microsystème de 2 mm de gap	159
8.4	Comparaison électrodes classiques et isolées en microsystème	167
9.1	Suivi de croissance tumorale après injection de bléomycine ou exposition à un train d'impulsions ultra-courtes	172
9.2	Suivi de croissance tumorale après injection de bléomycine et exposition à un train d'impulsions ultra-courtes	173
9.3	Suivi de croissance tumorale après injection de bléomycine et exposition à un train d'impulsions ultra-courtes - effet de l'amplitude de 3.000 nsPEF	174
9.4	Suivi de croissance tumorale après injection de bléomycine et exposition à un train d'impulsions ultra-courtes - effet de l'amplitude de 1.000 nsPEF	175
9.5	Suivi de croissance tumorale après injection de bléomycine et exposition à un train d'impulsions ultra-courtes - effet de la fréquence de répétition de 1.000 nsPEF	176

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
BLM	bléomycine, un agent anti-cancéreux
cDNA	<i>Complementary DNA</i> ou ADN complémentaire
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i> ou Méthode de déposition par évaporation de produits chimiques
DEP	Diélectrophorèse
DRASC	Diffraction Raman anti-Stokes cohérent
ECT	Electrochimiothérapie
EGT	<i>Electrogenetherapy</i> ou Electrotransfert de gènes
EM	Electromagnétique
FDTD	<i>Finite Differences Time Domain method</i> ou Méthode de modélisation par différences finies dans le domaine temporel
FEM	<i>Finite Elements Modeling</i> ou Modélisation par Eléments Finis
HF	Acide Fluorhydrique
HV	<i>High Voltage</i> ou haute tension
IP	Iodure de Propidium, marqueur fluorescent
KCl	Chlorure de Potassium
LOC	<i>Lab(oratory)-on-a-chip</i> ou Laboratoire sur puce
LV	<i>Low Voltage</i> ou basse tension
LY	<i>Lucifer Yellow</i> , marqueur fluorescent
MEM	Milieu Essentiel Minimum, milieu de culture
MEMS	<i>Microelectromechanical systems</i> ou Microsystèmes Electromécaniques
mRNA	<i>Messenger RNA</i> ou ARN messenger
NEMS	<i>NanoElectroMechanical Systems</i> ou Nanosystèmes Electromécaniques
NIH	<i>National Institutes of Health</i> ou Instituts Nationaux de la Santé
nsPEF	<i>nanosecond Pulsed Electric Field</i> ou nanopulse
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ou Tampon phosphate salin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Réaction en chaîne par polymérase
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
SD	<i>Standard Deviation</i> ou Déviation standard (écart-type), en statistique
S-MEM	<i>Minimum Essential Medium Spinner modification</i> , milieu de culture pour cellules en suspension
STM	Saccharose, Tris, Magnésium - Milieu d'exposition faiblement conducteur
TCHD	Trans-CycloHexane-1,2-Diol
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

AVANT-PROPOS

*La thérapie génique et le traitement de cancers par l'intermédiaire d'impulsions électriques sont depuis quelques années une alternative sûre et efficace aux traitements plus classiques en oncologie. L'utilisation et l'étude d'un nouveau type d'impulsions électriques ultra-courtes sur des objets vivants, à des fins thérapeutiques, ouvrent de nouveaux horizons à ces méthodes physiques de transfert de gènes et de molécules d'intérêt. Le **chapitre 1** fait le point sur les avancées de l'électroperméabilisation de cellules, tant sur l'aspect recherche que des applications cliniques.*

*Le développement et l'utilisation de nouvelles sources permettant de générer ces impulsions ultra-courtes (quelques nanosecondes) étant très récent dans le domaine de la biologie, les effets observés par leur application sur des cellules vivantes sont encore peu connus et loin d'être parfaitement maîtrisés. Les microtechnologies et, en particulier, les biopuces peuvent être un bon outil pour analyser le comportement à l'échelle cellulaire. Le **chapitre 2** fait un rappel sur ces technologies émergentes et de plus en plus utilisées dans les domaines de la biologie et du médical.*

*Le travail de thèse, présenté dans ce manuscrit, porte l'accent sur le développement de nouveaux outils spécifiques pouvant s'inspirer de ces biomicrosystèmes. Afin de s'affranchir de certains phénomènes perturbateurs (électrochimie entre les électrodes et le milieu, biocompatibilité des matériaux conducteurs utilisés, hétérogénéité du champ local dû à un mauvais état de surface des électrodes commerciales), le **chapitre 3** dévoile une technique originale développée dans le cadre de cette thèse et basée sur l'utilisation d'électrodes électriquement et mécaniquement isolées du milieu de culture des cellules ou des tissus. L'hypothèse qui a mené à cette nouvelle technique a été analysée par des modèles théoriques dans le **chapitre 3**, puis elle a été validée expérimentalement dans cette thèse : que ce soit en thérapie génique en permettant d'augmenter l'efficacité de l'électrotransfert de gènes *in vitro* et *in vivo* (**chapitre 7**) ou en électrochimiothérapie, où la combinaison d'impulsions ultra-courtes et de bléomycine a été testée *in vivo* (**chapitre 9**). Les méthodes utilisées dans ces études expérimentales sont rapportées dans le **chapitre 6**.*

*En parallèle de cela et dans le cadre du projet ANR Nanopulsebiochip, un microsystème a été conçu (**chapitre 4**) et en partie réalisé (**chapitre 5**) pour permettre la visualisation en temps réel des effets de ces impulsions sous microscope. En complément de la mise au point d'une méthode de suivi de perméabilisation au cours du temps, des premiers essais de ces systèmes sont rapportés dans le **chapitre 8**.*

Aussi, résolument tournée vers les bio-micro/nano-technologies, cette thèse se révèle être au carrefour de l'électromagnétisme, de la microfluidique et de la biologie cellulaire tant par les calculs et les modélisations que par l'aspect expérimental qui ont été menés de front.

PARTIE I

DES MICROTECHNOLOGIES À LA BIONANOMANIPULATION

CHAMPS ÉLECTRIQUES ET OBJETS VIVANTS

Depuis l'Antiquité Grecque, où les propriétés électrostatiques de l'ambre jaune (d'où le mot électricité tire son origine) ont été découvertes, jusqu'à nos jours, l'électricité fascine et l'homme cherche à maîtriser ce phénomène physique afin de l'utiliser. Sa compréhension, qui remonte au 17^e siècle, a permis de rendre l'électricité accessible à tous les pays développés.

De tout temps, l'électricité a aussi eu ses applications dans les sciences du vivant. La bioélectricité remonte elle aussi à l'Antiquité, notamment en Egypte où des bas-reliefs montrent les effets des décharges de certains types de poissons « électriques » (les poissons-torpilles). Certains de ces phénomènes ont été utilisés par la suite pour le traitement de maladies telles que la migraine ou la goutte par exemple. Les premières expériences de ce type ont été décrites par Scribonius Largus, sous le règne de l'empereur Claude (41-54). L'électrothérapie était alors née. Depuis, de nombreuses avancées, notamment sur la compréhension de la cellule biologique, sur sa composition et sur le rôle de sa membrane, ont permis de mettre en évidence des applications possibles de l'électricité comme base dans le traitement de maladies ou l'analyse des cellules composant le corps humain. En particulier, la cellule étant un milieu conducteur (le cytoplasme) séparé par un diélectrique (la membrane plasmique) d'un autre milieu conducteur (la solution physiologique dans laquelle elle se trouve), elle est sensible aux champs électriques pouvant interagir avec elle.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux champs électriques capables de perméabiliser la membrane des cellules (champs électriques pulsés) ou encore de déclencher certaines fonctions internes des cellules vivantes (champs électriques ultra-courts). Nous listerons de façon non exhaustive leurs utilisations dans le domaine de la recherche et du médical. Mais avant de se lancer dans l'énumération des applications biomédicales possibles des champs électriques, nous définirons ce qu'est un champ électrique, quelle est la nature de ce phénomène physique et quels sont les risques liés à l'application de ces champs sur des milieux biologiques.

1.1. Généralités sur les champs électriques

Un champ électrique est un champ de force créé par des particules chargées électriquement. On peut différencier deux types de champs électriques : les champs électrostatiques, dans le cas de charges fixes, et les champs électriques induits par les déplacements de charge. Le champ électrique total est la somme de ces deux composantes que nous allons détailler par la suite.

1.1.1. Champ électrostatique

Dans le cas de particules chargées au repos, le champ électrique résultant, aussi appelé *champ électrostatique*, se déduit de la loi de Coulomb. Cette loi exprime la force de l'interaction entre deux particules chargées électriquement. La force F_{12} (en Newton, N) exercée par une charge électrique q_1 (en Coulomb, C) placée au point de rayon vecteur r_1 (en mètre, m) sur une charge q_2 placée au point de rayon vecteur r_2 s'écrit :

$$F_{12} = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon} \cdot \frac{r_2 - r_1}{|r_2 - r_1|^3} \quad (1.1)$$

où ϵ est la permittivité du milieu dans lequel se trouvent les deux particules (en C/V/m ou F/m, V pour Volt et F pour Farad). Tout matériau a sa propre permittivité, caractérisant la capacité que les molécules qui le composent ont de se polariser. Cette donnée intrinsèque est appelée permittivité relative ϵ_r . La permittivité du milieu vaut alors $\epsilon = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r$, où ϵ_0 représente la permittivité du vide et vaut $8,854 \cdot 10^{-12}$ F/m.

A partir de l'équation 1.1 et en ne considérant qu'une seule particule chargée q , on obtient alors la valeur du champ électrique \vec{E} (en V/m) en un point de l'espace situé à la distance r de la source :

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon} \cdot \frac{q}{r^2} \quad (1.2)$$

Ce champ électrique \vec{E} est aussi directement lié au potentiel électrique V :

$$\vec{E} = -\overrightarrow{\text{grad}}(V) \quad (1.3)$$

Dans le cas d'un champ uniforme et unidirectionnel, créé par l'application d'un potentiel V (en V) entre deux électrodes séparées d'une distance d (en m) par un milieu diélectrique ou très faiblement conducteur (solution d'exposition), ce champ \vec{E} peut directement s'écrire :

$$E = \frac{V}{d} \quad (1.4)$$

Cette formule sera utilisée dans la plupart des applications décrites par la suite pour calculer le champ

électrique appliqué.

1.1.2. Champ électrique induit et champ électromagnétique

Lorsque les particules créant ce champ électrique sont en mouvement, il vient alors se rajouter une seconde composante à ce champ appelé *champ électrique induit*. Ce champ électrique induit \vec{E}_i est directement relié au champ magnétique \vec{B} créé par ces charges en mouvement par l'intermédiaire du potentiel vecteur \vec{A} (quantité physique assimilable à un vecteur, mais non mesurable) :

$$\vec{E}_i = -\frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \quad \text{où} \quad \vec{B} = \text{rot}(\vec{A})$$

Par extension, un champ électromagnétique (EM) ou onde électromagnétique est la combinaison d'un champ électrique et d'un champ magnétique. Alors que les champs électriques sont le produit d'un gradient de tension, les champs magnétiques sont le résultat de la circulation d'un courant dans un circuit électrique. La force résultante \vec{F} de ce champ EM représente alors l'ensemble des composantes de forces qui s'exercent sur une particule chargée se déplaçant dans un référentiel donné. Cette force \vec{F} , appelée force de Lorentz, à laquelle est soumise une particule de charge q se déplaçant à la vitesse $|\vec{v}|$ vaut :

$$\vec{F} = q \cdot (\vec{E} + \vec{v} \wedge \vec{B})$$

où \vec{E} est le champ électrique auquel est soumise la particule et \vec{B} le champ magnétique.

Bien que ces deux composantes peuvent être calculées et mesurées indépendamment, ces deux entités sont couplées par les équations de Maxwell (Maxwell, 1887).

Certains champs électromagnétiques d'origine naturelle, tel que le champ magnétique terrestre, sont indispensables à certaines étapes de la vie d'espèces vivantes (migration de certains oiseaux, aide à la navigation de poissons). D'autres, créés par l'activité de l'homme, peuvent parfois entraîner des effets biologiques non souhaités. Mais il ne faut pas oublier qu'ils sont aussi la base de certaines avancées spectaculaires, notamment dans le domaine de l'imagerie médicale par résonance magnétique (Filler, 2009; Kim *et al.*, 2009) ou encore dans les traitements par radiothérapie (Marmor *et al.*, 1977; Chou, 1995).

Les principales caractéristiques d'une onde EM sont sa longueur d'onde (ou sa fréquence) et sa puissance. La figure 1.1 montre la classification des différentes ondes en fonction de leur fréquence.

1.1.3. Champs électriques en milieu électrolyte : électrochimie et toxicité

L'exposition d'objets vivants à des impulsions électriques (qui sera décrite dans les deux sections suivantes) nécessite la mise en contact d'électrodes, permettant d'appliquer le potentiel électrique, avec une solution électrolytique, maintenant les cultures cellulaires dans des conditions de viabilité suffisante

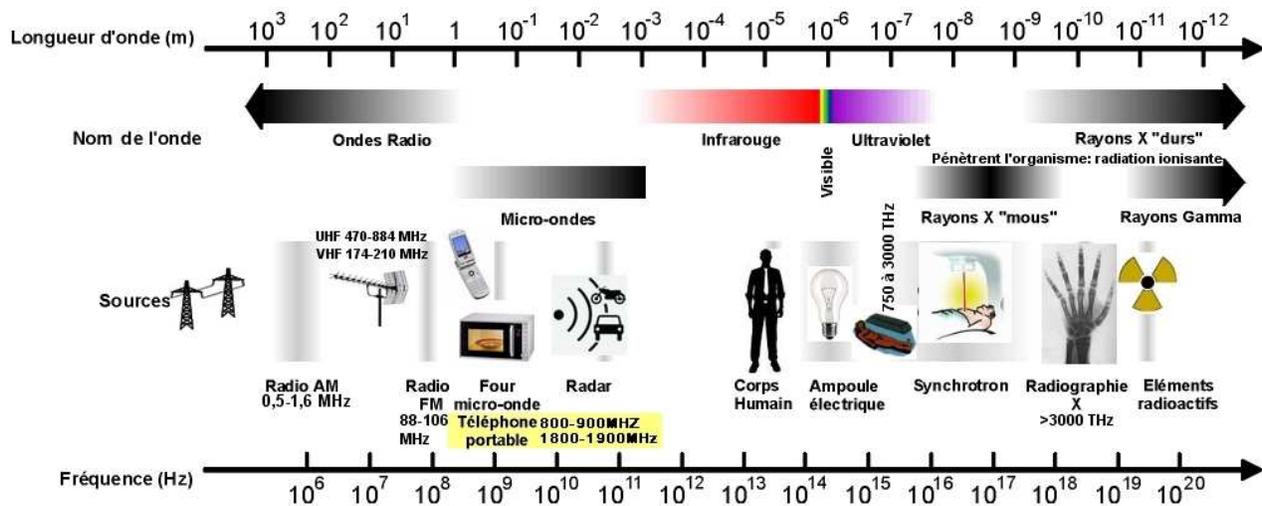


FIG. 1.1 : Classification des ondes électromagnétiques (Loverde, 2009).

pour toute la manipulation. L'interface entre ces deux matériaux de nature différente (l'un conducteur, l'autre diélectrique) devient alors un lieu d'accumulation d'espèces chargées : d'un côté des électrons et de l'autre des ions. Selon la nature et la surface des électrodes ainsi que la concentration des ions en solution, des échanges de ces espèces peuvent avoir lieu entraînant alors des réactions électrochimiques plus ou moins intenses. Ces réactions produisent des espèces pouvant être toxiques pour le monde vivant.

1.1.3.1. Échanges électroniques et ioniques

Lorsqu'une différence de potentiel est imposée entre deux électrodes permettant d'appliquer un champ électrique sur une solution contenant des cellules, un courant traverse ce milieu. Mais contrairement aux matériaux conducteurs (métaux par exemple) où ce courant est créé par déplacement d'électrons, en solution aqueuse, considérée comme diélectrique (milieu dans lesquels il n'existe pas de charges électriques libres et mobiles), ce courant est dû à la mobilité des ions présents.

Dans ce second cas, le courant peut être divisé en deux composantes :

- le courant capacitif, provenant du réarrangement d'ions dans la solution pour contrer les perturbations provoquées par le contact entre les électrodes et la solution, à savoir une accumulation d'électrons à la surface de l'électrode ;
- le courant faradique, provenant du transfert de charges à travers l'interface entre la solution et les électrodes lorsque des réactions d'oxydo-réduction ont lieu.

Le courant capacitif est dû à l'accumulation d'espèces chargées à l'interface entre le milieu et l'électrode. Des charges positives s'accumulent d'un côté, des charges négatives de l'autre. Le comportement de cette interface est similaire à celui d'un condensateur, d'où le terme de courant capacitif. La structure d'une telle interface est décrite par le modèle communément admis de la double couche électrique (Bard et Faulkner, 1983). La valeur de cette capacité est comprise entre 1 et $40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dans les conditions

usuelles de l'électrochimie moléculaire, l'épaisseur de cette double couche est de l'ordre de quelques dizaines d'Angström.

Lors d'une variation de potentiel, l'accumulation de charges de part et d'autre de l'interface entre la solution et l'électrode donne lieu à un courant transitoire. Les caractéristiques de ce courant dépendent uniquement de la surface de l'électrode, de la nature et de la concentration des ions présents dans la solution.

1.1.3.2. Réactions chimiques aux électrodes

Si la solution contient des espèces électroactives, il se rajoute en plus du courant capacitif un courant résultant d'une réaction d'oxydoréduction appelé courant faradique. Cette réaction s'accompagne d'un transfert d'électrons selon le processus à n électrons suivant : $O_x + ne^- = R_{ed}$, où O_x et R_{ed} sont les formes oxydées et réduites d'une espèce électroactive. Cette réaction implique la présence d'un accepteur ou un donneur d'électrons (tel qu'une électrode) et ne pourra se faire qu'à partir d'une certaine valeur de potentiel (classiquement autour de quelques volts). Cet effet peut être représenté électriquement par une source de tension associée à une résistance dite résistance de transfert. Cette dernière est inversement proportionnelle au courant d'échange qui caractérise la cinétique du transfert électronique (Le Pioufle *et al.*, 1998).

Ces réactions peuvent entraîner la production d'espèces chimiques très réactives telles que des radicaux libres ou la libération d'ions métalliques (Friedrich *et al.*, 1998; Kotnik *et al.*, 2001a). Cet effet est localisé au niveau des électrodes et dépend de la nature chimique de celles-ci (acier, acier inoxydable, aluminium,...), de la composition du milieu et des paramètres électriques. Pour de longues durées d'exposition ($> 100 \mu s$), il se produit aussi un changement de pH localisé au niveau des électrodes (Friedrich *et al.*, 1998). L'anode (électrode positive) devient alors acide et la cathode (électrode négative) devient basique.

1.1.3.3. Effets sur le monde vivant

Les composés générés au niveau des électrodes peuvent avoir des conséquences néfastes sur la viabilité cellulaire et entraîner des modifications des conditions électriques pendant l'impulsion par variation des propriétés physiques du milieu (Loste *et al.*, 1998). Les résultats biologiques associés à certaines expériences peuvent aussi être modifiés en présence de ces réactions chimiques (Kotnik *et al.*, 2001a). Une réduction de ces effets peut être observée lors de l'application d'impulsions bipolaires sur la solution, l'effet de l'alternance négative compensant en grande partie celui de l'alternance positive (Kotnik *et al.*, 2001b).

Ces réactions chimiques peuvent aussi entraîner un relargage d'ions, comme nous l'avons mentionné précédemment. Il faut savoir que la plupart des métaux ne sont pas biocompatibles, à savoir qu'ils peuvent induire une certaine toxicité au niveau des cellules. L'une des espèces métalliques ayant le plus d'effet semble être le cuivre. Celui-ci est un élément essentiel dans le cycle et dans la survie cellulaires *in vitro*

et *in vivo*. Il joue notamment un rôle dans l'homéostasie du fer et dans plusieurs oxydases (cytochrome C oxydase, tyrosinase, amine oxydases,...). Il est aussi connu pour induire l'apoptose dans certaines lignées cellulaires (Kawakami *et al.*, 2008) ou d'autres effets toxiques (Benders *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2010).

1.1.3.4. Modèle électrique associé

Le modèle classiquement utilisé pour modéliser ces phénomènes électrochimiques dans le cas d'électrodes en contact avec un milieu biologique conducteur est celui présenté dans la figure 1.2 (Wu, 2008). C_{dbl} représente la capacité double couche, R_{rct} et V les réactions électrochimiques, C_{cell} le couplage capacitif entre les deux électrodes séparées par un diélectrique et R_{solu} la résistance du milieu. R_{lead} représente la résistance de l'électrode que l'on peut négliger dans la plupart des cas qui seront traités par la suite.

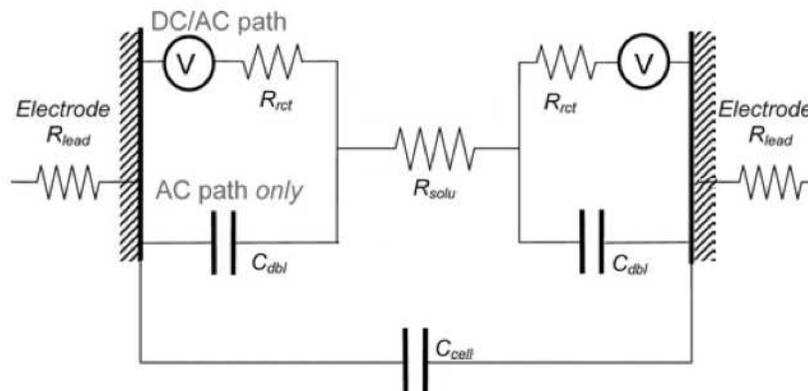


FIG. 1.2 : Modèle classique de l'interface milieu/électrode. D'après Wu (2008).

Le modèle précédent peut être simplifié dans le cas d'application de tensions et de courants élevés sur la solution (comme ce sera le cas dans la suite de ce rapport). Le potentiel d'activation des réactions électrochimiques, image de l'énergie nécessaire à initier une réaction chimique, est très faible par rapport aux tensions qui seront étudiées. On peut alors le négliger dans le calcul de l'impédance. L'impédance totale Z_{tot} de ce système est la suivante :

$$Z_{tot}(\omega) = \frac{2 \cdot R_{rct} + R_{solu} + J \cdot (R_{solu} \cdot R_{rct} \cdot C_{dbl}) \cdot \omega}{1 + J \cdot (R_{rct} \cdot C_{dc} + (2 \cdot R_{rct} + R_{solu}) \cdot C_{cell}) \cdot \omega + J^2 \cdot (R_{solu} \cdot R_{rct} \cdot C_{cell} \cdot C_{dbl}) \cdot \omega^2} \quad (1.5)$$

où ω est la pulsation ($\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$, où f est la fréquence).

On peut calculer les différents paramètres intervenant dans cette formule dans un exemple concret : l'utilisation d'une cuvette commerciale d'électroporation. R_{solu} et C_{cell} peuvent être calculés par les relations suivantes :

$$R_{solu} = \frac{1}{\sigma_{solu}} \cdot \frac{e}{S_{cuvette}} \quad \text{et} \quad C_{cell} = \epsilon_{solu} \cdot \frac{S_{cuvette}}{e}$$

où σ_{solu} est la conductivité de la solution, ϵ_{solu} sa permittivité, e la distance inter-électrodes et S_{cuve} la surface de contact. Dans le cas d'une cuvette de distance inter-électrodes $e = 1 \text{ mm}$ et de surface de contact $S_{cuve} = 1 \text{ cm}^2$ remplie d'un milieu de culture d'une conductivité $\sigma_{solu} = 1 \text{ S/m}$ et de permittivité relative 80, on obtient que $R_{solu} = 10 \text{ } \Omega$ et $C_{cell} = 70 \text{ pF}$.

Il est aussi admis que la capacité double couche est de l'ordre de $1 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$ (Gabrielli, 1994). On prendra donc $C_{dbl} = 1 \text{ } \mu\text{F}$. Enfin, le calcul de la résistance de transfert est donné par la relation suivante :

$$R_{rct} = \frac{R \cdot T}{n \cdot F \cdot i_0}$$

où R est la constante universelle des gaz ($R = 8,3144 \text{ J/K/mol}$), T la température, n le nombre de charges mises en jeu, F la constante de Faraday ($F = 96.500 \text{ C}$) et i_0 le courant d'échange. On peut admettre en première approximation que ce courant est essentiellement dû à l'application d'une tension U aux bornes de la cuvette ayant une résistance R_{solu} . Ce courant d'échange vaut alors $i_0 = U/R_{solu}$. Dans ce cas, la résistance de transfert vaut :

$$R_{rct} = k \cdot \frac{R_{solu}}{U} \quad \text{avec} \quad k = \frac{R \cdot T}{n \cdot F}$$

On peut alors tracer l'impédance, dont la formule est donnée par l'équation 1.5, en fonction de la fréquence et du rapport R_{solu}/R_{rct} . La figure 1.3 montre l'évolution de cette impédance en fonction de la fréquence pour 3 valeurs différentes du rapport R_{solu}/R_{rct} (pour $n = 1$ et $T = 298 \text{ K}$) : 5 ($U = 0,1 \text{ V}$), 500 ($U = 10 \text{ V}$) et 50.000 ($U = 1.000 \text{ V}$).

Dans l'ensemble des cas, une fréquence de coupure apparaît autour de 200 MHz. Cette fréquence est imposée par la solution sur laquelle est appliquée l'impulsion et elle est inversement proportionnelle au produit $R_{solu} \cdot C_{cell}$, constante de temps intrinsèque au milieu. Si l'on calcule ce produit on obtient :

$$R_{solu} \cdot C_{cell} = \frac{1}{\sigma_{solu}} \cdot \frac{e}{S_{cuve}} \cdot \epsilon_{solu} \cdot \frac{S_{cuve}}{e} = \frac{\epsilon_{solu}}{\sigma_{solu}}$$

Dans le cas de très faible tension ($U < 1 \text{ V}$), on peut noter aussi la présence d'un plateau plus élevé à basse fréquence. Ces deux cassures apparaissent car la résistance de transfert ne devient plus négligeable par rapport à la résistance du milieu. Dans les cas de figure qui seront présentés par la suite, cette résistance de transfert pourra être négligée et l'impédance type sera du premier ordre avec une fréquence de coupure imposée par le milieu d'exposition choisi.

1.1.4. Conclusion

A travers cette section, nous avons abordé très sommairement les champs électriques et nous avons pu voir les difficultés engendrées par l'application de tels champs sur un milieu liquide. L'apparition de réactions aux interfaces électrode/milieu peut entraîner des conséquences néfastes sur le monde vivant,

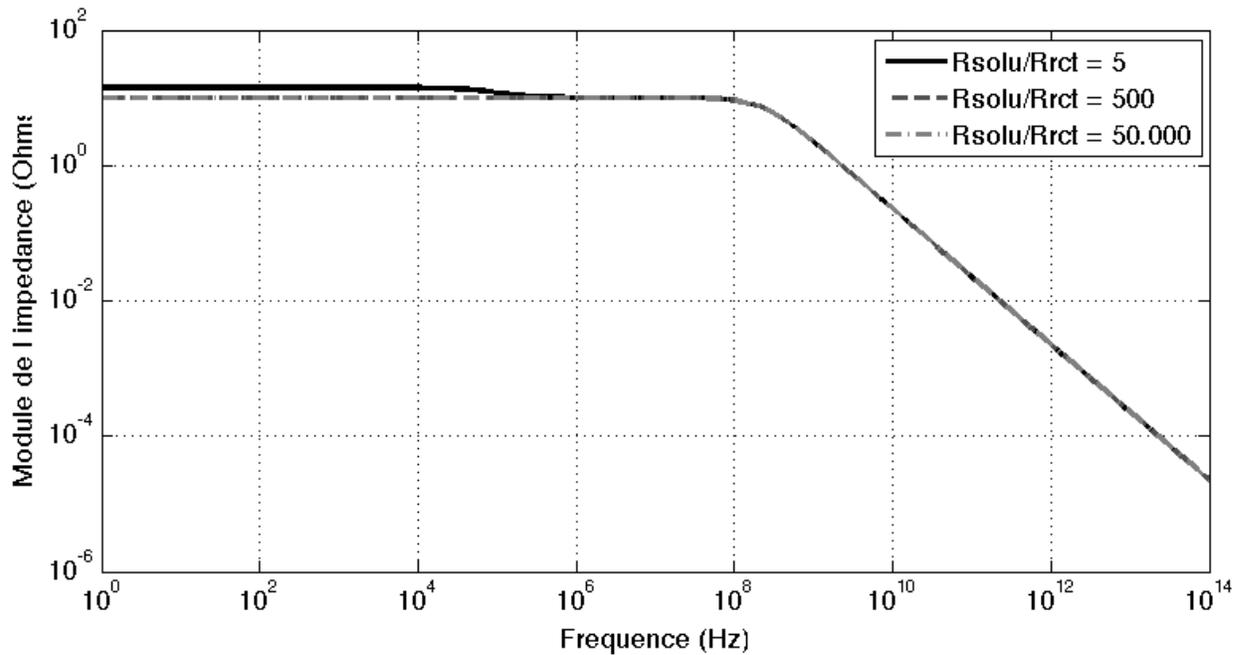


FIG. 1.3 : Impédance d'une solution électrolytique soumise à une tension électrique en fonction de la fréquence, dans le cas d'une cuvette d'électroporation de 1 mm remplie d'un milieu de culture commercial.

en particulier dans le cas de cellules soumises à ces attaques chimiques. Ces réactions sont d'autant plus importantes que la tension appliquée est élevée, pouvant produire des espèces chimiques toxiques ou entraîner un relargage d'ions métalliques dans la solution. Mais lorsque ces effets sont connus et peuvent être maîtrisés ou inclus dans les modèles, il est alors possible d'utiliser ces champs électriques à bon escient.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous intéresser aux différents types de champs électriques ayant des "effets" ou/et "applications", non pas nocifs, mais bénéfiques sur le monde du vivant, ou en tout cas sur l'être humain et certaines de ses maladies. Que ce soit des champs alternatifs, continus ou pulsés, chacun a des propriétés qui ont permis la mise au point d'applications thérapeutiques ou de techniques de laboratoire très couramment utilisées. La description de ces phénomènes ainsi qu'une liste non exhaustive de ces méthodes cliniques ou de laboratoire seront décrites dans la suite de ce chapitre.

1.2. L'électroperméabilisation

Les *champs électriques pulsés* sont connus pour leur capacité à entraîner une déstructuration de la membrane plasmique qui peut être transitoire et réversible, dans des conditions expérimentales particulières (Crowley, 1973; Neumann *et al.*, 1982). Ce phénomène physique a très rapidement trouvé des applications tant en biologie (Dower *et al.*, 1988) que dans des applications cliniques (Mir *et al.*, 2006; Daud *et al.*, 2008), mais le (ou les) mécanisme(s) qu'il fait intervenir sont encore à l'étude (Escoffre *et al.*, 2009), que ce soit par l'expérience *in vitro* et *in vivo* (André *et al.*, 2008) ou par la modélisation et la simulation (Weaver, 2003).

1.2.1. Description du phénomène

L'application d'un champ électrique d'une "longue" durée (entre quelques dizaines de microsecondes et quelques millisecondes (Mir *et al.*, 2005)) sur une solution biologique contenant des cellules vivantes entraîne une accumulation de charges de signes opposés de part et d'autre de la membrane plasmique. Ce phénomène est dû à la nature conductrice des différents milieux, intracellulaire (cytoplasme) et extracellulaire (milieu de culture ou d'exposition) et à l'aspect isolant ou diélectrique de la membrane. Cette barrière électrique empêche la recombinaison de ces charges opposées entre elles entraînant alors une modification du potentiel transmembranaire des cellules (Kotnik et Miklavcic, 2000; Gimsa et Wachner, 2001; Pucihar *et al.*, 2006).

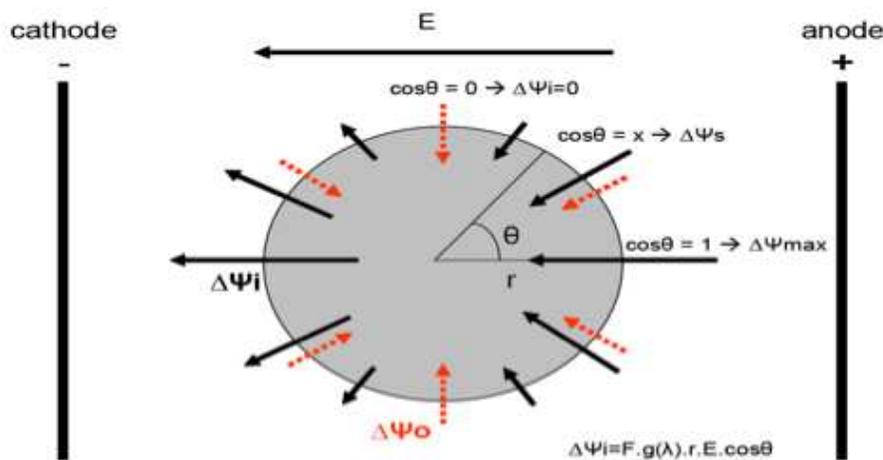


FIG. 1.4 : Application d'un champ électrique \vec{E} sur une cellule de rayon r . Visualisation des potentiels transmembranaires de repos ($\Delta\Psi_0$, flèches rouges pointillées) et induit ($\Delta\Psi_i$, flèches noires pleines). D'après Rols *et al.* (2000). θ représente l'angle entre la direction du champ électrique et la normale à la tangente de la membrane, F le facteur de forme de la cellule, $g(\lambda)$ une fonction dépendant des conductivités des différents milieux et membrane.

Au potentiel transmembranaire de repos ($\Delta\Psi_0$), vient alors s'ajouter une différence de potentiel

transmembranaire induite ($\Delta\Psi_i$) par l'application d'un champ électrique continu pulsé externe E (voir Fig. 1.4). Cette différence de potentiel dépend du rayon R de la cellule, d'une fonction f dépendante des propriétés électriques et géométriques des cellules et d'un angle θ correspondant à l'angle polaire mesuré par rapport à la direction du champ électrique :

$$\Delta\Psi_i = f \cdot E \cdot R \cdot \cos(\theta) \quad (1.6)$$

La fonction f dépend des conductivités du cytoplasme σ_i , de la membrane σ_m et du milieu extracellulaire σ_o , du rayon de la cellule R , de la permittivité de la membrane ε_m et de son épaisseur d (Kotnik *et al.*, 1997).

$$f = \frac{3 \cdot \sigma_o \cdot [3 \cdot d \cdot R^2 \cdot \sigma_i + (3 \cdot d^2 R - d^3) \cdot (\sigma_m - \sigma_i)]}{2 \cdot R^3 (\sigma_m + 2 \cdot \sigma_o) (\sigma_m + \frac{1}{2} \cdot \sigma_i) - 2(R - d)^3 (\sigma_o - \sigma_m) \cdot (\sigma_i - \sigma_m)} \quad (1.7)$$

Cette équation 1.6 ne tient cependant pas compte de l'aspect temporel de l'impulsion. La déstructuration de la membrane plasmique n'est en effet pas instantanée. Il a été montré que la réponse indicielle du potentiel transmembranaire à un échelon de champ électrique pouvait s'écrire (Pauly et Schwann, 1959) :

$$\Delta\Psi_i = f \cdot E \cdot R \cdot \cos(\theta) \cdot [1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}}] \quad (1.8)$$

avec une constante de temps τ_m défini par :

$$\tau_m = \frac{R \cdot \frac{\varepsilon_m}{d}}{\frac{2 \cdot \sigma_o \cdot \sigma_i}{2 \cdot \sigma_o + \sigma_i} + \frac{R}{d} \cdot \sigma_m} \quad (1.9)$$

En comparant les différentes conductivités mises en jeu, on s'aperçoit que dans la majorité des cas $\sigma_m \ll \sigma_o, \sigma_i$, permettant ainsi de simplifier la fonction f qui devient $f = \frac{3}{2}$. En remplaçant cette valeur dans l'équation 1.6, on obtient l'équation dite de Schwann (1957) :

$$\Delta\Psi_i = \frac{3}{2} \cdot E \cdot R \cdot \cos(\theta) \quad (1.10)$$

Lorsque cette différence de potentiel transmembranaire dépasse une certaine valeur critique, mesurée à environ 200 mV (Teissié et Rols, 1993), appelé aussi seuil de perméabilisation réversible, on peut alors observer une destructuration de la membrane plasmique, autrement dit, son électroperméabilisation. Ce phénomène physique est transitoire, comme le montrent les mesures de bio-impédance réalisées par Cukjati *et al.* (2007) lors de l'application d'impulsions sur des tissus, et réversible, si le champ appliqué reste inférieur à un niveau tel qu'il n'entraîne pas de lésions irréparables pour la cellule.

Pour déterminer le seuil d'électroperméabilisation *in vitro*, les cellules sont généralement électrostimulées en présence d'un colorant, comme l'iodure de propidium (IP) ou le "lucifer yellow" (LY), puis un test de viabilité est réalisé. Ainsi il est possible de déterminer le pourcentage de cellules non perméabi-

lisées, transitoirement perméabilisées et irréversiblement perméabilisées (Rols et Teissié, 1998). Avant le développement de l'imagerie par fluorescence sur le petit animal, des techniques pour déterminer le seuil de perméabilisation des cellules *in vivo* ont dû être mises au point, comme celle permettant de suivre la capture du $^{51}\text{Cr-EDTA}$ 1 h après électrostimulation, mise au point dans le cas de cellules musculaires striées squelettiques (Gehl et Mir, 1999).

Mais bien que le temps d'application de ces impulsions soit bref (quelques dizaines de microsecondes), il a été observé que la membrane mettait bien plus longtemps (quelques minutes) avant d'être intégralement reconstituée et ainsi reprendre son rôle de barrière sélective face à certaines molécules (Puc *et al.*, 2003; Pucihar *et al.*, 2008). La découverte de ce phénomène biophysique a alors permis d'envisager de nouvelles applications thérapeutiques (Mir et Orłowski, 2000) remettant ainsi au goût du jour certaines molécules alors oubliées (Orłowski *et al.*, 1988) (voir aussi paragraphe 1.2.3.3). La cinétique d'internalisation des molécules est cependant très dépendante de leur nature et de leur taille (Mir *et al.*, 1988; Rols et Teissié, 1998; Pucihar *et al.*, 2008).

1.2.2. De l'expérimentation vers la théorisation

Les premières études *in vitro* sur les effets de champs électriques pulsés sur des cellules vivantes ont été décrites dans les années 1960-70 (Coster, 1965; Sale et Hamilton, 1968; Neumann et Rosenheck, 1972). Une cassure transitoire réversible ou irréversible a été observée sur des membranes cellulaires faisant alors penser au claquage d'un diélectrique soumis à un champ électrique trop intense (Crowley, 1973), avec des valeurs de champ de claquage proche de certaines huiles ($4 \cdot 10^6$ V/cm) (Zimmermann *et al.*, 1974). Il a été montré par la suite que non seulement cette perturbation membranaire pouvait être réparée par la cellule mais qu'elle permettait à des macromolécules, ne pouvant pas diffuser naturellement, d'accéder au cytoplasme (Mir *et al.*, 1988; Rols *et al.*, 1998; Mir *et al.*, 1999).

Concernant les mécanismes associés à ce phénomène physique, même si dès 1957, Schwann nous propose un modèle d'électroporation (Schwann, 1957), il faudra attendre les années 80 puis 90 pour que les premières hypothèses sur les causes probables de la perméabilisation soient décrites (Neumann *et al.*, 1982, 1998, 1999; Gabriel et Teissié, 1999). Ces premières descriptions portent essentiellement sur le transfert de gènes par application de ce type d'impulsions et l'entrée de macromolécules dans le cytosol. Mais le passage de la membrane par l'ADN et les différents mécanismes associés sont encore en cours d'investigation (Faurie *et al.*, 2010).

Ces différentes études expérimentales, qui auront permis la mise en place d'applications thérapeutiques efficaces (Andreason, 1993; Yang *et al.*, 1995) auront permis de cerner davantage ce phénomène et notamment de révéler l'importance des différents paramètres susceptibles de moduler l'efficacité de l'électroperméabilisation : l'intensité du champ électrique, sa forme, la durée, le nombre et la fréquence

des impulsions électriques (Wolf *et al.*, 1994).

1.2.2.1. Intensité et durée des impulsions

La valeur seuil de perméabilisation du potentiel transmembranaire étant sensiblement identique quel que soit le type cellulaire, on peut déduire de l'équation (1.10) que le champ extérieur à appliquer pour perméabiliser des cellules de lignée différente est inversement proportionnel au diamètre des cellules. Plus le diamètre des cellules à traiter est important, moins le champ à appliquer sera élevé. Ainsi, le champ à appliquer est de l'ordre de 1.000 V/cm pour des cellules eucaryotes en culture (diamètre entre 10 et 30 μm) et de l'ordre de 6.000 V/cm pour des bactéries *E. coli* (diamètre de 1 à 5 μm). C'est encore la différence de diamètre qui explique que le seuil de perméabilisation soit plus bas pour des cellules adhérentes (300 V/cm pour des cellules CHO adhérentes) que pour des cellules en suspension (700 V/cm pour des cellules CHO en suspension) (Rols et Teissié, 1992).

Cette propriété peut être intéressante en présence de tissus complexes où l'on cherche à affecter certains types de cellules de taille supérieure, par exemple pour transférer sélectivement des adipocytes matures de grande taille dans le tissu adipeux sous-cutané constitué de plusieurs types cellulaires de tailles inférieures (Granneman *et al.*, 2004).

L'intensité du champ électrique contrôlerait aussi la surface perméabilisée (Rols et Teissié, 1990, 1998; Wolf *et al.*, 1994) sans pour autant être capable d'affecter les organites intracellulaires. En effet, des expériences de transfection réalisées sur mitochondries isolées nécessitaient un champ électrique 10 à 100 fois supérieur aux champs généralement utilisés *in vitro* et *in vivo* pour perméabiliser les cellules (Collombet *et al.*, 1997).

Rols et Teissié (1998) se sont aussi penchés sur la question de la durée des impulsions afin de savoir si elle avait son importance dans la perméabilisation membranaire et dans l'internalisation des gènes dans le cytosol. La figure 1.5 semblerait montrer qu'il existe une corrélation entre perméabilisation et durée des impulsions. Mais il n'est pas évident que cet effet ne soit dû qu'à ce changement de durée, car d'autres études ont aussi montré que la fréquence de répétition et le nombre d'impulsions pouvaient aussi jouer leur rôle dans les processus de perméabilisation et de transfection (Pucihar *et al.*, 2002; Faurie *et al.*, 2010).

Il a cependant quand même été montré que des impulsions de haut voltage et de courte durée (100 μs) provoquaient plutôt la perméabilisation de la cellule, alors que des impulsions de plus faible voltage et de plus longue durée (plusieurs millisecondes) étaient responsables d'un effet électrophorétique sur l'ADN *in vivo* (Bureau *et al.*, 2000; Satkauskas *et al.*, 2002; André *et al.*, 2008; Hojman *et al.*, 2008).

1.2.2.2. Autres paramètres à prendre en compte *in vitro* et *in vivo*

Mais ces deux seuls paramètres ne sont pas suffisants pour pouvoir caractériser et comprendre complètement les effets de ces impulsions électriques sur des cellules ou des tissus. En effet, ajuster au mieux l'intensité et la durée des champs électriques pulsés afin de tenir compte du temps de charge des

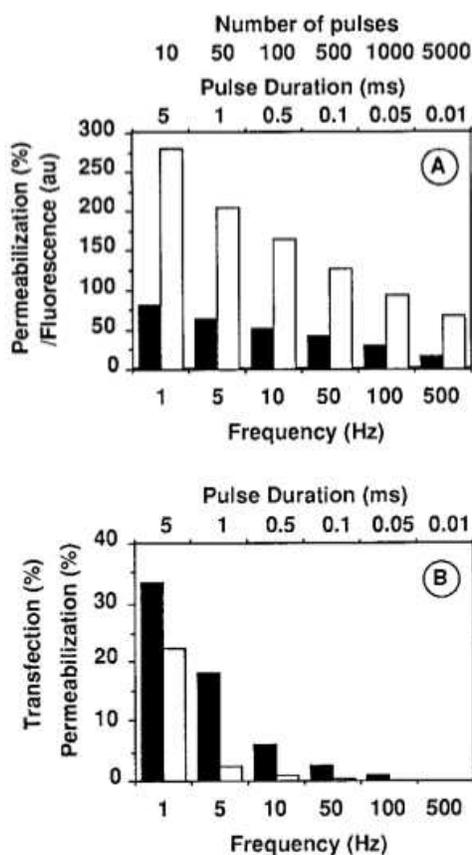


FIG. 1.5 : Effet de la durée et du nombre d'impulsions de 600 V/cm à différentes fréquences. Le produit du nombre d'impulsions par le temps des impulsions est gardé constant et égal à 50 ms. (A) Taux de perméabilisation mesuré par entrée de iodure de propidium (barres noires) et la fluorescence associée (barres blanches). (B) Pourcentage de cellules transfectées avec de la β -Gal (barres noires) et perméabilisées (barres blanches). D'après *Rols et Teissié (1998)*.

membranes et de la géométrie des cellules ou de la zone à traiter ne conduisent pas nécessairement aux conditions optimales de transfection (ou de perméabilisation dans le cas de molécules d'intérêt).

Le nombre d'impulsions délivrées, leur fréquence de répétition ou encore la conductivité du milieu contenant les cellules à traiter jouent aussi un rôle sur l'efficacité de transfert de molécules ou d'acides nucléiques.

Le nombre et la forme des impulsions

Certaines études ont pu constater que des impulsions répétées (8 à 10) à la fréquence de 1 ou 2 Hz, de longue durée (4-50 ms/impulsion) et peu intenses (100-500 V/cm) permettent d'atteindre de bons niveaux d'expression de plasmides *in vivo* (*Rols et al., 1998; Mathiesen, 1999*).

Tekle et al. (1991) ont montré que la forme de l'impulsion pouvait elle aussi impacter sur l'efficacité de certains traitements : l'application d'impulsions bipolaires (un signal carré de fréquence 60 kHz - 8,33 μ s par alternance - d'une durée totale de 400 μ s) augmente l'efficacité de transfection de cellules

NIH 3T3 par un facteur de 1,7 à 5,5 par rapport à des impulsions unipolaires, tout en garantissant un niveau de viabilité équivalent (Tekle *et al.*, 1991). Une décennie plus tard, Kotnik *et al.* (2001b) ont montré le même type d'effet mais en utilisant des formes d'impulsions plus classiques en électropériméabilisation (un train d'impulsions de 100 μ s chacune espacée de plusieurs millisecondes voir secondes).

La fréquence de répétition

Concernant la fréquence de répétition des impulsions, il a longtemps été question d'utiliser une fréquence de 1 Hz, essentiellement pour des raisons technologiques. Mais depuis quelques années, avec l'évolution des générateurs d'impulsions et des systèmes de contrôle et de visualisation, les effets de cette fréquence de répétition sont étudiés expérimentalement. Ce sont notamment Pucihar *et al.* (2002) qui ont montré que la quantité de LY pouvant pénétrer à l'intérieur du cytoplasme n'était pas significativement différente que l'on soit à 1 Hz ou à 8,3 kHz (26 impulsions de 30 μ s). Par contre, ils ont montré que le seuil de perméabilisation évoluait en fonction de cette fréquence et atteignait un maximum à 1.170 V/cm pour 1 Hz et à 1.565 V/cm pour 8,3 kHz.

La même équipe montrera aussi, quelques années plus tard, l'intérêt d'augmenter la fréquence d'exposition dans le cadre de l'électrochimiothérapie afin d'en limiter un des effets secondaires gênants, à savoir la contraction musculaire (Miklavcic *et al.*, 2005). En effet, l'application des impulsions perméabilisantes à une fréquence faible entraîne une contraction à chacune d'entre elles. En augmentant cette fréquence, on peut alors n'obtenir qu'une seule contraction musculaire (Miklavcic *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009).

Cependant, cette technique semble fonctionner pour l'internalisation de petites molécules (telles que l'IP, le LY, la bléomycine (BLM) ou encore le cisplatine) mais qu'en est-il de l'électrotransfert de gènes ?

Faurie *et al.* (2010) se sont intéressés à l'influence de la fréquence de répétition et la polarité de 6 impulsions de 1 ms et de 800 V/cm sur l'interaction ADN/membrane. Leurs résultats montrent que la perméabilisation ne semble pas être affectée par la fréquence de répétition des impulsions, dans cette gamme de fréquences là (0,1 à 77 Hz) contrairement à la viabilité cellulaire qui chute de 60 % pour 0,1 Hz à 25 % pour 10Hz, quel que soit le type de polarité des impulsions. Dans le cas d'impulsions unipolaires, l'augmentation de la fréquence de répétition améliore la quantité d'ADN qui interagit avec la membrane (Fig. 1.6.B) qui a pour conséquence d'augmenter l'expression génique (Fig. 1.6.D). Mais le résultat est contradictoire avec le fait que le nombre de cellules qui exprime la GFP décroît (Fig. 1.6.C), ce qui peut s'expliquer par la perte de viabilité. Dans le cas d'impulsions bipolaires, le même effet est visible pour des fréquences inférieures à 1 Hz. Au-dessus de cette valeur, c'est l'effet inverse qui apparaît : la quantité d'ADN interagissant avec la membrane (Fig. 1.6.A) et l'expression de la GFP (Fig. 1.6.C) diminuent.

De cette expérience (Faurie *et al.*, 2010), on peut retenir que l'interaction ADN/membrane n'est pas instantanée, mais qu'un temps minimal de 0,1 s est nécessaire (d'où un effet en dessous d'une fréquence de répétition de 10 Hz). La mise en évidence de deux domaines d'interaction, métastable (où l'ADN n'est ancré que de façon réversible) et stable (où l'ADN est alors ancré dans la membrane et jouera un rôle

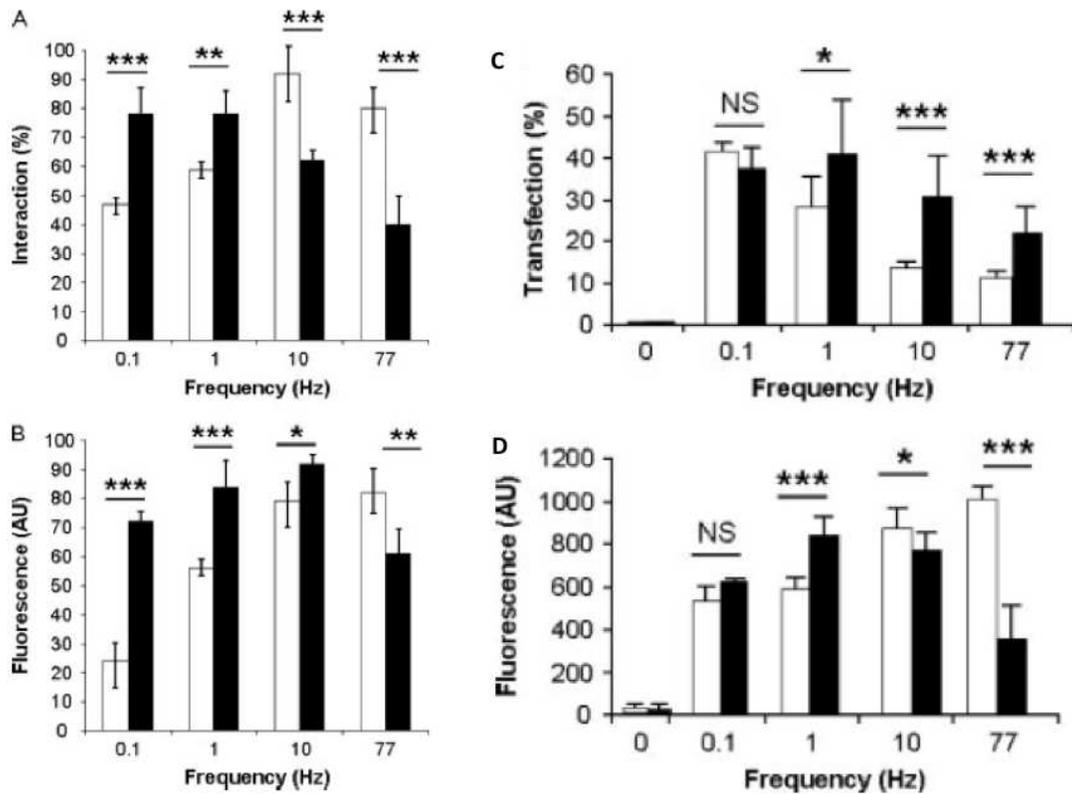


FIG. 1.6 : Effet de la polarité et de la fréquence de répétition des impulsions sur : (A/B) l'interaction ADN/membrane et (C/D) l'expression génique de cellules CHO transfectés avec des plasmides GFP. Un train de six impulsions unipolaires (barres blanches) ou bipolaires (barres noires) de 1 ms et de 400 V a été appliqué sur des cellules CHO en présence de plasmide d'ADN GFP (pEGFP-C1) marqué avec TOTO-1. L'expression de la GFP est mesurée 24 h après le traitement électrique. (A) Pourcentage de cellules dont l'ADN interagit avec la membrane et (B) niveau de fluorescence de l'ADN marqué avec TOTO-1 interagissant avec la membrane. (C) Pourcentage de cellules transfectées et (D) Niveau moyen de fluorescence associé aux cellules qui expriment la GFP. D'après Faurie et al. (2010).

dans l'expression génique), montre la complexité du mécanisme associé à l'électrotransfert de gènes.

Certaines expériences démontrant l'impact de la fréquence de répétition sur la perméabilisation de la membrane plasmique et sur l'efficacité de l'électrotransfert *in vitro* seront présentées par la suite (voir chapitre 7).

La conductivité du milieu

A partir de 1996, des études s'intéressent aussi à l'impact que peut avoir la conductivité du milieu dans lequel sont plongées les cellules lors de l'exposition à des impulsions électriques sur la perméabilisation membranaire. Djuzenova et al. (1996) observent deux phénomènes plus ou moins liés : (i) la diminution de la conductivité de la solution amène à une plus grande entrée d'IP dans les cellules électroperméabilisées et (ii) l'analyse de la fluorescence au cours du temps après électroperméabilisation montre

que plus la conductivité est élevée moins l'entrée d'IP est importante. Cet effet pourrait être corrélé au temps de relaxation de la membrane qui dépend de la conductivité du milieu extérieur (equation 1.9).

Pucihar *et al.* (2001) montrent que le seuil d'irréversibilité de l'électroperméabilisation des cellules DC-3F diminue lorsque la conductivité de la solution augmente, mais que le seuil de perméabilisation ne change pas. L'osmolarité de la solution ou encore l'élévation de température dans la solution ont été évaluées mais ne sont pas en cause dans l'augmentation du nombre de cellules détruites au cours de l'exposition en milieu conducteur. La présence de la conductivité du milieu extérieur dans le calcul des potentiels transmembranaires de repos et induit pourrait être à l'origine de cette différence.

Enfin, il a été mis en évidence, dans des expériences *in vivo*, qu'il était essentiel d'avoir une bonne continuité dans les milieux et surtout dans les transitions entre milieux. Corovic *et al.* (2008) ont en effet montré l'importance de la surface de contact entre les électrodes et le tissu tumoral à traiter, dans le cadre de l'électrochimiothérapie. Plus cette surface est importante, meilleure sera la couverture de la tumeur en terme de distribution de champ électrique.

Effets secondaires ou extérieurs

D'autres paramètres, moins évidents au premier abord, peuvent aussi intervenir dans la perméabilisation cellulaire. C'est le cas par exemple de la température à laquelle s'effectue l'expérience. C'est ce qu'ont pu montrer Kanduser *et al.* (2008) en étudiant l'impact de la température sur le seuil de perméabilisation de certains types cellulaires (V79 et B16F10). Que l'on soit à 4 °C ou à 37 °C peut entraîner un changement dans le seuil de perméabilisation et dans le comportement de certains types cellulaires (voir Fig. 1.7). Pliquett *et al.* (2005) montrent ce même phénomène dans le *stratum corneum* mais en ajoutant que l'élévation de température, entraînant des changements structurels, peut être induite par effet Joule. Davalos *et al.* (2003) avaient déjà montré théoriquement que la conception des électrodes et la mise au point d'un protocole devaient tenir compte aussi des effets thermiques.

A côté de cela, Vernier *et al.* (2009) montrent, de façon expérimentale et par simulation, que l'oxydation des membranes augmente leur sensibilité vis-à-vis de l'électroperméabilisation. Modifier l'état de stress oxydatif peut donc améliorer l'efficacité de transfert, que ce soit de petites molécules d'intérêt ou d'ADN.

1.2.3. Vers les applications

Les mécanismes associés à l'électroperméabilisation, que ce soit pour des petites molécules d'intérêt ou de l'ADN, sont encore loin d'être totalement résolus (Teissié *et al.*, 2005; Escoffre *et al.*, 2009). Cependant, certains groupes de chercheurs n'ont pas attendu avant de mettre au point des techniques utilisant ce phénomène physique, que ce soit en laboratoire ou en clinique. Nous allons dans cette section nous intéresser à ces applications.

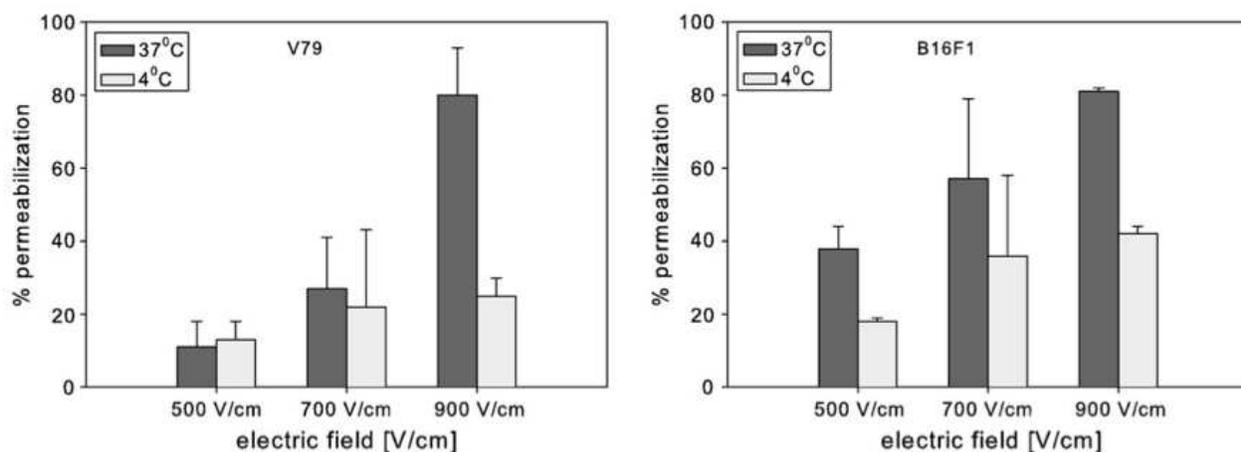


FIG. 1.7 : *Perméabilisation cellulaire chez les lignées cellulaires V79 et B16F10 à 4 °C et 37°C. Cette perméabilisation a été mesurée à l'aide de bléomycine après l'application de 8 impulsions à une fréquence de 1 Hz. (Kanduser et al., 2008).*

1.2.3.1. Techniques de laboratoire

Les premières applications de l'électroperméabilisation remontent aux études de [Coster \(1965\)](#) sur l'interaction des champs électriques avec les cellules vivantes. En particulier, l'utilisation de champs électriques intenses a permis d'aboutir à la lyse cellulaire par application de champs électriques entraînant la déstructuration irréversible de la membrane plasmique ([Sale et Hamilton, 1968](#)). Cette méthode sera à nouveau reprise dans les laboratoires-sur-puce intégrant des fonctions d'analyse du cytoplasme ou/et de ses composants ([Lee et Tai, 1999](#)) (voir aussi section [2.2.2.4](#)).

Mais une des techniques les plus utilisées, basées sur l'utilisation de l'électroperméabilisation, est sans nul doute la transformation de bactéries ([Taketo, 1988](#); [Dower et al., 1988](#)) ou la transfection de cellules ([Potter, 1988](#)). Cette technique efficace ([Chu et al., 1987](#)) permet d'obtenir une expression génique transitoire ou stable, selon le type cellulaire utilisé et les conditions d'électrotransfert ([Toneguzzo et al., 1986](#)). Actuellement, il existe une pléiade de générateurs et de systèmes d'électroperméabilisation pour bactéries ou cellules. Mais tous les fabricants profitent du faible intérêt que les biologistes utilisateurs portent au principe de fonctionnement de cette technique pour leur vendre un ensemble complet de solutions biologiques et de paramètres dédiés à certains types cellulaires ou à certaines bactéries.

1.2.3.2. Thérapie génique

Comme nous venons de l'aborder au précédent paragraphe, l'une des principales utilisations de l'électroperméabilisation est dans le domaine de la thérapie génique, qui a pour but de faire pénétrer des gènes dans les cellules ou les tissus d'un individu pour traiter une maladie.

Il existe plusieurs façons de vectoriser des acides nucléiques, que ce soit de l'ADN ou de l'ARN. Et l'une des plus utilisées pour son efficacité, mais non sans risque, est basée sur l'utilisation de virus.

D'autres stratégies ont cependant été élaborées pour ne pas recourir aux virus et utiliser directement la molécule d'ADN. Ces stratégies dites non virales se décomposent en deux grandes catégories : les méthodes chimiques (par exemple basées sur l'encapsulation de l'ADN dans des poches lipidiques) et les méthodes physiques (la biolistique, l'injection par jet liquide, l'injection massive, les ultrasons, les champs magnétiques et électriques) (Villemejeane et Mir, 2009). La plupart de ces méthodes sont encore dans des étapes d'optimisation car l'un de leurs challenges est de pouvoir atteindre l'efficacité des méthodes virales, ayant déjà l'avantage d'être plus sûres (Lefesvre *et al.*, 2002).

Parmi ces techniques physiques de transfection, l'électrotransfert de gènes (Mir *et al.*, 2005; Mir, 2009) est parmi les plus avancées en terme d'optimisation et d'utilisation, avec déjà un premier essai clinique de phase I concluant, ayant pour but de voir l'effet de la dose de plasmides codant pour l'interleukin-12 transfectés par électroperméabilisation chez des patients atteints de cancer (Daud *et al.*, 2008).

Les premiers travaux d'électrotransfert d'ADN *in vivo* remontent toutefois en 1991 où Titomirov *et al.* (1991) transfectent de manière stable un gène de résistance à la néomycine dans la peau de souris par l'intermédiaire d'impulsions électriques exponentielles. Puis, Heller *et al.* (1996) utilisent des impulsions carrées de courte durée (100 μ s) pour transfecter des gènes rapporteurs dans le foie de rats. En 1998, d'autres équipes ont montré l'efficacité de l'électrotransfert à l'aide d'impulsions de longue durée (5-50 ms) : dans le muscle squelettique (Mir *et al.*, 1998a), dans les tumeurs (Rols *et al.*, 1998) et dans le foie (Suzuki *et al.*, 1998).

Satkauskas *et al.* (2005) ont montré par la suite l'importance de la combinaison d'impulsions courtes de haut voltage, pour l'électroperméabilisation, et longues de bas voltage, pour le déplacement électrophorétique de l'ADN (voir Fig. 1.8), confirmé quelques années plus tard par cette même équipe (André *et al.*, 2008). Les mécanismes sous-jacents peuvent être expliqués par la nécessité de la formation d'un complexe ADN/membrane qui nécessite leur mise en contact pendant un temps minimal (Faurie *et al.*, 2010). Cette idée d'interaction ADN/membrane avait déjà été abordée par Wolf *et al.* (1994).

Afin d'améliorer encore cette méthode efficace et sûre de transfert de gènes, Zampaglione *et al.* (2005) ont tenté de déterminer les différents paramètres pouvant intervenir dans l'électrotransfert *in vivo*. D'autres études enfin se sont tournées vers des modèles à l'interface entre l'*in vitro* et l'*in vivo* afin d'en déterminer les mécanismes d'action : des sphéroïdes de cellules (Wasungu *et al.*, 2009) ou bien encore des modèles *ex vivo* (He *et al.*, 2009).

1.2.3.3. Electrochimiothérapie

Une autre technique tout aussi efficace et bien plus avancée en matière de traitement clinique (Mir et Orłowski, 2000; Moller *et al.*, 2009) s'est développée en parallèle de l'électrotransfert de gènes : l'électrochimiothérapie. Elle consiste à faire pénétrer dans le cytosol des macromolécules non-perméantes (c'est à dire, qui ne peuvent rentrer d'elles-mêmes dans les cellules par des processus naturels) en destructurant

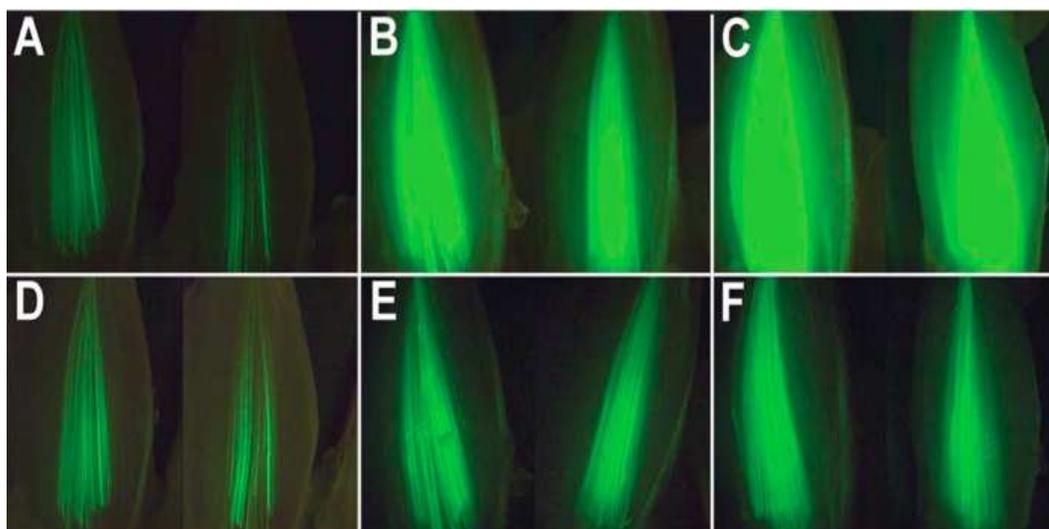


FIG. 1.8 : Influence de l'intensité d'une impulsion longue (400 ms) de bas voltage (A-D : 60 V/cm ; B-E : 80 V/cm et C-F : 100 V/cm) après l'électrotransfert de gènes GFP (une impulsion de 800 V/cm, 100 μ s) dans le muscle tibialis cranialis de souris. Les images A à C ont été prises avec le même temps d'exposition (100 ms) alors que les images D à F ont été prises avec des temps d'exposition différents afin de pouvoir mieux visualiser les endroits affectés. (Satkauskas *et al.*, 2005).

la membrane plasmique par l'application d'impulsions électriques (Mir *et al.*, 1988).

Parmi ces molécules, la bléomycine, agent anti-cancéreux induisant des cassures de l'ADN une fois à l'intérieur de la cellule, a longtemps été utilisée dans des traitements contre certains cancers (Umezawa *et al.*, 1967), mais beaucoup moins utilisée lors de l'apparition de nouvelles molécules plus efficaces pour l'être humain. Grâce à l'arrivée des champs électriques comme vecteur physique vers l'intérieur des cellules, cette molécule a pu revivre (Mir *et al.*, 1996) et donner naissance à l'électrochimiothérapie (Mir et Orłowski, 1999).

Il n'a pas fallu attendre longtemps entre les premières expériences *in vitro* (Mir *et al.*, 1988; Orłowski *et al.*, 1988) puis *in vivo* (Mir *et al.*, 1991b) et les premiers essais cliniques de cette nouvelle technique de traitement de tumeurs cutanées et sous-cutanées (Mir *et al.*, 1991a). Les résultats cliniques ne tarderont pas non plus à l'élever au rang de technique efficace contre ces types de tumeurs (Mir *et al.*, 1998b). En 2006 sont publiés les protocoles cliniques standards (Marty *et al.*, 2006; Mir *et al.*, 2006) dans un supplément du *Journal Européen du Cancer* (Eur. J. Cancer), au terme de deux projets européens visant à mettre au point un générateur (Cliniporator™) et des protocoles systématiques de traitement de ces tumeurs (ESOPE).

Des résultats cliniques sont déjà disponibles dans la littérature prouvant l'efficacité de cette technique pour traiter des tumeurs cutanées et sous-cutanées (Quaglino *et al.*, 2008; Fantini *et al.*, 2008; Curatolo *et al.*, 2009). Campana *et al.* (2009) montrent ainsi qu'il est possible de traiter des mélanomes ou des cancers du sein (dans le cas de patients non traitables par des soins "conventionnels") avec une efficacité de 96 % de patients (52 cas au total) répondant au traitement en moins d'un mois, tout en améliorant la

qualité de vie de ces patients. Ce type de traitement est aussi appliqué en soins vétérinaires (Mir *et al.*, 1997; Rols *et al.*, 2002; Cemazar *et al.*, 2008).

1.2.3.4. Ablation tumorale

Jusqu'à présent, il n'a été question que d'effet transitoire et réversible (en dehors de la lyse cellulaire, qui a pour but de complètement détruire la membrane plasmique, section 1.2.3.1). Si maintenant le champ électrique appliqué est trop important, il peut se produire une perméabilisation dite *irréversible* de la membrane cellulaire (Gabriel et Teissié, 1999; Gehl et Mir, 1999). Par exemple, dans le muscle strié squelettique de souris, le seuil de perméabilisation réversible a été expérimentalement déterminé à 530 V/cm, alors que l'apparition de dommages irréversibles est observée au-delà de 800 V/cm (Gehl et Mir, 1999; Neal et Davalos, 2009).

Pour obtenir un tel effet, il est possible d'augmenter soit la durée des impulsions soit le nombre d'impulsions appliquées (Gabriel et Teissié, 1995; Davalos *et al.*, 2005). Dans les deux cas, le résultat est similaire et permet une ablation tumorale sans intervention chirurgicale lourde (Al-Sakere *et al.*, 2007). Ce phénomène non thermique (Maor *et al.*, 2009) suscite un grand intérêt notamment pour remplacer certains actes chirurgicaux dans des zones difficilement accessibles, par exemple dans le cadre d'une intervention intracrânienne (Garcia *et al.*, 2009). Des techniques de contrôle de la perméabilisation *in vivo* par mesure de bio-impédance sont déjà opérationnelles et permettent de garantir un traitement efficace et sûr (Granot *et al.*, 2009; Ivorra *et al.*, 2009). L'utilisation de cette technique en clinique semble donc fortement réalisable.

1.2.3.5. Fusion cellulaire

Une dernière technique basée sur l'électroperméabilisation s'appelle l'électrofusion et a été découverte par Zimmermann (1982). Lorsque deux cellules électroperméabilisées sont suffisamment proches voire même en contact, leurs membranes respectives peuvent se lier pour ne former qu'une seule cellule hybride. La fusion cellulaire s'observe aussi au cours de certaines pathologies, la principale étant l'infection virale. En effet, l'entrée des virus enveloppés dans les cellules nécessite une fusion entre la membrane virale et la membrane de la cellule hôte. Mais le fait de pouvoir contrôler ce phénomène peut mener à des thérapies : par exemple, à partir de myoblastes génétiquement modifiés, de reprogrammer des cellules musculaires déficientes chez des patients atteints de dystrophie musculaire (Taylor, 2000).

L'utilisation des champs électriques pour déstabiliser la membrane et permettre ainsi la fusion entre deux cellules a été expérimentée sur des cellules en culture par Teissié *et al.* (1982) et modélisée quelques années plus tard par Sugar *et al.* (1987). Cette technique a ensuite été évaluée *in vivo* par Salomskaitė-Davaliene *et al.* (2009).

Aussi, le faible rendement et la difficulté de sélectionner uniquement les produits de fusion de deux cellules ont poussé à la réalisation de microsystèmes spécifiques à ce type d'application, permettant ainsi d'accroître l'efficacité du traitement. Halfmann *et al.* (1982) proposent par exemple un biomicrosystème

permettant (i) de positionner les cellules par diélectrophorèse (DEP) (voir section 2.3.1) à l'aide d'un champ alternatif de 1 kV/cm à la fréquence de 2 MHz puis (ii) d'appliquer un champ de 7 à 8 kV/cm et de 40 ms pour électroperméabiliser les cellules et (iii) permettre leurs fusions. Quelques années plus tard, [Masuda *et al.* \(1989\)](#) proposeront le même type de système mais utilisant 2 canaux séparés afin d'injecter 2 types cellulaires différents.

1.2.4. Conclusion

L'électroperméabilisation est donc une technique sûre de transfert de gènes et de molécules d'intérêt, ayant déjà des applications cliniques comme l'électrochimiothérapie, actuellement proposée dans une soixantaine de centres médicaux en Europe. D'autres techniques médicales émergent de ce phénomène physique, comme l'ablation tumorale, qui vise à terme de pouvoir éviter des interventions chirurgicales lourdes pour des patients ayant des tumeurs difficilement accessibles mais traitables par cette méthode.

Mais alors que les mécanismes associés à l'exposition de cellules ou de tissus à ce type d'impulsions ne sont pas encore totalement connus, un nouveau type d'impulsions électriques ultra-courtes voit déjà le jour, promettant de nouvelles avancées dans le domaine médical.

1.3. La nanomanipulation par application d'impulsions ultra-courtes

De récents progrès technologiques dans le domaine de la génération d'ondes électromagnétiques ont permis la mise en œuvre d'un nouveau type d'impulsions électriques ultra-courtes (de 10 ns à 300 ns) et très intenses (de 10 to 150 kV/cm) appelées nanopulses ou "nanosecond pulsed electric fields" (nsPEF). Des études *in silico* (Gowrishankar *et al.*, 2006) et *in vitro* (Schoenbach *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2003) suggèrent que l'exposition de cellules à ce type d'impulsions entraîne la perméabilisation des membranes des vésicules internes de celles-ci (noyau, mitochondries, endosomes, réticulum endoplasmique...).

1.3.1. Description du phénomène

Les ondes électriques de hautes fréquences (supérieures à quelques MHz) sont capables de traverser une majorité de milieux, y compris diélectriques, et de s'y propager, contrairement aux signaux de plus faible fréquence qui sont limités à la propagation en milieu conducteur. A basse fréquence, la membrane plasmique de la cellule joue un rôle de filtre à la fois chimique (ne laissant passer que certaines espèces moléculaires) et électrique. Elle constitue alors une véritable barrière diélectrique entre le milieu intracellulaire conducteur (le cytosol) et le milieu extérieur conducteur aussi, limitant ainsi les effets des impulsions "longues" à la membrane extérieure.

Au contraire, des impulsions ultra-courtes, qui ont un large contenu spectral (pouvant atteindre le GHz), sont capables d'atteindre l'intérieur de la cellule et en particulier d'affecter les vésicules internes, notamment les mitochondries, en partie régulatrices de l'apoptose (Susin *et al.*, 1998), ou encore le réticulum endoplasmique, réservoir à calcium pour la cellule (Scarlett *et al.*, 2009), sans affecter ou en affectant très peu la membrane plasmique. La plupart des observations rapportées dans la littérature ont en effet comme conséquence d'activer certaines fonctions propres à la cellule (apoptose...) ou de cibler des organites ou molécules intracellulaires (noyau, ADN...) (Schoenbach, 2007). Dans certaines conditions, en particulier pour de plus longues impulsions de cette catégorie ou de longs trains d'impulsions, il a aussi été noté une perméabilisation de la membrane plasmique, mais uniquement pour de petites molécules (Vernier *et al.*, 2006a).

Les mécanismes associés à ces impulsions ne sembleraient donc pas être semblables aux champs électriques étudiés dans la section précédente (1.2). En effet, les temps d'exposition des cellules à ces impulsions sont plus courts que le temps de charge des membranes plasmiques (de l'ordre de la micro-seconde (Kotnik *et al.*, 1998)). Cependant, encore peu d'études, si ce n'est *in silico* (Vernier et Ziegler, 2007; Hu et Joshi, 2009), se sont intéressées aux mécanismes associés aux différents effets observés (décrits dans la suite de cette section). Mais des premiers modèles électriques sont développés afin de pouvoir identifier les signaux électriques auxquels sont confrontés les vésicules internes. Tekle *et al.* (2005) montrent, par exemple, que le temps de charge des vésicules intracellulaires est très court (entre 30 et 60 ns) par rapport au temps de charge de la membrane plasmique (11 μ s) et dépend de leur taille

(voir Fig. 1.9).

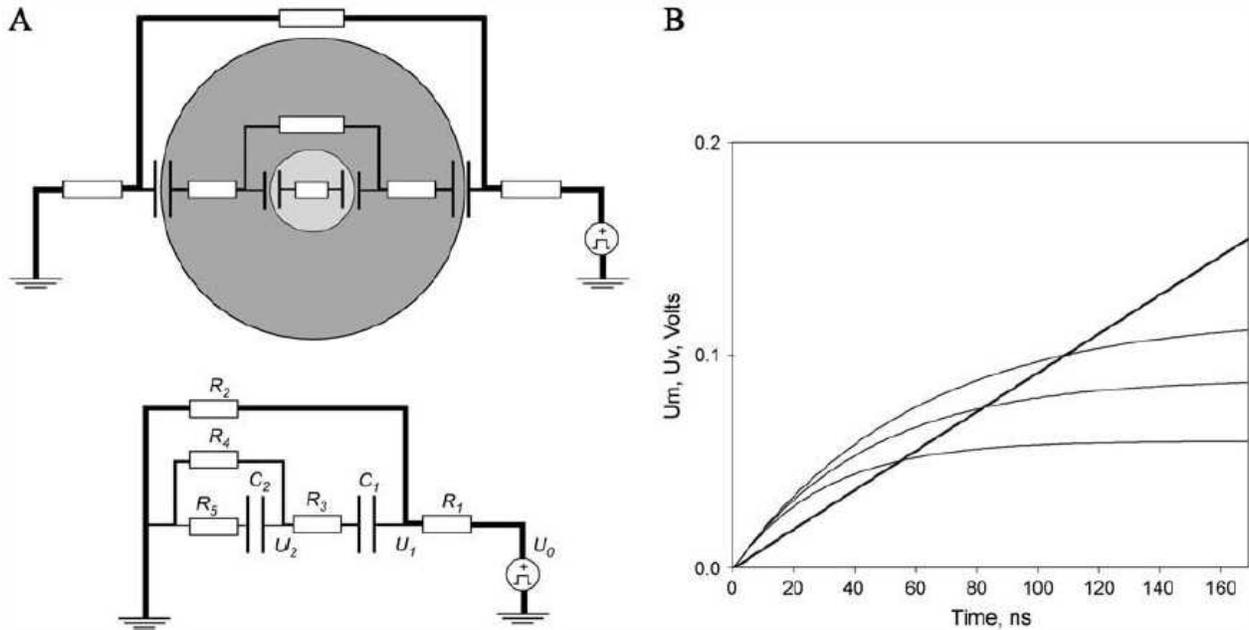


FIG. 1.9 : *Modèle électrique équivalent proposé par Tekle et al. (2005) (A) et le résultat de la simulation (B) basée sur ce modèle avec les conditions suivantes : $r = 10 \mu\text{m}$ (rayon de la cellule), $\sigma_e = 250 \Omega\cdot\text{m}$ (résistivité du milieu extérieur), $\sigma_i = \sigma_v = 1 \Omega\cdot\text{m}$ (résistivité du milieu intracellulaire et du milieu à l'intérieur des vésicules), $C_m = 0,01 \text{ F/m}^2$ (capacité de la membrane), $E_0 = 6,7 \text{ kV/cm}$ (champ électrique appliqué). La constante de temps de la cellule est de 11 ms et les constantes de charge des vésicules sont de 30, 45 et 60 ns pour des rayons de vésicules de 2, 3 et 4 mm (du bas vers le haut sur le graphique B).*

1.3.2. Avancées des travaux

Le manque d'informations sur les mécanismes d'action de ces impulsions n'a pourtant pas empêché d'en étudier les effets qu'il soient intracellulaires (Deng et al., 2003; Vernier et al., 2003; Schoenbach, 2007) ou affectant la membrane plasmique (Pakhomov et al., 2007a), ou bien encore d'entreprendre la mise au point d'applications biomédicales (Nuccitelli et al., 2009).

1.3.2.1. Cibles intra-cellulaires

Une des premières études réalisée sur ce sujet a été décrite par Schoenbach et al. (2001). Un train de 3 à 5 impulsions de 60 ns à une amplitude de 53 kV/cm a été appliqué sur des éosinophiles humains en culture et une modification des granules intracellulaires a pu être observée sans lésions de la membrane plasmique et sans élévation de température. La plupart des expériences qui ont suivi ont permis de valider le fait que ces impulsions induisaient des effets intracellulaires sans affecter la membrane plasmique (Beebe et al., 2003b). Parmi ces effets, on peut citer que :

- les nsPEF peuvent entraîner des dommages au niveau de l'ADN et modifier le cycle cellulaire (Stacey et al., 2003) ;

- ces impulsions peuvent déclencher l'apoptose (Beebe *et al.*, 2003a; Hall *et al.*, 2007b);
- elles peuvent être à l'origine de l'activation de caspases (Beebe *et al.*, 2004);
- elles induisent l'externalisation ou la translocation des phosphatidylsérines (Vernier *et al.*, 2004a, 2006b);
- une seule impulsion de 10 ns à 150 kV/cm augmente la quantité de tâches sur le noyau par un facteur 2,5 (Chen *et al.*, 2007);
- une seule impulsion de 300 ns à 30 kV/cm provoque une agrégation de plaquettes humaines (Zhang *et al.*, 2008);
- les cellules en phase S sont plus réceptives à ce type d'impulsions (Hall *et al.*, 2007a);
- trente minutes après un électrotransfert de plasmide pEGFP (0,3 kV/cm - 3,5 ms), l'application d'une seule impulsion de 10 ns à 150 kV/cm entraîne une augmentation de la quantité de cellules exprimant la GFP (Beebe *et al.*, 2003b).

Cette dernière étude de Beebe *et al.* (2003b), et en particulier la possibilité d'augmenter l'efficacité de l'électrotransfert *in vitro*, servira de base aux expériences dont les résultats sont présentés dans le chapitre 7.

Tekle *et al.* (2005) ont aussi montré qu'il était possible de sélectionner certains types de vésicules et d'en perméabiliser leur membrane en modifiant les conditions expérimentales (comme l'amplitude ou la durée des impulsions). Enfin, Hair *et al.* (2003) ont montré que l'interaction avec les nsPEF était cellule-dépendant, en testant l'exposition de 6 lignées cellulaires humaines différentes.

1.3.2.2. Calcium intracellulaire

Un ensemble d'études s'est intéressé à l'augmentation transitoire du calcium intracellulaire lors de l'application de nsPEF (Beebe *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008). Le calcium intracellulaire est un messager secondaire dans un grand nombre de voie de signalisation. Les variations de sa concentration intracellulaire sont des précurseurs clefs dans la modulation de certaines enzymes (activation de certaines protéines kinases ou des endonucléases, augmentation de la synthèse d'ATP, activation du cycle cellulaire par le biais de la calmoduline,...). Bien que le calcium intracellulaire semble indispensable au bon fonctionnement cellulaire, une augmentation trop importante de sa concentration ou une concentration élevée pendant une longue période (synonyme aussi d'un stress quelconque de la part de la cellule) peut entraîner l'hyperactivation des endonucléases, par exemple, pouvant aboutir à l'apoptose.

L'application d'une impulsion de 30 ns à 25 kV/cm entraîne une augmentation transitoire (quelques secondes à quelques minutes) du calcium intracellulaire d'environ 15 %, alors qu'un train de 10 impulsions du même type entraîne une augmentation de 30 % (Vernier *et al.*, 2003). En 2007, un modèle électrique vient étoffer cette expérience, montrant qu'une faible augmentation (moins de 2 fois la valeur initiale) du calcium intracellulaire a lieu dans des cellules pendant environ 5 min (Joshi *et al.*, 2007). Scarlett *et al.* (2009) ont aussi décrit une possibilité de réguler ce calcium intracellulaire en jouant sur l'intensité d'impulsions de 60 ns : une amplitude de 25 kV/cm entraîne un pic de 20 à 30 % par rapport

à la valeur initiale, une amplitude de 50 kV/cm de 40 à 100 % et une amplitude de 100 kV/cm de 100 à 200 %.

Ce calcium intracellulaire proviendrait essentiellement du réticulum endoplasmique qui serait affecté par ce type d'impulsions. Cette hypothèse semble avoir été vérifiée par [Hu *et al.* \(2005\)](#) dans une simulation qui montre que l'ouverture de pores dans les membranes lipidiques est facilitée en présence de calcium, le réticulum endoplasmique étant la principale réserve calcique d'une cellule.

Il a aussi été étudié l'effet de ces impulsions sur l'entrée de calcium présent en solution à l'intérieur de cellules chromaffines ([Vernier *et al.*, 2008](#)). Une impulsion de 4 ns à 80 kV/cm produit une augmentation de l'ordre de 50 % du calcium présent à l'intérieur de la cellule, mais les cinétiques sont un peu plus courtes (quelques secondes). Lors de l'application d'une seconde impulsions du même type, alors que le retour à la normale n'est pas encore vérifié (soit 8 s après, soit 40 s après), entraîne un léger pic calcique. Enfin, en présence de nitrendipine (molécule antagoniste du calcium), aucune entrée de calcium n'est relevée ([Vernier *et al.*, 2008](#)) prouvant que, dans ces conditions là, les nsPEF ne perméabilisent pas la membrane.

1.3.2.3. Perméabilisation membranaire

Bien que les premières hypothèses, lors de la découverte d'effets par application d'impulsions ultra-courtes sur des cellules, avançaient que ces nsPEF pouvaient atteindre des cibles intracellulaires sans affecter la membrane plasmique, la première étude biologique publiée concernant les nsPEF faisait entendre l'inverse. En effet, [Muller *et al.* \(2001\)](#) ont montré que la membrane plasmique pouvait être perméabilisée de façon réversible en appliquant une seule impulsion de 95 ns entre 75 et 150 kV/cm. Il est aussi montré qu'il existe un lien entre l'électrodéformation des cellules et la conductivité du milieu et que moins le milieu est conducteur, plus l'élongation est grande facilitant ainsi l'entrée d'IP dans les cellules ([Muller *et al.*, 2001](#)).

Après s'être penché un peu plus sur la théorie et par le biais de modèle numérique, il a été mis en évidence que toutes les membranes cellulaires étaient perturbées par ces impulsions, y compris la membrane externe de la cellule et quelque soit la durée des impulsions pourvue qu'elle soit supérieure à 2 ns ([Vernier *et al.*, 2004b](#)). Mais ces perturbations peuvent être si faibles qu'elles n'ont aucune conséquence sur le membrane plasmique en terme de perméabilisation ([Vernier *et al.*, 2008](#)).

Des simulations réalisées en dynamique moléculaire montrent que l'apparition de pores sur les différentes membranes intervient après 5-6 ns pour des champs électriques de 10 kV/cm ([Hu *et al.*, 2005](#)). Des expériences faisant intervenir des impulsions plus longues (60 ns à 95 kV/cm ([Frey *et al.*, 2006](#))) ou des simulations avec des impulsions plus intenses (entre 10 ns et 20 ns et entre 100 et 250 kV/cm ([Hu et Joshi, 2009](#))) confirment aussi ce résultat en montrant qu'une modification du potentiel transmembranaire est obtenue, permettant d'atteindre les seuils d'électroperméabilisation réversible. De plus, une expérience basée sur le contrôle de la conductivité de la membrane par une méthode de "patch clamp" a montré

qu'une seule impulsion de 60 ns à 12 kV/cm entraînait une réduction de la résistance de la membrane durant quelques minutes (Pakhomov *et al.*, 2007a). Cette diminution de la conductivité s'accompagne d'une chute du potentiel transmembranaire mais sans entrée de marqueur fluorescent (IP), y compris lors de l'application d'un nombre plus important d'impulsions (200) qui semblerait toutefois causer des dommages irréversibles sur la cellule (Pakhomov *et al.*, 2007b).

Cependant, il semblerait que les effets diffèrent de ceux obtenus en électroperméabilisation plus conventionnelle (Beebe et Schoenbach, 2005) et que des trains d'impulsions de plus forte intensité entraînent une perméabilisation à de petites molécules. Une augmentation de la fluorescence due à l'entrée d'IP ou de YO-PRO-1 dans le cytoplasme a en effet été observée lors de l'application d'un train de 30 impulsions de 4 ns à 80 kV/cm et à 1 kHz (Vernier *et al.*, 2006a). L'augmentation de la fréquence de répétition jusqu'à 10 kHz permet aussi d'augmenter encore l'entrée de ces molécules à l'intérieur des cellules.

A la vue de ces différentes études, il ne semble pas évident qu'une relation simple, combinant le nombre, l'intensité, la durée des impulsions et la fréquence de répétition, permette de comprendre aisément la perméabilisation par l'application de nsPEF.

1.3.2.4. Traitement de tumeurs

Des études un peu plus récentes se sont aussi consacrées à l'effet de l'exposition de cellules, ou groupes de cellules voire même de tissus tumoraux, à ce nouveau type d'impulsions électriques, dans le but de pouvoir les traiter par ce biais.

Une des premières équipes à s'être intéressé à ce type d'expériences est l'équipe de Karl Schoenbach, avec le travail rapporté par Nuccitelli *et al.* (2006). Des mélanomes murins (B16-F10) sur des souris de type SKH-1 ont été exposés à un train de 10 ou 100 impulsions de 4 à 8 kV (10 à 20 kV/cm) et d'une durée de 300 ns par l'intermédiaire d'une matrice de 5 électrodes en forme d'aiguille. Le premier effet notable est une interruption du flux sanguin au niveau de la tumeur ne se rétablissant complètement qu'après 2 semaines. Cette étude montre que l'intensité des impulsions et leur nombre jouent un rôle important dans l'efficacité du traitement. En effet, alors que 4 kV (~10 kV/cm) ne semble avoir aucun effet sur la croissance tumorale que ce soit pour 10 ou 100 impulsions, 100 impulsions de 8 kV (~20 kV/cm) ont un impact beaucoup plus important sur la régression tumorale que seulement 10 impulsions à la même amplitude. Dans le cas d'un second traitement de 100 impulsions, les tumeurs régressent de 75 % par rapport à leur volume initial en l'espace de 8 jours.

Il est à noter qu'en utilisant des électrodes planes à la place d'une matrice d'électrodes, une croûte noire apparaît en surface de la peau au bout de 2 jours et ne disparaît que 2 semaines plus tard, lorsque le *stratum corneum* s'est régénéré. Un brevet protégeant l'utilisation de nsPEF dans le cadre d'un traitement de mélanomes a été déposé à la suite de cette étude (brevet n° WO/2007/100727).

Une seconde étude, partant de l'*in vitro* pour arriver à l'*in vivo* et réalisée conjointement par les équipes de Gundersen et Koeffler, a aussi montré que l'application d'impulsions nanosecondes permet-

tait l'éradication de certaines tumeurs malignes chez la souris (Garon *et al.*, 2007). Les expériences *in vitro* ont permis de sélectionner le meilleur set de paramètres : 200 impulsions de 20 ns à 35 kV/cm causent l'éradication complète de l'ensemble des cellules. Ces paramètres ont ensuite été optimisés pour l'application *in vivo*. Afin de délivrer les impulsions sans créer d'arc électrique, une incision dans la peau est réalisée afin d'insérer le cathéter supportant les électrodes au plus proche de la tumeur. Un train de 200 impulsions d'une amplitude de 6,5 kV et d'une durée de 20 ns permettent d'obtenir une décroissance du volume tumoral au bout de 2 jours.

Plus récemment encore, un traitement basé sur l'application d'un ou plusieurs trains de 300 à 600 impulsions de 300 ns entre 40 et 50 kV/cm a conduit à une régression complète sur l'ensemble de la cohorte de souris SKH-1 (Nuccitelli *et al.*, 2009). Une injection de 10^6 cellules B16-F10 dans le flanc des souris est à l'origine de mélanomes de diamètre de 3-4 mm après 3 jours. Ces tumeurs ont ensuite été traitées à l'aide de 2 électrodes planes de 5 mm de diamètre et séparées de la tumeur de 1 mm. Toutes les souris ont reçu un premier traitement. 4/17 ont montré une régression complète de la tumeur au bout de 29 jours. 10/17 souris ont du subir un second traitement du même type dès qu'il est apparu une reprise de la croissance tumorale aboutissant deux semaines plus tard à la rémission complète. Les 3 dernières souris du groupe ont du subir un troisième traitement afin d'obtenir le même résultat.

Les causes possibles de l'efficacité de ce traitement, avancées par cette équipe, viendraient de la faculté des nsPEF à :

- induire l'apoptose directement (Beebe *et al.*, 2002, 2003a; Hall *et al.*, 2007b)
- augmenter la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Vernier *et al.*, 2003; White *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2007; Vernier *et al.*, 2008) pouvant aboutir là encore à l'apoptose par altération de l'ADN, comme nous l'avons vu dans la section 1.3.2.2.

Quelque soit l'étude considérée, toutes rapportent que ce type de traitement entraîne une élévation de température au niveau des tissus traités. Nuccitelli *et al.* (2006) ont mesuré une élévation de 3 °C pour un train de 100 impulsions de 20 kV/cm et de 300 ns, appliqué à une fréquence de répétition de 0,5 Hz. La température finale n'excède pas 33 °C. Garon *et al.* (2007) calculent quand à eux que la température resterait inférieure à 42 °C, température à partir de laquelle les protéines de choc thermique sont activées. Pour comparaison, l'utilisation de micro-ondes dans le cadre de traitement par hyperthermie peuvent chauffer jusqu'à une température supérieure à 43 °C (Haemmerich et Laeseke, 2005). Enfin, des études s'appuyant sur des modélisations par élément finis (FEM) ont montré que l'ablation de tumeurs par nsPEF entraînait une augmentation de 0,15 °C pour une impulsion de 325 ns à 20 kV/cm et de l'ordre de 0,6 °C pour une impulsion à 40 kV/cm (Esser *et al.*, 2009). Des effets thermiques ne sont donc pas à exclure, surtout si l'on considère le nombre important d'impulsions délivrées durant les traitements présentés ici (10 à 300 impulsions).

1.3.3. Conclusion

En à peine une décennie, l'exposition de cellules et de tissus à des impulsions électriques ultra-courtes (quelques dizaines de nanosecondes) se sera hissé du stade expérimental (Schoenbach *et al.*, 2001) au rang de traitement de lésions tumorales cutanées basé sur l'induction de l'apoptose (Tang *et al.*, 2009). La plupart des travaux réalisés avec ce type d'impulsions ont été condensés dans deux revues écrites par Sundararajan (Sundararajan, 2008, 2009).

Mais ce nouveau type d'impulsions n'est pas aussi simple à mettre en œuvre que le laisse penser la plupart des publications sur le sujet. En effet, n'importe qui ne peut pas se lancer aussi simplement dans cette grande aventure. La réalisation d'un système de génération d'impulsions aussi courtes (Gundersen *et al.*, 2004; Kolb *et al.*, 2006), la nécessité de contrôler l'ensemble des paramètres électriques (lors de la génération ou de l'exposition) impliquant une parfaite adaptation entre les différents éléments de la chaîne de traitement, le contrôle de haute tension et de courant fort mais transitoires (quelques nanosecondes) ou encore la visualisation de la distribution du champ électrique (Garon *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009) ou l'élévation de température (Esser *et al.*, 2009) sont autant de difficultés qu'il faut pouvoir surmonter afin de garantir une répétabilité et une reproductibilité des expériences lors de l'exposition de cellules ou de tissus à des nsPEF (voir article en annexe 9.7 - page xix).

L'APPORT DES MICROTECHNOLOGIES DANS LE DOMAINE DE LA BIOLOGIE

Nous venons de voir, dans le chapitre précédent, l'impact des champs électriques pulsés sur le monde vivant (cellules et tissus). Nous allons à présent nous intéresser au développement de microsystèmes. Le lecteur peut se demander pourquoi un tel changement de sujet et quel lien peut-il bien exister entre ces deux chapitres. Il s'agit de la biologie.

En effet, nous avons vu jusqu'à présent des techniques permettant d'appliquer des champs électriques pulsés de façon sûre sur des objets évoluant dans des environnements très contrôlés et entraînant des effets utilisés par la suite dans le domaine médical. Mais dans tous les cas, on ne s'intéressait qu'à un résultat global, ce résultat n'étant qu'une moyenne statistique sur un ensemble de cellules ayant théoriquement subi le même traitement. Or, il peut être tout aussi intéressant de savoir ce qu'il se passe au niveau d'une cellule unique (isolée), de sa membrane ou de son cytoplasme, ou bien encore de rendre les conditions d'exposition parfaitement identiques d'un objet à l'autre, sans pour autant perdre en rendement.

C'est là qu'apparaissent alors les biomicrosystèmes. Développés selon des techniques adaptées de la microélectronique, l'évolution constante de ces méthodes au cours des deux dernières décennies aura permis à ces biopuces de passer du rang de simples outils de visualisation de certains effets à celui de véritables laboratoires-sur-puce, permettant alors d'augmenter le rendement et l'efficacité tout en diminuant les coûts de certains traitements cellulaires ou diagnostics médicaux.

Dans ce chapitre, nous aborderons brièvement la microélectronique et les techniques qui en ont découlé, pour ensuite dériver vers des méthodes de développement de microsystèmes et de biomicrosystèmes. Nous verrons enfin quelques exemples d'utilisation de biopuces dans des études sur l'interaction champs électriques et objets vivants.

2.1. Des systèmes basés sur des techniques de fabrication de la microélectronique

Les systèmes dont nous allons parler dans ce chapitre ont actuellement des tailles très réduites et permettent de traiter un très grand nombre d'informations en un minimum de temps et d'espace. Avant de s'intéresser aux différentes techniques de fabrication à l'échelle micronique, l'historique de la microélectronique sera brièvement retracé, en partant du transistor pour en arriver aux plus complexes et évolués des circuits intégrés, le processeur. Comme toute nouvelle technologie, il aura fallu quelques décennies avant de mettre au point les techniques de fabrication des processeurs d'aujourd'hui, permettant d'obtenir une intégration très élevée pour un coût très faible.

2.1.1. Les premiers pas vers la microélectronique

2.1.1.1. Du transistor aux circuits intégrés

Une des plus grandes avancées en électronique est en effet la découverte du transistor en 1947, par John Bardeen, Walter Brattain et William Shockley (Bell Téléphone). Son encombrement réduit et sa faible consommation, comparés aux lampes, ont permis à ses inventeurs d'obtenir le prix Nobel en 1956 et ont ouvert la voie vers la miniaturisation. Depuis, les industries technologiques et la recherche scientifique ont cherché à regrouper de plus en plus de fonctions sur un seul et même support, appelé circuit intégré. L'un des premiers fût réalisé en 1957 par Jack Kilby (Texas Instruments). L'association de plusieurs transistors reliés entre eux a permis de donner naissance aux premières mémoires et unités logiques et arithmétiques. Les premières briques de ce qui deviendra plus tard la microélectronique étaient posées.

Ces progrès fulgurants dans le domaine de l'électronique ont aussi permis l'évolution rapide de l'informatique avec l'apparition de la seconde génération d'ordinateurs basée sur le transistor (IBM 1700 en 1960) puis de la troisième génération d'ordinateurs basée sur des circuits intégrés. En plus d'intéresser la NASA pour son système de guidage d'Apollo (à partir de 1961), ces nouveaux systèmes réduits font leur entrée dans des ordinateurs adaptés au monde de la recherche scientifique (IBM série 360 et DEC PDP-8, en 1964). Mais il faudra attendre la quatrième génération d'ordinateurs, dans les années 70, pour voir apparaître le nom de "mini-ordinateur" ou bien encore de microprocesseur. Des langages plus évolués de programmation, tels que le C ou le Pascal, verront aussi le jour pour laisser place par la suite à des langages dits objets (C++ ou Java par exemple).

2.1.1.2. Toujours plus de composants par centimètre carré

Avec l'apparition de ces tous premiers processeurs intégrés et les évolutions qu'ils promettaient, G.E. Moore, un des trois cofondateurs de la société Intel®, postula en 1965 ce qui deviendra la première loi de Moore : la complexité des semi-conducteurs devra doubler tous les ans. Cette loi, qui sera réévaluée

quelques années après en posant que le nombre de transistors des microprocesseurs devra doubler tous les deux ans sur une même puce de silicium, conduira à une augmentation croissante de la quantité de transistors par unité de surface et à une augmentation nette de la résolution de gravure des semi-conducteurs sur les substrats.

La figure 2.1 montre l'évolution depuis 1970 (quatrième génération d'ordinateurs) du nombre de transistors sur un même substrat de silicium. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une loi physique mais juste d'une extrapolation empirique, cette prédiction s'est révélée étonnamment exacte. Entre 1971 et 2001, la densité des transistors a doublé chaque 1,96 année. En conséquence, les machines électroniques sont devenues de moins en moins coûteuses et de plus en plus puissantes.

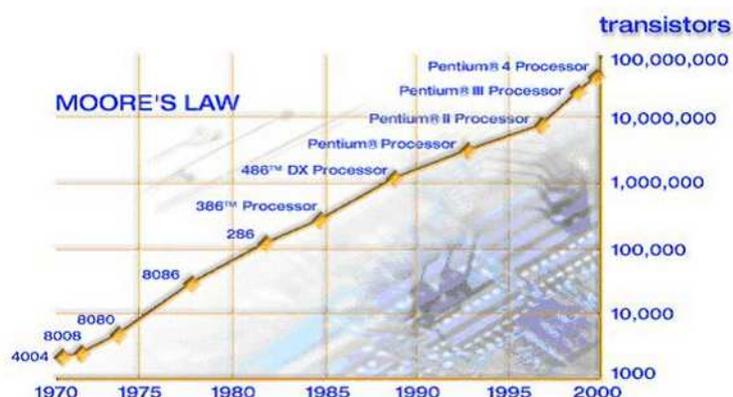


FIG. 2.1 : Croissance du nombre de transistors dans les microprocesseurs Intel® (www.intel.com).

Le tout premier processeur commercial, le Intel® 4004 en 1971, comptait 2.300 transistors gravés avec une technologie de 10 μm (c'est à dire avec une résolution de 10 μm) pour un coût d'achat de 200 \$. Il comptait un jeu de 46 instructions et pouvait exécuter environ 50.000 instructions par seconde. Il faudra ensuite attendre l'arrivée du Pentium™ en 1993 pour dépasser le million de transistors sur un même substrat (3,1 puis 3,3 millions), permettant d'atteindre 1 million d'instructions par seconde grâce à une technologie de gravure inférieure au micromètre (800 nm).

Mais cette course à l'intégration a rencontré, au cours de la dernière décennie, une limitation importante provenant de la cadence maximale atteignable par les processeurs sans risquer un échauffement trop important entraînant leur destruction. Les constructeurs n'ont alors plus cherché à accroître la rapidité d'exécution des instructions par un seul processeur mais à paralléliser leur traitement. A partir de 2006 sont alors apparus sur le marché les premiers processeurs intégrant plusieurs unités de calcul (appelés cœurs) (Core™ 2 Duo). En 2010, avec l'apparition de l'architecture Nehalem, Intel sort les premiers processeurs à 6 cœurs gravés à 32 nm (Core™ i7 980X). L'intégration de plus d'un milliard de transistors permet alors d'atteindre 160 milliards d'instructions par seconde sur un substrat qui ne fait que 248 mm².

Cette croissance exponentielle de la vitesse de calcul et de la quantité d'instructions exécutables en un temps donné a été possible grâce à l'évolution des technologies de gravure du silicium, passant d'une dizaine de micromètres à quelques dizaines de nanomètres de résolution en l'espace de 40 ans.

2.1.2. Vers les premiers microsystèmes

S'appuyant sur des développements de technologies issues de la microélectronique, une nouvelle catégorie de systèmes à l'échelle micrométrique s'est développée. Ces microsystèmes, alors appelés MEMS (*MicroElectroMechanical Systems*), ont su prendre part au marché croissant des nouvelles technologies et s'intégrer de plus en plus dans des applications quasi-quotidiennes. Ainsi apparaissent, dans les années 1990, les premiers micro-moteurs (Fan *et al.*, 1989; Tai et Muller, 1989) et accéléromètres (Tang *et al.*, 1990). Certains développeurs réduiront encore plus leur dimension pour les inclure dans leurs téléphones mobiles ou leurs consoles de jeux, dans les années 2000, laissant ainsi entrevoir les prémices des NEMS (*NanoElectroMechanical Systems*).

Mais le tout premier système entrant dans cette catégorie des MEMS a été réalisé par Nathanson *et al.* (1967) qui propose un transistor à effet de champ possédant une grille résonante permettant de pouvoir sélectionner et amplifier certaines gammes de fréquence avec un facteur de qualité Q très élevé (voir Fig. 2.2).

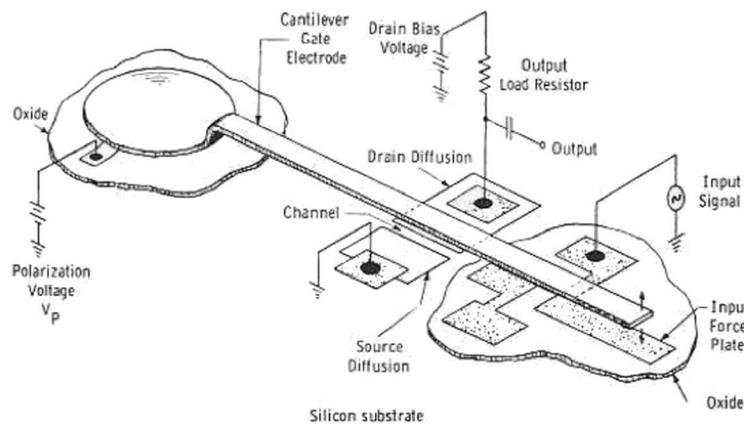


FIG. 2.2 : Transistor à effet de champ à grille résonante, réalisé à l'aide de techniques de la microélectronique. (Nathanson *et al.*, 1967).

Ces systèmes empruntent non seulement les techniques de la microélectronique, mais aussi les différents matériaux de fabrication et, en particulier, ses substrats et ses résines, en les adaptant à l'application visée. Alors que les circuits intégrés (décrits dans la section précédente) utilisent les propriétés électriques du silicium, les microsystèmes utilisent ses propriétés mécaniques, éventuellement combinées à ses propriétés électriques. De manière générale, les couches utilisées dans les microsystèmes sont beaucoup plus épaisses (pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres) que celles utilisées en microélectro-

nique.

2.1.3. Des techniques de fabrication à l'échelle micrométrique

Les technologies de fabrication des microsystèmes dérivent assez largement de celles de la microélectronique. Le développement de ces techniques nécessite l'utilisation d'un support, encore appelé substrat ou "wafer". En microélectronique, ces substrats sont généralement des tranches très fines de silicium monocristallin, utilisé pour ses propriétés électriques (semi-conductrices) mais aussi pour sa facilité d'être gravé, beaucoup de techniques ayant été développées sur ce type de support. Le développement de microsystèmes peut se faire sur silicium mais aussi sur d'autres matériaux tels que le verre ou le quartz, utilisés pour leur transparence d'un point de vue optique.

Ces microsystèmes comportent souvent des parties mobiles, contrairement aux circuits intégrés, qui leur confèrent, en plus de leurs tâches électriques initiales, des fonctions particulières leur permettant d'interagir avec d'autres objets. Ils sont produits par une succession d'étapes d'épithaxie, d'enrésinement, de photolithographie et de gravure sèche ou humide, jusqu'à obtenir la géométrie et la fonction souhaitée (Mahalik, 2008). Ces étapes peuvent être classées dans 3 catégories (voir aussi figure 2.3) :

- la déposition de matériaux de tout type, par évaporation chimique ou physique ou par oxydation ;
- l'impression de motifs micrométriques, essentiellement réalisée par lithographie ;
- la gravure de matériaux, par voie sèche ou humide.

Des étapes de découpage des substrats et d'emballage du système sont aussi à prévoir dans le développement de telles puces.

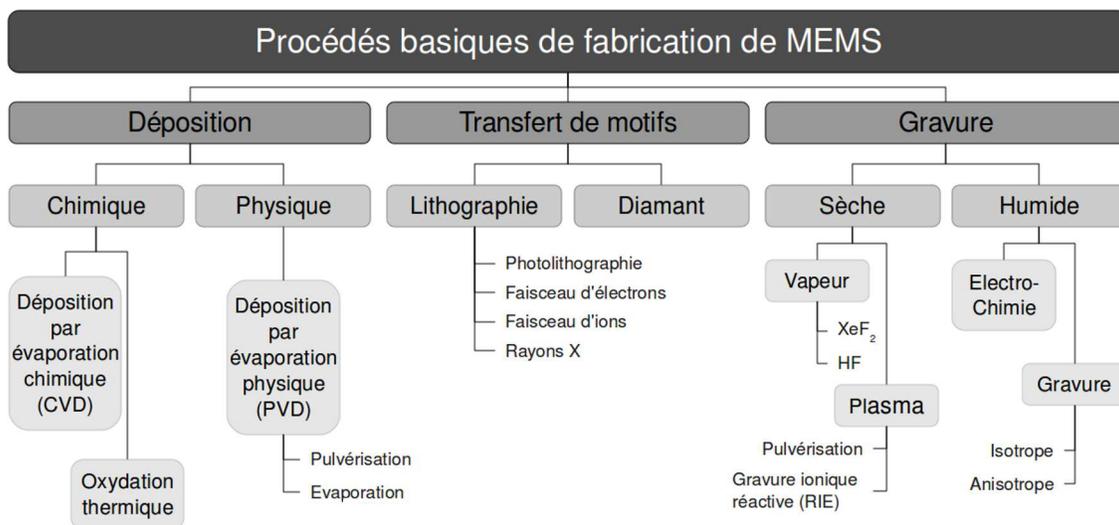


Fig. 2.3 : Procédés de fabrication de microsystèmes. XeF_2 : difluorure de Xenon, HF : acide fluorhydrique.

La déposition de matériaux sous forme de films très fins est l'une des étapes de base dans la réalisation d'un système à cette échelle. Il est possible de déposer un grand nombre de matériaux, des métaux

jusqu'aux polymères, avec des épaisseurs de quelques nanomètres à environ une centaine de micromètres. Cette étape permet de structurer le substrat en domaines actifs ou passifs d'un point de vue électrique par exemple, mais aussi chimique, par dépôt de produits ayant des affinités ou non avec des molécules à analyser par le microsystème. Cette étape peut être liée à la suivante.

L'impression ou le transfert de motifs d'un matériau à l'autre est elle aussi une étape importante. La technique la plus largement utilisée est la lithographie, basée sur l'exposition à des rayons irradiants de différents matériaux sensibles à ce rayonnement. La photolithographie utilise la lumière comme source et l'exposition à des rayons ultraviolets de matériaux photosensibles à travers des masques, généralement en chrome, détermine alors les motifs à transférer. La résolution de ces masques est alors importante pour la bonne définition des géométries. Une attaque souvent chimique permet ensuite de retirer les zones de matière exposées (ou non, selon le type de résine utilisée).

Enfin, on peut avoir recours à des techniques dites de gravure : humide, d'une part, permettant la dissolution d'une partie d'un matériau dans un produit d'attaque chimique, et sèche, d'autre part, faisant alors appel à la pulvérisation de matériaux ou la dissolution par utilisation d'ions réactifs ou de produits chimiques dans leur phase gazeuse. Ces techniques permettent d'obtenir une bonne sélectivité due essentiellement à la nature chimique du procédé.

2.1.4. Apport de la microfluidique

La miniaturisation seule des composants, que couvre aujourd'hui les micro- et nanotechnologies, n'aurait pu permettre à elle seule d'étudier des phénomènes toujours plus complexes. Elle s'est associée à la microfluidique, qui depuis plus d'une vingtaine d'années permet d'étudier « les écoulements de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques, dans des microsystèmes artificiels, c'est-à-dire fabriqués à l'aide des nouvelles technologies » (Tabeling, 2003).

Il est d'ailleurs à noter que l'un des premiers microsystèmes commercialisés incluait de la fluidique à petite échelle. En effet, dès les années 1970, les premières têtes d'imprimantes intégrées à jet d'encre sont apparues, développées par IBM (Buehner *et al.*, 1977).

Pour obtenir de tels systèmes, il a fallu adapter les procédés de lithographie pour produire des micro-canaux à la surface d'un substrat solide. Quelques découvertes faciliteront par la suite le développement de telles puces, comme l'utilisation du polydiméthylsiloxane (PDMS) pour fabriquer des canaux microfluidiques (Duffy *et al.*, 1998; Jo *et al.*, 2000). Son utilisation permettra l'expansion rapide des biopuces dans de multiples domaines telles que la pharmacologie qui bénéficiera des avantages de la parallélisation dans les tests de nouveaux produits (Petra et Manz, 2006).

A ces échelles microscopiques, les écoulements diffèrent de ceux étudiés par la mécanique des fluides aux échelles macroscopiques. En effet, des phénomènes comme la capillarité et les forces de viscosité deviennent prépondérants tandis que d'autres, comme la gravité, deviennent négligeables. Ces différents

écoulements, quelles que soient leurs échelles, sont caractérisés et comparés à l'aide de nombres dits adimensionnels, recensés avec les phénomènes qui leur sont associés par [Squires et Quake \(2005\)](#).

Déplacer de faibles volumes de solution nécessite alors la mise en place de système basé sur la pression ([Thorsen et al., 2002](#)), le vide ou encore la conduction électrique ([Fair, 2007](#)). Une bonne maîtrise de ces écoulements permet alors, par exemple, la mise en contact de deux milieux sans les mélanger et de faire échanger des particules entre ces deux solution ([Tornay et al., 2008](#)).

L'association entre la microfluidique et la microélectronique permet alors d'ajouter des fonctions électriques sur des systèmes d'écoulement miniature afin de récolter ou émettre différents signaux à petite échelle. [Senez et al. \(2008\)](#) mettent ainsi en œuvre de nouveaux capteurs électrochimiques en trois dimensions, dont les tailles n'excèdent pas la dizaine de micromètres, permettant par exemple la caractérisation d'impédance à l'échelle cellulaire. Grâce aux nouvelles possibilités offertes par les nanotechnologies, cette équipe a pu réaliser ces mêmes types de capteurs à l'échelle sub-micrométrique afin de proposer un système d'analyse en flux par impédancemétrie ([Debuisson et al., 2008](#)). Constitué de nanofils d'or, ce microsystème a été utilisé pour l'analyse en temps réel des interactions ligand-récepteur au niveau de la membrane cellulaire sans passer par l'utilisation de marqueurs. Un système équivalent a été adapté au test de la présence de certains parasites dans l'eau proposant ainsi une alternative sans marqueur de ces analyses réalisées jusqu'à présent par coloration fluorescente et suivies sous microscope ([Houssin et al., 2010](#)).

D'autres fonctions, telles que des vannes intégrées en PDMS ([Unger et al., 2000](#)) ou des micro-pompes, ont été mises au point pour augmenter encore les possibilités de développement d'applications spécifiques. Le micro-moulage est le procédé le plus répandu dans ce domaine, permettant de structurer les matériaux déposés dans toutes les dimensions et avec d'importants rapports de forme. Le moule est ensuite généralement sacrifié par attaque chimique ou physique afin de ne conserver que la structure utile.

Tous ces développements en matière de microfluidique offrent ainsi la possibilité à [Thorsen et al. \(2002\)](#) de proposer une intégration à grande échelle de cette méthode afin de pouvoir faire de l'adressage fluide dans des microcanaux. Cette avancée permettra le développement de systèmes toujours plus complets, tels qu'un laboratoire-sur-puce dédié à la purification d'acides nucléiques, nécessitant du tri cellulaire ([Hong et al., 2004](#)), qui amènera à la réalisation d'un système d'isolation d'ARN messager (mRNA) sur cellule unique dans le but de synthétiser par la suite de l'ADN complémentaire (cDNA) ([Marcus et al., 2006](#)). L'année d'après, cette équipe proposera même un véritable processeur à cellules ([Zhong et al., 2007](#)).

D'autres systèmes, n'intégrant pas de microfluidique, font toutefois appel à ces polymères facilement usinables et façonnables. Les propriétés optiques du PDMS ont ainsi permis la réalisation de guides d'ondes optiques à bas coûts, stables et avec de faibles pertes ([Kopetz et al., 2007](#)). Sa malléabilité permet aussi de développer des systèmes flexibles. [Tiercelin et al. \(2006\)](#) ont pu développer des antennes ultra-

flexibles haute fréquence (testées dans la bande des 60 Ghz) se basant sur les propriétés diélectriques particulières du PDMS, permettant de réduire les pertes diélectriques par rapport à des antennes plus classiques tout en garantissant des résultats similaires.

2.2. Vers le développement de biomicrosystèmes

Petit à petit, les microsystèmes ont intégrés de nouvelles techniques de développement basées sur le micro-usinage de nouveaux matériaux, tels que les plastiques ou les polymères, se différenciant alors de plus en plus de la microélectronique. La microfluidique a permis la réalisation de véritables réseaux hydrauliques ou/et pneumatiques, à l'échelle micronique, et ainsi de pouvoir traiter des fluides, par exemple pour les faire interagir (Manz *et al.*, 1990b).

La fabrication sur de nouveaux types de substrat est aussi en plein essor, en particulier sur le verre, qui permet notamment la visualisation à l'aide d'un microscope à transmission. Il est alors possible de mettre en place des microsystèmes par exemple pour la détection par méthode optique de certaines réactions (DeMello, 2006) ou l'analyse de cellules en micro-cytomètre de flux (Gawad *et al.*, 2010). La miniaturisation de tels procédés a de nombreux avantages, que nous allons lister par la suite, mais pas uniquement dans le domaine de la chimie ou de l'optique. En effet, les dimensions de ces microsystèmes sont totalement en accord avec les objets manipulés en biologie cellulaire et dans le monde du médical. L'utilisation de la microfluidique laisse donc entrevoir de nouvelles perspectives pour le monde du biomédical, en offrant la possibilité de réaliser sur un même support de quelques centimètres carrés un laboratoire complet d'analyse biologique (Burns *et al.*, 1998).

2.2.1. L'intérêt de la miniaturisation

L'utilisation de systèmes miniaturisés en biologie a de nombreux avantages qui convergent, pour la plupart, vers la réduction des coûts d'analyse : que ce soit par la diminution des coûts de fabrication de ces systèmes, par la diminution de la quantité de réactifs à utiliser ou bien encore par la parallélisation des chaînes d'analyse qui accroît la capacité à traiter des échantillons. La microfluidique se voit alors engager dans la même course à la multiplication des fonctions par unité de surface que la microélectronique a vécu quelques années auparavant.

2.2.1.1. Réduction de la taille et des volumes traités

Le premier intérêt des biomicrosystèmes vient de leur faible volume de traitement. En effet, la réduction de la taille du système d'analyse (à l'échelle de quelques micromètres) entraîne une réduction des volumes à analyser. Alors que les systèmes actuellement utilisés en biologie moléculaire nécessitent des échantillons de l'ordre de la centaine de microlitres, seuls quelques centaines de nanolitres suffisent lors de l'utilisation d'un biomicrosystème. Des systèmes de réaction en chaîne par polymérase (PCR), nécessitant une centaine de microlitres (plaque 384 puits standard) dans le cas macroscopique, n'ont besoin que de 1 ou 2 μl dans leur version miniature (Shin *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006).

Moins de volume d'échantillons à traiter veut aussi dire moins de réactifs, souvent onéreux, à utiliser. Les temps de traitement sont aussi à la baisse. Alors qu'il fallait 2 à 3 h pour effectuer une trentaine

de cycles de PCR, [Cho et al. \(2006\)](#) montrent que leur microsystème ne met que 20 min pour réaliser 40 cycles d'amplification. La réduction de la taille des systèmes de traitement entraîne donc une nette diminution des coûts de fabrication et d'utilisation, qui se répercutera probablement un jour sur le coût des analyses médicales.

2.2.1.2. Parallélisation / Sérialisation des procédés

Cette diminution du temps d'analyse peut aussi être envisagée par la mise en parallèle ou/et en série des différentes fonctions nécessaires à la réalisation de celle-ci. En effet, l'encombrement nécessaire pour réaliser une seule fonction (chimique, physique ou biologique) est tellement réduit qu'il est possible d'en associer un grand nombre sur un même substrat. C'est le cas par exemple des puces à ADN (présentées dans la section suivante) dont le nombre de sites d'hybridation peut aujourd'hui atteindre plus d'un million sur une surface de quelques centimètres carrés ([Irizarry et al., 2003](#)).

La possibilité de paralléliser ou sérialiser des fonctions (voir figure 2.4), au même titre que les transistors à l'époque des circuits intégrés, permet l'augmentation des vitesses d'analyse ou de traitement dans le diagnostic de certaines maladies par exemple ([Gulliksen et Karlsen, 2007](#)). Dans le secteur de la pharmaceutique, on parle aussi de criblage à haut-débit pour le test de certains médicaments ([Weigl et al., 2003](#)), les aspects microfluidiques permettant plus facilement la réalisation de gradient de concentration et de tester la toxicité de médicaments à certaines concentrations sur des cellules ([Keenan et Folch, 2008](#); [Français et al., 2009b](#)). Il est aussi possible d'analyser la cytotoxicité d'un ensemble de composés sur différentes lignées cellulaires en même temps à l'aide d'une même biopuce ([Wang et al., 2007](#)).

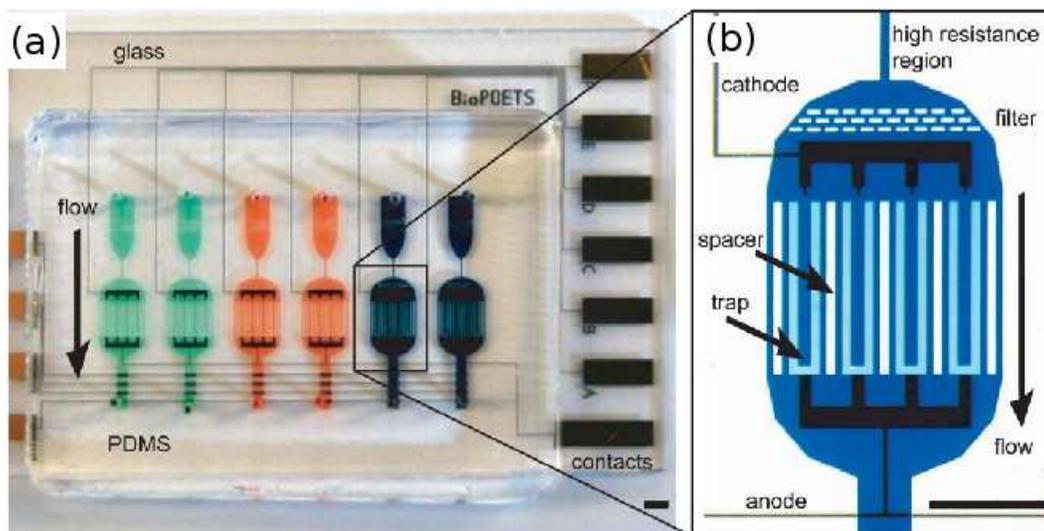


FIG. 2.4 : Exemple de parallélisation : biopuce pour la culture et la lyse cellulaires. (a) Une vue générale du microsystème avec 6 chambres de traitement différentes. (b) Vue détaillée d'une chambre contenant une région de capture des cellules (4 lignes séparées par chambre). Les électrodes pour la lyse cellulaire (électrique) sont des deux côtés de la région de capture. La barre d'échelle mesure 1,3 mm. ([Nevill et al., 2007](#)).

2.2.1.3. Diagnostics et traitements *in situ* chez les patients

La réduction des coûts d'analyse permet alors de développer des systèmes de diagnostics et d'analyses à usage unique, intégrant toute la chaîne de caractérisation et limitant ainsi tout risque de contamination d'un échantillon à l'autre. [Metref *et al.* \(2009\)](#) proposent ainsi un microsystème fluide permettant de caractériser l'écoulement sanguin par méthode optique où la partie "contaminée" est isolée du reste du circuit. Cette même équipe s'intéresse aussi au diagnostic de certaines maladies oculaires (glaucome essentiellement) par développement de micro-capteurs spécifiques et permettant le suivi sur 24 heures et de manière non-invasive de la pression intraoculaire ([Leonardi *et al.*, 2009](#)).

Ce dernier système, en contact direct avec l'œil du patient, est une première étape vers le développement de systèmes intégralement *in situ*. Ces systèmes miniatures, conçus ou/et pouvant facilement être emballés dans des matériaux biocompatibles, permettent d'entreprendre leur implémentation dans le corps humain et le développement d'outils de diagnostic et de traitement capables d'interagir avec certains organes de manière totalement autonome. La technologie de communication "sans fil", pouvant facilement être implantée sur le même substrat, offre la possibilité d'interroger à distance la biopuce et sans lien direct avec elle, afin de récolter les données acquises ([Ginggen *et al.*, 2008](#)). Elle permet même d'approvisionner en énergie ces micropuces, en se basant sur le principe de Helmholtz par exemple ([Win *et al.*, 2010](#)).

2.2.1.4. Travail sur cellule unique

Enfin, on peut ne pas vouloir diminuer les coûts d'analyse ou augmenter le rendement de certains traitements mais tenter d'analyser plus précisément certains phénomènes au niveau cellulaire ([Kobel *et al.*, 2010](#)). Pour cela, il est indispensable de développer des outils permettant de manipuler et observer ces micro-objets. Ce constat en devient d'autant plus vrai avec la rapide expansion des télécommunications et la mise au point de nouvelles techniques de détection et d'analyse basées sur les hautes fréquences. La méconnaissance de l'impact de ces signaux électriques sur la monde biologique pousse des groupes de recherche à développer de nouveaux outils dans ce but ([Senez *et al.*, 2006](#)).

Les microtechnologies peuvent alors permettre ce type d'approche, en proposant des techniques de développement à l'échelle des cellules (quelques micromètres à quelques centaines de micromètres de diamètre) et permettant d'inclure des fonctions à la fois électriques et fluidiques. Mais avant tout traitement ou analyse sur des cellules, une étape de piégeage est indispensable. Pour cela, plusieurs possibilités s'offrent à nous :

- le confinement par contact, essentiellement pour des cellules adhérentes, qui peut s'effectuer :
 - en utilisant des protéines spécifiques déposés sur le substrat et sur lesquelles les cellules vont venir s'accrocher ([Prime et Whitesides, 1993](#); [Le Pioufle *et al.*, 2000](#)) ;
 - par insolation des surfaces à des rayons ultraviolets, leur conférant ainsi certaines propriétés adhérentes ([Azioune *et al.*, 2009](#)) ;

- par dépôt chimique ou électrochimique (Kaji *et al.*, 2004) ;
- les micro-cavités, adaptées à la taille des cellules (voir figure 2.5) ;
- les pièges optiques (Jordan *et al.*, 2005) ;
- l'utilisation de champs magnétiques (Tanase *et al.*, 2005) ou électriques, par DEP (plus longuement décrite dans la suite de ce chapitre) ;
- l'adressage fluïdique, permettant à la fois le piégeage des cellules et l'apport de certains réactifs nécessaires à certaines études (Marcus *et al.*, 2006).

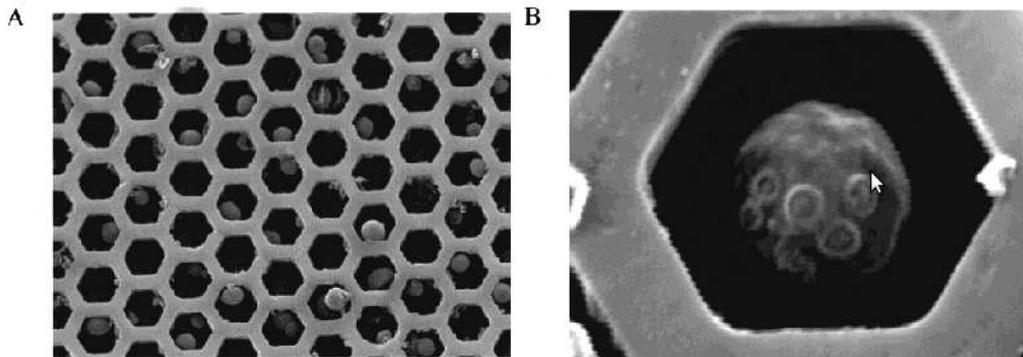


FIG. 2.5 : Exemple de travail sur cellule unique : imagerie optique sur un réseau de cellules. (A) Réseau de puits dans lesquelles sont piégées des levures et (B) un micro-puits de 6 µm de diamètre. (Biran *et Walt*, 2002).

2.2.2. De la puce à ADN jusqu'au laboratoire sur puce

Alors que le premier chromatographe apparaît en 1979 (Terry *et al.*, 1979), les premiers biomicrosystèmes attendront les années 1990 pour émerger avec la notion de laboratoire-sur-puce (ou lab-on-a-chip). En incluant à ces microsystèmes une partie fluïdique (voir section 2.1.4 sur la microfluidique), il est alors possible d'imaginer des systèmes capables d'intégrer différentes fonctions tant biologiques que chimiques sur une même puce micro- ou/et nano-structurée (Manz *et al.*, 1990a).

2.2.2.1. La puce à ADN

La première réelle application de ces biopuces est sans nulle doute la puce à ADN (Lee *et Hudson*, 2000). Une telle puce est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Le principe de fonctionnement repose sur l'hybridation de l'échantillon à évaluer sur une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif ou fluorescent (voir Fig. 2.6). Quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées "spots" sont déposés par diverses méthodes sur un support en nylon (Nguyen *et al.*, 1995), en verre (Schena *et al.*, 1995) ou en silicium (Lockhart *et al.*, 1996), chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radio-élément ou par une molécule fluorescente, permet alors de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience.

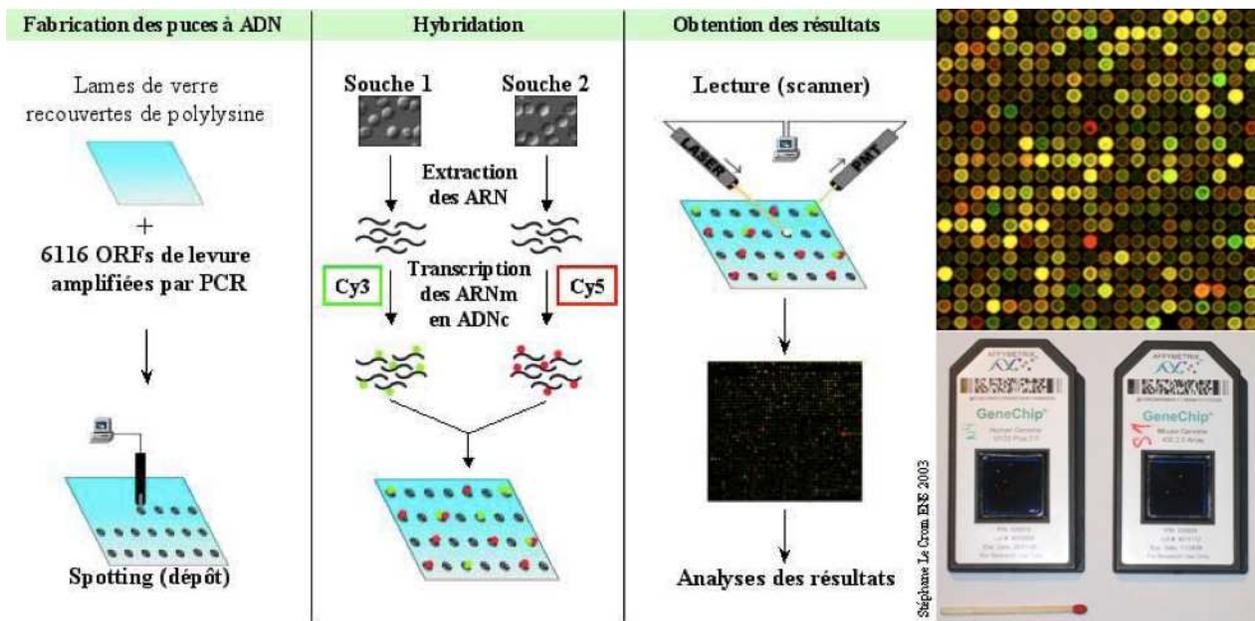


FIG. 2.6 : A gauche : le principe de fabrication des puces à ADN par dépôt sur verre, le principe de fonctionnement de ces puces et la lecture des résultats. En haut à droite : Le résultat d'un test ADN. En bas à droite : Des puces GeneChip® de la société Affymetrix.

La parallélisation, qui a permis d'augmenter de façon considérable le débit d'analyse (de quelques centaines de "spots" par centimètre carré (Nguyen *et al.*, 1995) jusqu'à plus de 250.000 (Lipshutz *et al.*, 1999; Irizarry *et al.*, 2003)), a rendu possible l'établissement des signatures moléculaires caractéristiques de certains types de tumeurs humaines : leucémies (Golub *et al.*, 1999), lymphomes (Alizadeh *et al.*, 2000; Hoefnagel *et al.*, 2005), mélanomes (Bittner *et al.*, 2000) ou cancers du sein (Bertucci *et al.*, 2000).

2.2.2.2. Les puces à protéines

L'intérêt suscité par les puces à ADN et les demandes croissantes en terme d'analyse médicale ont conduit les chercheurs à développer de nouveaux types de biopuces pour la détection cette fois-ci d'interactions entre différents types de molécules. Ces biopuces dites à protéines s'avèrent être un puissant outil pour la compréhension de certaines pathologies humaines, l'évaluation de la réponse immunitaire à des antigènes viraux ou bactériens ou encore le développement de nouvelles méthodes de diagnostic (Zhu *et al.*, 2001).

Il est possible avec cette technologie, basée sur le dépôt d'un grand nombre de protéines sur un même substrat (Lee *et al.*, 2002), de caractériser et comparer simultanément un grand nombre de cibles protéiques (Haab *et al.*, 2001). Des premières biopuces "anti-infectieuses" ont alors vu le jour, constituées à l'aide d'antigènes de certains virus tels que l'herpès (HSV1 et HSV2) afin de détecter de faibles doses d'anticorps (Mezzasoma *et al.*, 2002). Une autre maladie visée est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pour lequel les biopuces peuvent aider au criblage et au suivi de la réponse immunitaire de patients à certaines thérapies en utilisant un large nombre de sondes (Arnaud *et al.*, 2004).

Enfin d'autres études basées sur des puces à protéines ont pour objectif d'analyser le potentiel de certaines protéines transmembranaires à accepter ou non certaines molécules ou bien encore d'évaluer leur cinétique à transporter des ions. Ainsi des matrices de 96 micro-puits permettant la création de bicouches lipidiques ont été réalisées pour suivre l'évolution en parallèle du courant qui traverse toutes ces membranes après ajout d'une protéine transmembranaire particulière en leur centre (Le Pioufle *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2009).

2.2.2.3. Les puces à cellules

Une autre méthode pour analyser et comprendre les phénomènes liés à certains traitements réalisés sur des cellules est de visualiser directement le comportement de celles-ci en utilisant des systèmes permettant la micromanipulation. Les premières puces dites à cellules sont probablement celles présentées par Wahizu (1989) pour de la fusion cellulaire en isolant deux cellules puis en les exposant à des champs électriques perméabilisants (Masuda *et al.*, 1989). Depuis cette invention, plusieurs types de biopuces à cellules sont apparues. On peut citer pour revue : Le Pioufle *et al.* (2004).

En restant dans une optique d'intégration et de parallélisation, comme le suggère l'utilisation de microsystèmes, on peut commencer par citer les biopuces cellulaires parallèles qui, à l'instar des puces à ADN qui mettent en réseau un grand nombre d'oligonucléotides, visent à mettre en réseau des cellules dans le but de les analyser ou les traiter simultanément. Le Pioufle *et al.* (1999) proposent ainsi une biopuce permettant la culture cellulaire à grande échelle dans des systèmes interconnectés fluidiquement et électriquement. Les applications visées sont alors le transfert de gènes, le tri cellulaire ou bien encore le criblage pharmaceutique.

Au lieu de paralléliser le traitement, on peut aussi le sérialiser et permettre ainsi un traitement continu lors du passage d'un flux cellulaire (Huang et Rubinsky, 2003), à l'image des cytomètres en flux (Gawad *et al.*, 2001). Ces biopuces séries intègrent alors des fonctions de traitement ou d'analyse mais aussi de tri afin d'aiguiller les cellules vers la sortie appropriée du système (Braschler *et al.*, 2008).

Enfin, le dernier type de puces à cellules visent des applications plus théoriques qu'industrielles, puisqu'elles sont faites pour la manipulation et l'analyse sur cellule unique. L'isolation de cellules dans des microstructures spécifiques permet alors de pouvoir les traiter puis les analyser de manière individuelle, par exemple par électroperméabilisation en appliquant un champ électrique comme décrit dans le précédent chapitre et en analysant le courant transitant de part et d'autre de la cellule, bloquée sur une paroi isolante séparant les deux électrodes (Huang et Rubinsky, 1999).

2.2.2.4. Des systèmes de plus en plus complets

La réduction en taille des différentes fonctions de base en biologie et en chimie a rendu possible la mise en série et en parallèle de véritables chaînes de traitement, incluant la culture de cellules (Balagadde *et al.*, 2005), le traitement des cellules par applications de champs électriques par exemple (Wu, 2008), le tri des cellules par DEP (Huang *et al.*, 2002) ou par piège optique (Wang *et al.*, 2005), la lyse des

cellules par application d'un champ électrique continu ou pulsé (Lee et Tai, 1999) ou encore l'analyse des résultats par détection biomoléculaire par exemple (Burg et Manalis, 2003).

Ces nouveaux biomicrosystèmes ont alors permis le développement de véritables micro-laboratoires (ou "lab-on-a-chip", LOC) intégrant toutes les fonctions nécessaires à la réalisation d'une application biologique particulière (van den Berg et Bergveld, 2006). C'est le cas par exemple de Hong *et al.* (2004) qui proposent un système complet de purification d'acides nucléiques pouvant traiter de très faibles volumes (quelques nanolitres) sans aucun pré- ou post-traitement (voir Fig. 2.7). Ou bien encore Fan *et al.* (2009), qui par un procédé de PCR digitale dans un microdispositif, montrent qu'il est possible de détecter une aneuploïdie fœtale (maladie chromosomique détectable chez le fœtus et responsable en particulier de la trisomie 21) par analyse de cellules du liquide amniotique ou d'un morceau de placenta en moins de 6 h de temps.

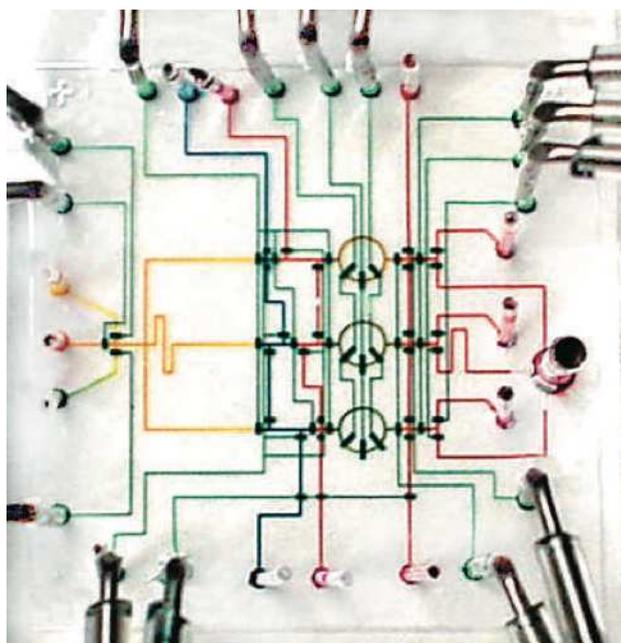


FIG. 2.7 : LOC permettant la purification d'acides nucléiques issus de cellules animales ou de bactéries (Hong *et al.*, 2004). Cette puce inclut des fonctions de tri cellulaire, de lyse cellulaire, de purification d'ADN ou d'ARN et peut traiter de très faibles volumes (quelques nanolitres).

Comme l'électronique et l'informatique il y a quelques décennies, la miniaturisation des fonctions de base révolutionne la biologie cellulaire et le monde médical. Alors qu'il y a encore quelques années, un laboratoire d'analyses médicales occupait une ou plusieurs pièces, il est désormais possible de réaliser l'ensemble de la chaîne d'analyse biologique de certains types de pathologies sur un même substrat de quelques centimètres carrés (El-Ali *et al.*, 2006). Et le corps humain devient alors une véritable source d'inspiration de nouveaux concepts basés sur l'utilisation de microdispositifs, que ce soit à caractère médical ou non (Dittmar *et al.*, 2008).

2.3. Champs électriques et biomicrosystèmes

Une grande partie des biomicrosystèmes, introduits dans la section précédente, intègrent des fonctions électriques : pour l'analyse ou le traitement. Nous allons voir dans cette section quelques unes des applications de ces champs électriques pour déplacer, trier ou bien encore perméabiliser les cellules. Le principe et les applications liés à la DEP seront plus détaillés dans cette section que la micro-électroporation, car une étude sur la fusion cellulaire et la capture de cellules par diélectrophorèse sera abordée dans le chapitre 8.

2.3.1. Diélectrophorèse

Un signal alternatif, la plupart du temps sinusoïdal, permet de polariser et ainsi mettre en mouvement des cellules via l'induction d'une force diélectrophorétique (DEP) (Pohl, 1951; Archer *et al.*, 1999). Cet effet permet notamment de déplacer ou placer des cellules à divers endroits dans le but de les trier (Frénéa *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010), de les positionner afin d'avoir une reproductibilité meilleure de certains traitements (Archer *et al.*, 1999; Sankaran *et al.*, 2008) ou bien encore des les analyser afin de les caractériser (Hoettges, 2010).

2.3.1.1. Description du phénomène

Ce phénomène physique est basé sur deux aspects indispensables à la création d'une force diélectrophorétique : d'une part l'utilisation d'un champ alternatif et d'autre part la nécessité d'être en présence d'un gradient de champ. Le champ électrique appliqué est généralement sinusoïdal pour se limiter à la composante fondamentale du signal et éviter tout échauffement superflu de la solution contenant les cellules mais aussi pour pouvoir contrôler au mieux la fréquence émise.

En effet, la force de DEP, selon la fréquence du signal électrique appliqué sur les cellules, peut les entraîner vers les maxima de champs électriques (DEP positive) ou les minima de champs électriques (DEP négative). Cette force est causée par l'interaction entre le moment dipolaire \vec{m} d'une particule polarisable (telle qu'une cellule) et un champ non-uniforme \vec{E} dans laquelle elle se trouve. Cette force s'écrit (Jones, 1995) :

$$\vec{F} = \vec{m} \cdot \nabla \vec{E} \quad (2.1)$$

où $\nabla \vec{E}$ est le gradient du champ électrique. Dans le cas d'une cellule de rayon r immergée dans une solution de permittivité ϵ_m sous l'influence d'un champ \vec{E} , un calcul approché du moment dipolaire donne la relation suivante :

$$\vec{m} = 4.\pi.\epsilon_r.K(\epsilon_p^*, \epsilon_m^*).r^3.\vec{E} \quad \text{où} \quad K(\epsilon_p^*, \epsilon_m^*) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2.\epsilon_m^*} \quad (2.2)$$

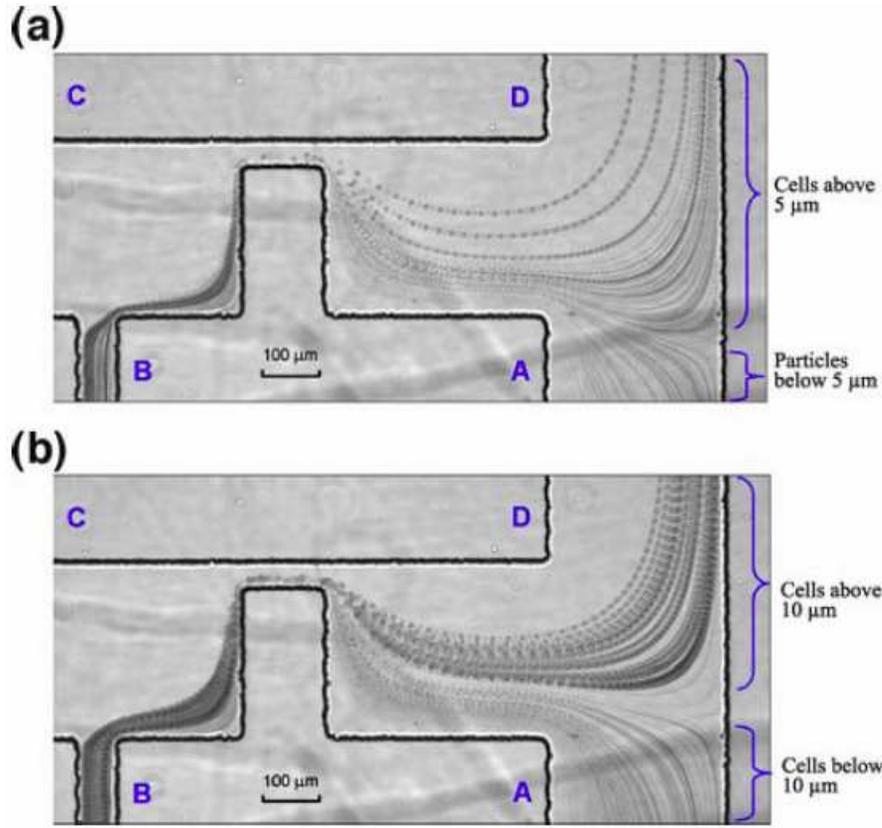


FIG. 2.8 : Séparation de globules blancs dans le sang avec un seuil de $5 \mu\text{m}$ (a) et de $10 \mu\text{m}$. Ce seuil est contrôlé par l'application de tensions différentes aux points A, B, C et D. (Kang et al., 2008).

$K(\varepsilon_p^*, \varepsilon_m^*)$ est appelé *facteur de Clausius-Mossotti*, faisant intervenir les permittivités complexes respectives de la particule et du milieu. De façon générale, l'impédance complexe d'un milieu est donnée par $\varepsilon^* = \varepsilon - j.\sigma/\omega$, où ε est la permittivité du milieu, σ sa conductivité et ω la pulsation. Ce facteur est donc dépendant non seulement des caractéristiques électriques de la particule (ou des différents éléments constituant une cellule) et du milieu dans lequel elle se trouve, mais aussi de la fréquence du champ électrique appliqué (voir Fig. 2.9). La force de DEP alors appliquée sur une cellule vaut :

$$\vec{F}_{Dep} = 2.\pi.r^3.\varepsilon_m.\Re(K(\omega)).\nabla|E^2| \quad (2.3)$$

où $\Re(x)$ représente la partie réelle du nombre complexe x .

Selon le type de cellules utilisées (en particulier leurs caractéristiques géométriques : leur rayon, l'épaisseur de leur membrane ; et électriques : permittivités et conductivités de la membrane et du cytoplasme), du milieu dans lequel elles sont exposées, de l'amplitude et de la fréquence du champ électrique auquel elles sont soumises, la force de DEP associée peut différer et peut être positive ou négative. La figure 2.9 montre l'effet que peut avoir la conductivité du milieu dans lequel se trouvent les cellules sur le facteur de Clausius-Mossotti, ce dernier pouvant conserver le même signe quelque soit la fréquence (Fig.

2.9.a), ou bien changer de signe (Fig. 2.9.b) permettant ainsi de contrôler le déplacement des cellules vers des zones de champ faible (cas négatif) ou fort (cas positif).

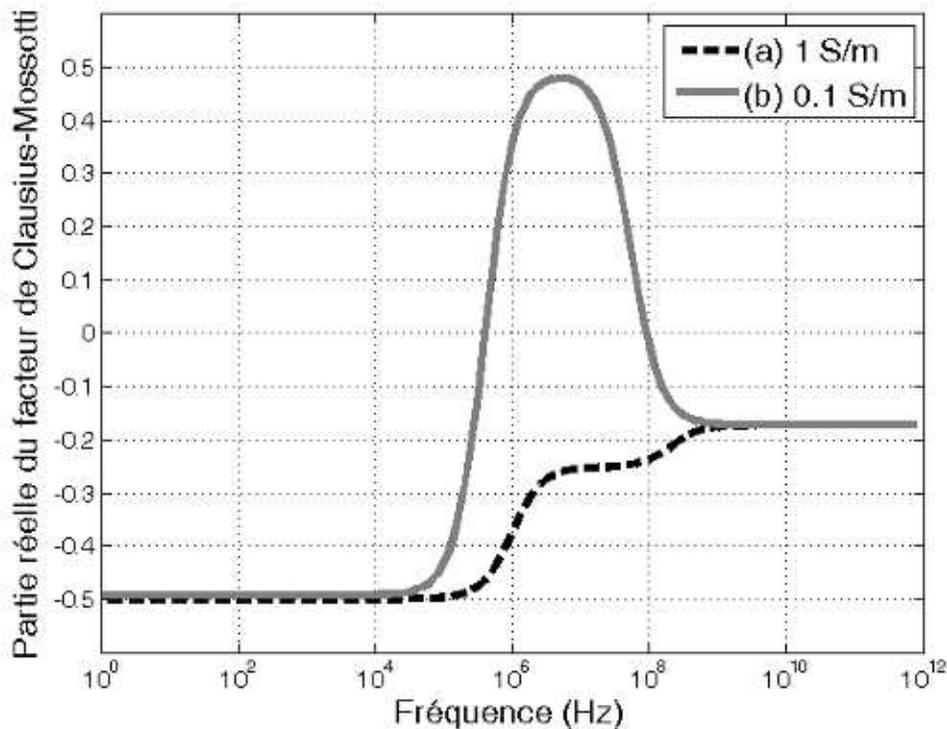


FIG. 2.9 : Partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti dans le cas d'un milieu à 1 S/m (a) et $0,1 \text{ S/m}$ (b) en fonction de la fréquence. Les paramètres utilisés sont : $\varepsilon_{\text{milieu}} = 80$, $\varepsilon_{\text{membrane}} = 6$, $\sigma_{\text{membrane}} = 10^{-6} \text{ S/m}$, $\varepsilon_{\text{cytoplasme}} = 45$, $\sigma_{\text{cytoplasme}} = 10^{-1} \text{ S/m}$.

2.3.1.2. Mise en œuvre pour le déplacement, le positionnement et l'analyse

Ce phénomène physique a été découvert et étudié pour la première fois par Muth en 1927, qui a montré que des particules émulsées, exposées à des hautes fréquences, formaient une sorte de collier de perles (Muth, 1927). Ce phénomène a aussi été reporté par Liebesny (1939) mais cette fois-ci sur des érythrocytes.

Ces premières expériences auront permis de découvrir la DEP, mais son nom ne lui sera donné que deux décennies plus tard par Pohl (1951). D'autres études par la suite montreront des phénomènes similaires tels que des mouvements préférentiels, de rapides rotations ou encore des alignements fréquence-dépendants (Teixeira-Pinto *et al.*, 1960). Les premières explications théoriques arriveront quelques années après par Saito *et al.* (1966). Cette technique trouvera ensuite rapidement des applications, en particulier dans le tri et le positionnement de cellules par utilisation de combinaisons particulières de fréquence et de conductivité de solution (Pohl et Hawk, 1966; Crane et Pohl, 1968).

2.3.1.3. Déplacement et tri

Une des principales applications de la DEP en microbiologie est le tri cellulaire. Les biomicrosystèmes permettent de traiter un flux continu de cellules et d'appliquer des faibles signaux alternatifs. En fonction de la fréquence de ces signaux, on pourra alors séparer différents types de cellules ou objets polarisables. On peut, par exemple, citer les travaux de Frénéa *et al.* qui ont testé différentes structures pour la capture de cellules par diélectrophorèse positive ou négative et ont comparé leurs résultats expérimentaux sur cellules avec une analyse analytique menée par modélisation FEM (Frénéa *et al.*, 2003; Frénéa-Robin *et al.*, 2007).

La forte dépendance aux paramètres géométriques et électriques des différents éléments à traiter rend cette méthode très sélective et permet ainsi une séparation efficace de cellules ou de particules en fonction de la fréquence du signal appliqué. La différence en terme électrique entre une cellule infectée ou non par la babesia (responsable de la babésiose, maladie rare parente à la malaria souvent provoquée par la piqûre de tiques) permet par exemple de les séparer par application d'un champ électrique alternatif dans un microcanal, comme le montre Nascimento *et al.* (2008). Le même type de phénomène se produit entre des cellules viables ou non et leur tri peut alors se faire par application d'une succession de signaux à diverses fréquences (Braschler *et al.*, 2008).

Un second exemple de tri par force diélectrophorétique a été mené par Kang *et al.* (2008) par application non pas d'un signal alternatif mais d'une combinaison de tensions continues à diverses positions. Cette technique permet par exemple de trier les globules blancs dans le sang en fonction de leur taille (voir figure 2.8), le seuil de détection pouvant être ajusté en modifiant les tensions continues appliquées, ou bien encore de trier des cellules cancéreuses, toujours en fonction de leur taille.

2.3.1.4. Positionnement

La DEP est aussi largement utilisée dans les biomicrosystèmes pour positionner les objets biologiques à des endroits précis : l'utilisation d'électrodes interdigitées (Frénéa *et al.*, 2003), d'électrodes en trois dimensions (Voldman, 2006; Sankaran *et al.*, 2008) ou bien encore par le biais de structures isolantes (Masuda *et al.*, 1989; Francais *et al.*, 2009a). Halfmann *et al.* (1982) ont utilisé ce principe de positionnement par DEP en appliquant un signal alternatif de 1 kV/cm à 2 MHz avant d'appliquer des impulsions continues de 40 ms entre 7 et 8 kV/cm dans le but de pouvoir fusionner ensuite ces cellules. C'est sur ce dernier principe que seront développées les biopuces présentées dans le chapitre 8. La figure 2.10 représente quelques applications du positionnement par DEP.

2.3.2. Micro-électroporation

La dernière application présentée ici, mêlant biomicrosystèmes et champs électriques, est en lien avec les études présentées dans le chapitre précédent concernant l'électropéabilisation de cellules. Certains groupes ont voulu étudier plus précisément les effets de ces champs électriques pulsés sur une

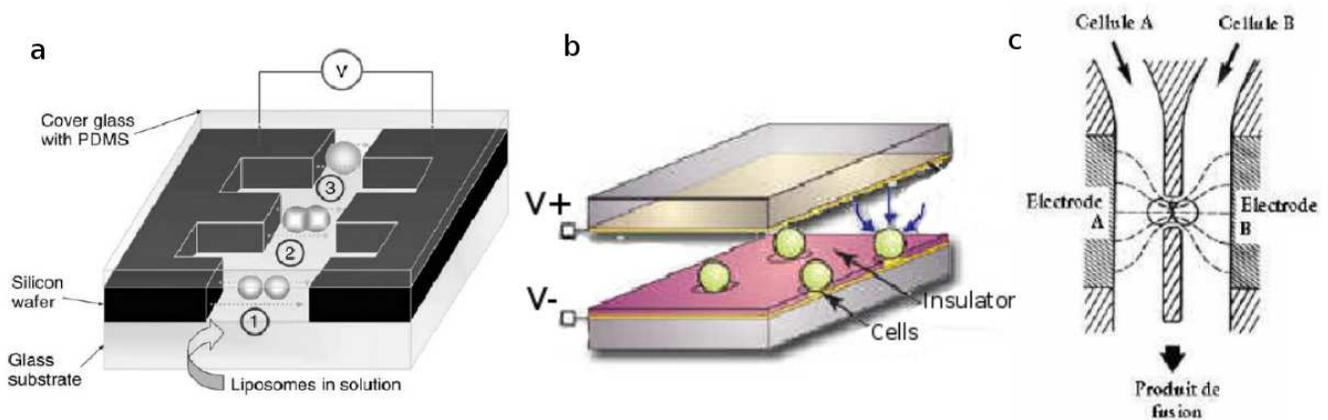


FIG. 2.10 : Exemples de positionnement par DEP : (a) électrodes interdigitées (Tresset et Takeuchi, 2004), (b) électrodes 3D (Voldman, 2006) et (c) structure isolante (Masuda et al., 1989).

cellule unique ou de paralléliser le procédé afin d'en augmenter l'efficacité. La micro-électroporation semblerait avoir de multiples avantages par rapport à sa version macroscopique (Le Pioufle et al., 1999, 2000; Lee et al., 2009) :

- la faible taille des chambres d'exposition, limitant ainsi la quantité de réactifs à utiliser ;
- une meilleure dissipation de la chaleur, due au volume important des électrodes thermiquement conductrices par rapport au milieu d'exposition ;
- une diminution des effets électrochimiques par utilisation d'électrodes en or ou en platine, par rapport à des électrodes en aluminium utilisées dans des cuvettes commerciales ;
- une visualisation des cellules sous microscope pendant l'électroporation ;
- un coût de production et de traitement diminué, grâce à l'utilisation de la microfluidique.

L'une des premières études réalisées dans cette optique a montré que l'exposition de cellules à des champs électriques en microsystèmes était faisable et permettait d'obtenir des informations complémentaires à la même étude sur une population cellulaire (Huang et Rubinsky, 1999). Cette étude reposait sur un système de capture de cellules basé sur une différence de pression entre deux canaux, séparés par un isolant percé à certains endroits. Les cellules étaient alors piégées dans ces trous et le champ électrique était alors appliqué. L'analyse se faisait d'une part par visualisation sous microscope et l'utilisation de marqueur de perméabilisation et d'autre part par mesure du courant injecté (principe identique au patch-clamp).

Plusieurs équipes se sont alors penchées sur la réalisation de systèmes plus complexes et permettant le traitement et l'analyse d'un plus grand nombre de cellules : soit en utilisant une matrice de capture de cellules (He et al., 2006) présentée en figure 2.11 soit en se basant sur l'application continue d'impulsions lors du passage d'un flux de cellules dans un microcanal (Denoual et al., 2006; Cho et al., 2007).

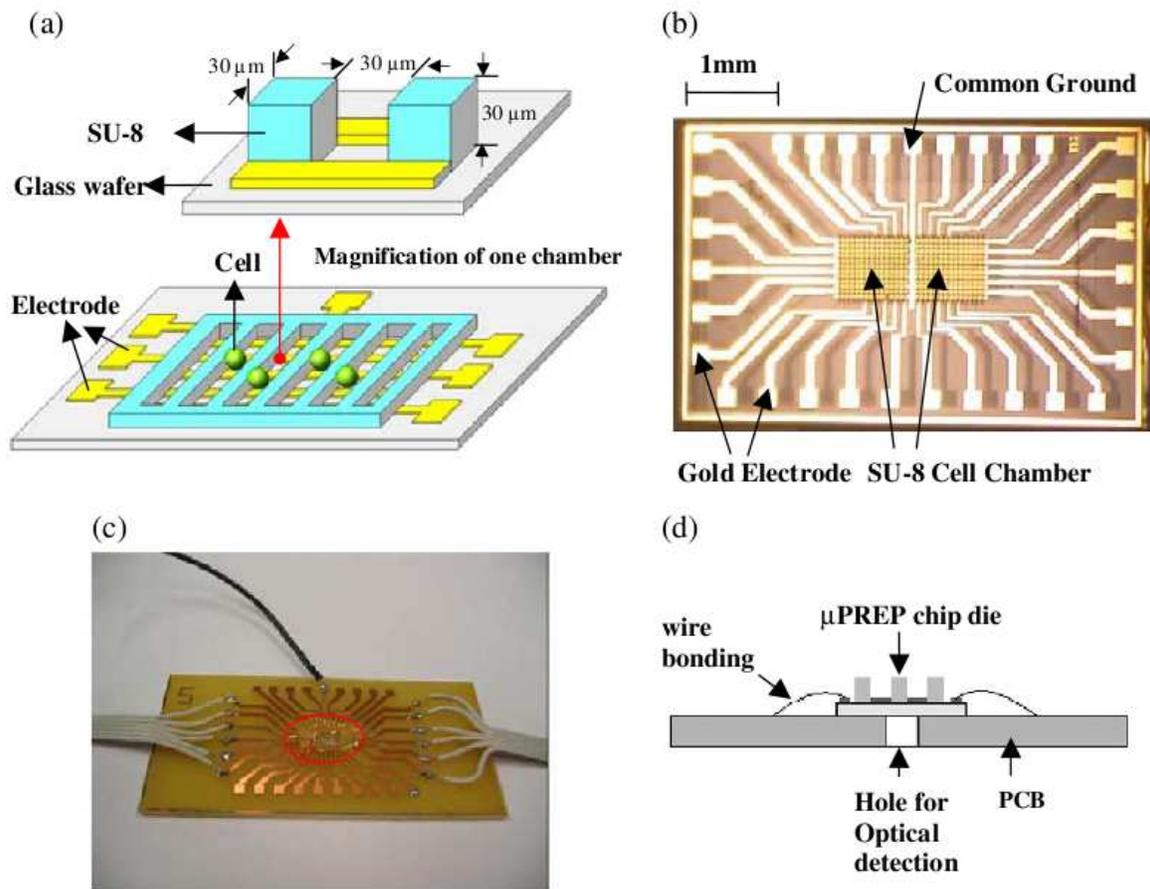


FIG. 2.11 : *Microsystème intégré pour l'électropéabilisation massive de cellules μ PREP. (a) Schéma 3D de la biopuce. (b) Image du système. Les électrodes verticales sont utilisées pour l'application des champs électriques perméabilisants alors que les électrodes horizontales sont utilisées pour relever le courant durant l'électropéabilisation. (c) Système final empaqueté. (d) Schéma du système final empaqueté pour la détection optique. (He et al., 2006).*

Cette même équipe a ensuite utilisé son microsystème pour déterminer les meilleurs paramètres électriques (intensité du champ électrique et durée des impulsions) pour transférer diverses molécules (de tailles différentes) dans des cellules cancéreuses HeLa (He et al., 2007). Ils ont pu ainsi déterminer les différents seuils de perméabilisation et de lyse cellulaire et surtout la taille critique maximale des macromolécules qui pouvaient être internalisées de cette façon (40 KDa), tout en diminuant les temps d'étude grâce au criblage rapide permis par les microtechnologies.

D'autres tests en microsystème ont été réalisés afin de limiter les réactions chimiques qui ont lieu aux interfaces électrodes/milieu lors de l'application d'impulsions continues (électrolyse en particulier). Ainsi, Ziv et al. (2009) ont montré qu'il était possible d'utiliser des champs carrés alternatifs pour obtenir le même résultat que précédemment, sans toutefois se soucier de l'apport de l'échauffement, par effet Joule, dans l'augmentation de fluorescence des cellules après l'électrotransfert de plasmides GFP.

Enfin, sur le même principe que l'étude sur le transfert de biomolécules, [Choi *et al.* \(2009\)](#) ont proposé un microsysteme pour l'analyse des effets de la bléomycine sur les cellules après électroperméabilisation. Les expériences sur des cellules en présence de bléomycine à diverses intensités de champ électrique dans leur systeme coïncident alors parfaitement aux modèles théoriques (simulation).

2.4. Conclusion

Ces deux dernières décennies auront vu l'apparition et le développement massif de microsystemes capables d'interagir avec le monde du vivant. De la culture cellulaire (Balagadde *et al.*, 2005) à l'analyse de ces objets biologiques par diverses méthodes (Burg et Manalis, 2003; van den Berg et Bergveld, 2006), en passant par leur tri (Yang *et al.*, 2010) ou en leur appliquant des traitements particuliers (Lee et Tai, 1999; Hong *et al.*, 2004), ces nouveaux micro-laboratoires ont permis d'augmenter considérablement l'efficacité et les rendements de certaines analyses médicales, par intégration d'un grand nombre de fonction sur le même substrat. Le meilleur exemple reste pour le moment la puce à ADN (Lipshutz *et al.*, 1999).

Mais en dehors de cette course à l'intégration, qui rappelle la montée en puissance des circuits intégrés dans les années 80 et 90, il ne faut pas négliger l'avantage que peuvent apporter les microtechnologies dans l'analyse de ces objets avant tout de taille micrométrique. Ces nouveaux micro-outils, adaptés aux cellules, se prêtent parfaitement au jeu de l'analyse biologique et permettent d'étudier, parallèlement aux techniques classiques de biologie cellulaire et moléculaire, des phénomènes déjà connus ou nouveaux en apportant une nouvelle dimension à leur analyse (He *et al.*, 2007; Linderholm *et al.*, 2008).

PARTIE II

THÉORIE, MODÈLES ET CONCEPTION

ÉTUDE DE LA FAISABILITÉ D'EXPOSER DES CELLULES À L'AIDE D'ÉLECTRODES ISOLÉES

Nous avons vu dans la section 1.1.3 que l'interface entre l'électrode et le milieu dans lequel sont placées les cellules est un lieu perpétuel d'échange d'espèces chargées (électrons et ions), incluant la production d'espèces pouvant être nocives pour les cellules ou bien encore un relargage d'ions métalliques dans la solution (Friedrich *et al.*, 1998; Kotnik *et al.*, 2001a). En plus de pouvoir perturber le cycle cellulaire en interagissant avec certaines fonctions vitales des cellules, le relargage d'ions métalliques semble aussi entraîner une augmentation de la rugosité des électrodes et ainsi qu'une perturbation locale du champ électrique (Saulis *et al.*, 2007).

L'application d'impulsions électriques toujours plus intenses sur des solutions biologiques accentuent d'autant plus ce phénomène. Aussi, dans le cas d'impulsions ultra-courtes, nous allons montrer théoriquement que l'utilisation d'un filtre électrique et chimique au niveau des électrodes est faisable et qu'en fonction de certains paramètres, il sera possible de moduler l'amplitude ainsi que la forme des signaux captés par les cellules.

Des résultats expérimentaux venant valider la méthode d'exposition proposée seront présentés dans la partie IV. Cette méthode d'exposition ainsi que la réalisation d'électrodes liquides, présentés dans le chapitre 5.3.1, ont été protégées par deux brevets :

- **WO/2010/010085** - Int. Number : PCT/EP2009/059354 - Process and device for applying electric fields into conductive material. *Villemejeane J., Le Pioufle B., Mir L.M.* - 21-07-2009
- **WO/2010/020674** - Int. Number : PCT/EP2009/060787 - Method for producing insulated electrodes for applying electric fields into conductive material. *Villemejeane J., Le Pioufle B., Mir L.M., Français O., Lefèvre J.P.* - 20-08-2009

3.1. L'isolation : un filtre électrique et chimique

Il existe de 4 sortes d'isolant : électrique, thermique, phonique ou mécanique. Dans tous les cas, ils ont le même rôle : limiter les échanges d'énergie entre deux systèmes ou deux milieux. Dans le cas d'un isolant thermique, le but est de s'opposer aux transferts de chaleur et ainsi éviter les fuites de chaleurs. En électricité, on parle d'un matériau isolant ou diélectrique lorsque celui-ci est capable d'interdire le passage de tout courant électrique entre deux conducteurs.

Si l'on modélise simplement le passage d'un courant d'un milieu conducteur R_1 à un autre milieu conducteur R_2 à travers un isolant, que l'on assimilera à une capacité C , on peut alors calculer les tensions aux bornes de ces différents éléments $\{V_{R1}, V_{R2}, V_C\}$ en fonction de la tension V appliquée à l'ensemble et de la pulsation ω (schéma en figure 3.1). On obtient :

$$\frac{V_{R1}}{V} = \frac{J \cdot R_1 \cdot C \cdot \omega}{1 + J \cdot (R_1 + R_2) \cdot C \cdot \omega} \quad \frac{V_{R2}}{V} = \frac{J \cdot R_2 \cdot C \cdot \omega}{1 + J \cdot (R_1 + R_2) \cdot C \cdot \omega} \quad (3.1)$$

$$\frac{V_C}{V} = \frac{1}{1 + J \cdot (R_1 + R_2) \cdot C \cdot \omega} \quad (3.2)$$

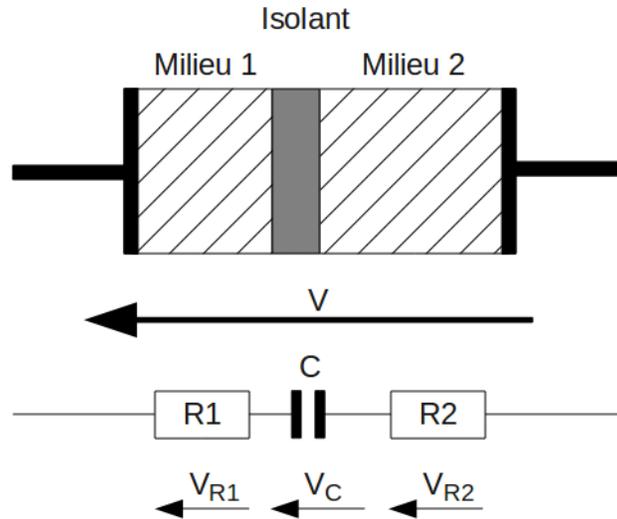


FIG. 3.1 : Modèle électrique de deux milieux conducteurs séparés par un isolant

En basse fréquence (ou quand ω tend vers 0), les tensions dans les milieux conducteurs V_{R1} et V_{R2} (équations 3.1) tendent vers 0, alors que la tension dans l'isolant V_C (équation 3.2) tend vers V . Dans ce cas, pas de grande surprise, l'isolant joue son rôle, à savoir ne pas permettre le passage du courant d'un conducteur à l'autre.

Si maintenant, on se place à haute fréquence (ou si l'on fait tendre ω vers l'infini), la tension dans l'isolant (équation 3.2) s'écroule jusqu'à s'annuler, alors que les deux milieux conducteurs se partagent

la tension initialement appliquée V . Il y a alors création d'un courant à haute fréquence permettant ainsi un échange d'énergie entre deux milieux conducteurs.

En s'appuyant sur ce phénomène, nous avons voulu étudier la faisabilité d'appliquer des impulsions ultra-courtes (signifiant aussi un très large spectre fréquentiel, voir section 4.1.3) sur un milieu conducteur à travers un isolant qui recouvrirait les électrodes. Cette nouvelle méthode d'exposition permettrait d'une part de restreindre le passage du courant aux hautes fréquences seulement, limitant ainsi l'effet Joule, et d'autre part de supprimer l'interface électrode/milieu, siège de réactions électrochimiques et de relargage d'espèces chimiques et d'ions métalliques pouvant être toxiques pour le monde vivant (voir aussi section 1.1.3).

3.2. Etude théorique de la faisabilité

Les propriétés électriques de la matière ne restent pas constantes en toute circonstance. La conductivité d'un milieu par exemple peut évoluer au cours du temps ou en fonction de la température. Il a aussi été montré que les propriétés diélectriques des cellules pouvaient évoluer en fonction de la fréquence ou de la durée de certains évènements extérieurs, tels que l'exposition à des champs électriques ultra-courts (Garner *et al.*, 2007). En est-il de même pour tout diélectrique ?

Le milieu biologique, lorsqu'il est soumis à un champ électrique par l'intermédiaire de deux électrodes, peut-être modélisé par une résistance R_{bio} et une capacité C_{bio} (voir aussi la sous-section 1.1.3.4). Les isolants qui entourent le milieu et protègent celui-ci des électrodes sont modélisés par deux capacités $C_{isolant}$.

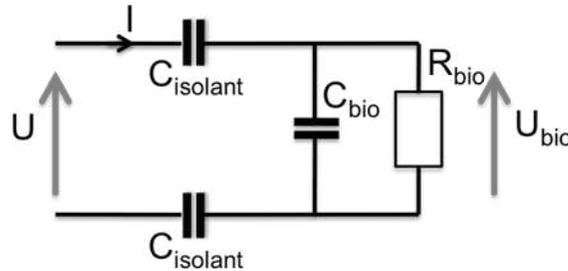


Fig. 3.2 : Modèle électrique d'un milieu biologique soumis à une impulsion électrique à travers des isolants

Dans le cas d'une cuvette dont les deux électrodes sont recouvertes d'un isolant, l'impédance vue par le générateur avec ce modèle peut se calculer de la même façon que dans le cas précédent et vaut $Z_{cuvette}$:

$$Z_{cuvette} = \frac{R_{bio}}{1 + j \cdot R_{bio} \cdot C_{bio} \cdot \omega} + \frac{2}{j \cdot C_{isolant} \cdot \omega} \quad (3.3)$$

où R_{bio} et C_{bio} correspondent à la résistance et à la capacité du milieu biologique et $C_{isolant}$ à la capacité de la couche isolante rajoutée sur les électrodes.

En prenant pour modèle une cuvette d'électroporation ayant un espace inter-électrodes de 1 mm remplie d'un milieu de culture de permittivité relative de 80 et de conductivité de 1 S/m, on peut calculer les différents éléments du milieu : $R_{bio} = 10 \Omega$ et $C_{bio} = 70 pF$.

On peut alors comparer la différence entre une couche d'isolant de 1 μm et de 5 μm (ce qui peut facilement être fait par dépôt de parylène et de façon uniforme sur l'ensemble des électrodes - voir section 5.3.2). On obtient alors des valeurs respectivement pour $C_{isolant}$ de 2,65 nF et 529 pF. La figure 3.3 montre le résultat d'une simulation avec ces différents paramètres en utilisant le modèle présenté en figure 3.2. Les simulations électriques sont réalisées à l'aide du logiciel MacSpice 3f5 version 2.10.23. La courbe notée *Impulsion* représente la tension appliquée U et les courbes notées respectivement *Milieu*

I_{um} et $Milieu\ 5um$ représentent les tensions U_{bio} obtenues à l'intérieur du milieu pour des épaisseurs d'isolant (type parylène - permittivité de 2,8) respectivement de $1\ \mu m$ et $5\ \mu m$.

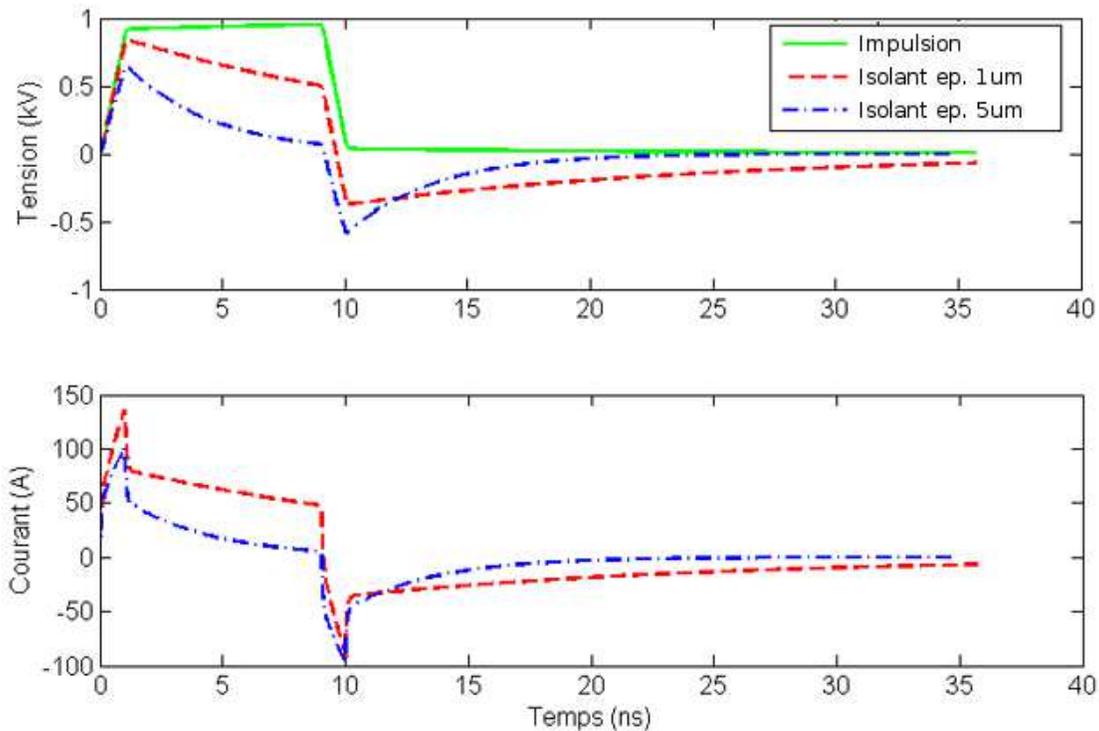


FIG. 3.3 : Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la forme de l'impulsion dans le milieu par simulation sous MacSpice. Des épaisseurs de $1\ \mu m$ et $5\ \mu m$ d'isolant recouvrant les électrodes d'une cuvette commerciale d'électroporation de $1\ mm$ de gap ont été comparées. Les paramètres du milieu utilisés sont ceux calculés dans le paragraphe précédent : $R_{bio} = 10\ \Omega$ et $C_{bio} = 70\ pF$.

Dans les deux cas, on peut noter qu'il existe bien une tension appliquée sur le milieu biologique mais qui diffère de l'impulsion initiale, ce à quoi on pouvait s'attendre étant donné l'ajout d'un isolant entre les électrodes et le milieu biologique. La figure 3.3 montre aussi une différence en fonction de l'épaisseur de l'isolant. La capacité $C_{isolant}$ dans le cas de $1\ \mu m$ est plus importante que dans le cas d'une épaisseur de $5\ \mu m$, ce qui implique que les constantes de temps $R \cdot C_{isolant}$ correspondantes varient de la même façon, expliquant ainsi que les temps de descente dans ces deux cas ne soient pas identiques et que la constante de temps correspondant à une épaisseur de $1\ \mu m$ soit plus longue que celle correspondant à une épaisseur de $5\ \mu m$.

Si l'on s'intéresse maintenant à l'impédance associée à ces deux cas (voir équation 3.3), on obtient le résultat de la figure 3.4, à laquelle il a été rajouté l'impédance dans le cas non isolé qui sert de référence (dans le cas de petits signaux, voir section 1.1.3.4).

Des simulations par modélisation FEM ont aussi permis de montrer qu'une tension transitoire apparaissait à la fois dans le milieu et dans l'isolant lors de l'application d'une impulsion de quelques nanosecondes par cette méthode. On peut alors s'intéresser à l'influence du matériau utilisé ainsi que de

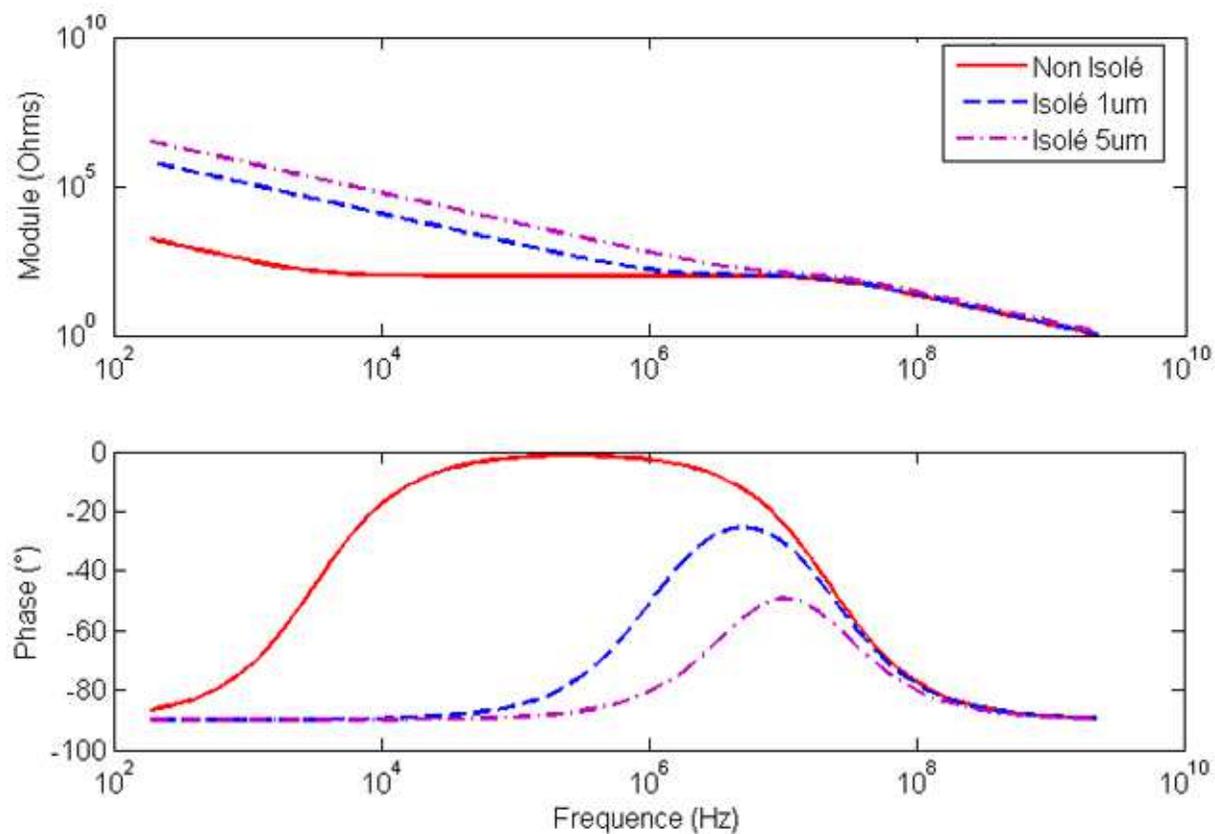


FIG. 3.4 : Impédance d'une cuvette d'électroperméabilisation isolée en fonction de l'épaisseur de l'isolant : $1 \mu\text{m}$ et $5 \mu\text{m}$, et dans le cas d'une cuvette non isolée, prenant en compte la double couche de Nernst en petits signaux.

l'épaisseur de l'isolant utilisé sur ces différentes tensions.

3.3. Influence du matériau et de l'épaisseur de l'isolant

Tout matériau diélectrique peut être caractérisé par deux paramètres distincts : sa permittivité, qui décrit sa réponse à un champ électrique, et la tension dite de claquage (ou disruptive), qui limite son utilisation dans certains cas.

Concernant la permittivité, elle est relative à celle du vide. Lorsque l'on met en contact deux milieux distincts et ayant des permittivités différentes, celui qui a la plus importante sera le moins soumis au champ électrique appliqué sur l'ensemble. En effet, un diélectrique est souvent un bon isolant électrique, à basse fréquence, et permet de bien retenir la tension à laquelle il est soumis, évitant ainsi les échanges d'énergie entre des milieux conducteurs par exemple. Il a alors une permittivité relative proche de celle de l'air (ϵ_r proche de 1).

En effet, si l'on considère deux milieux de permittivité respective ϵ_1 et ϵ_2 et d'épaisseur d_1 et d_2 soumis à une tension U (voir schéma 3.5), et si l'on appelle E_1 et E_2 les champs électriques respectifs auxquels ils sont soumis, on a :

$$\epsilon_1 \cdot E_1 = \epsilon_2 \cdot E_2 \quad \text{et} \quad E_1 \cdot d_1 + E_2 \cdot d_2 = U \quad (3.4)$$

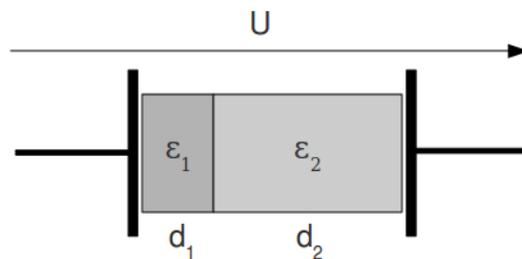


FIG. 3.5 : Schéma de l'application d'une tension sur un milieu diélectrique hétérogène.

En combinant ces deux équations, on trouve que :

$$E_1 = \frac{\epsilon_2 \cdot U}{\epsilon_2 \cdot d_1 + \epsilon_1 \cdot d_2} \quad \text{et} \quad E_2 = \frac{\epsilon_1 \cdot U}{\epsilon_2 \cdot d_1 + \epsilon_1 \cdot d_2} \quad (3.5)$$

Dans le cas simple où $d_1 = d_2 = d$, on a alors que :

$$E_1 = \frac{\epsilon_2}{\epsilon_2 + \epsilon_1} \cdot \frac{U}{d} \quad \text{et} \quad E_2 = \frac{\epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1} \cdot \frac{U}{d}$$

Si $\epsilon_1 > \epsilon_2$, on a alors que $E_1 < E_2$.

Au contraire, les milieux de culture utilisés pour exposer les cellules ont des permittivités relatives proches de celle de l'eau (80). Ils peuvent être plus ou moins conducteurs selon les sels et les ions qui y

sont ajoutés. Cette valeur élevée leur confère une mauvaise capacité à absorber les champs électriques, contrairement aux isolants.

La tension disruptive, quant à elle, est une valeur maximale à ne pas dépasser si l'on ne veut pas faire "claquer" l'isolant, à savoir le rendre conducteur de façon non réversible en l'endommageant. Cette dégradation est due à un changement moléculaire ou physique du matériau utilisé. Afin de garantir un champ électrique suffisamment important pour obtenir des effets et en prenant en compte le rapport des permittivités des matériaux utilisés, le matériau qui servira d'isolant devra posséder une tension de claquage la plus élevée possible.

3.3.1. Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension dans le milieu

On peut alors s'intéresser à l'influence de l'épaisseur de cette couche isolante sur la tension réellement appliquée sur la solution biologique. Pour cela, le modèle vu dans la section précédente (figure 3.2) peut servir de base au calcul du champ électrique. L'analyse peut se faire par simulation électrique, en faisant varier l'épaisseur de la couche isolante. Les autres éléments du modèle sont constants et modélisent un microsystème de $100\ \mu\text{m}$ d'espace inter-électrodes rempli de milieu de culture à $1\ \text{S/m}$ sur une hauteur de $50\ \mu\text{m}$ et une longueur de $4\ \text{cm}$ ($R_{bio} = 50\ \Omega$ et $C_{bio} = 14\ \text{pF}$). Pour des épaisseurs de $100, 300\ \text{nm}$, $1, 3, 10$ et $30\ \mu\text{m}$ et une permittivité relative de 3 , la capacité $C_{isolant}$ associée vaut respectivement $529, 174, 53, 17, 5,3, 1,7\ \text{pF}$.

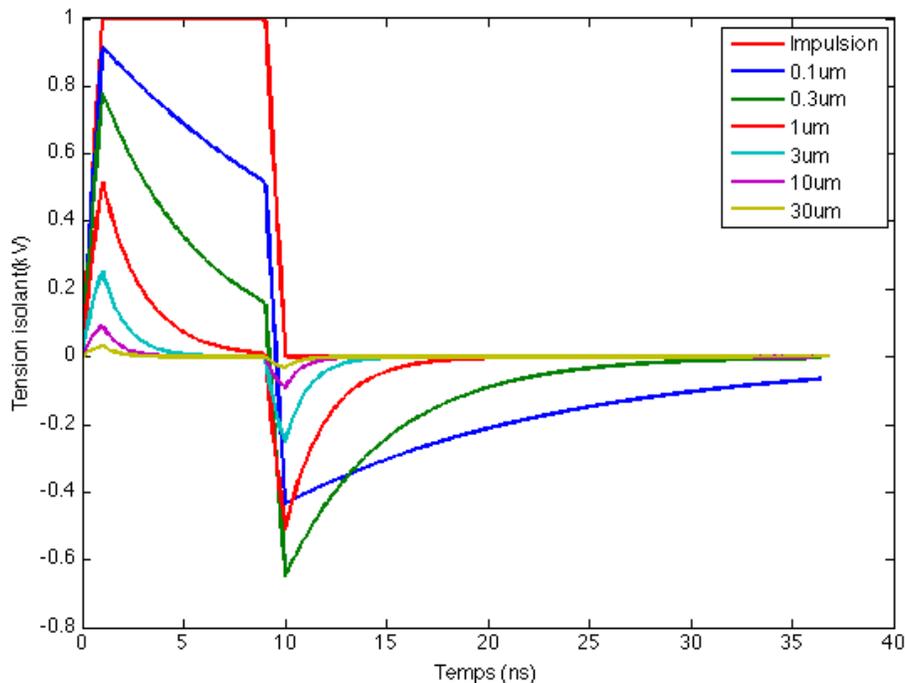


FIG. 3.6 : Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension appliquée sur le milieu. Comparaison entre 100 et $300\ \text{nm}$ et $1, 3, 10$ et $30\ \mu\text{m}$ d'isolant sur une cuvette commerciale d'électroporation de $1\ \text{mm}$ d'espace inter-électrodes, remplie d'un milieu de culture à $1\ \text{S/m}$ sur une surface de $1\ \text{cm}^2$.

On simule ensuite l'application d'une impulsion de 10 ns de temps total et ayant des fronts de transition de 1 ns sur cette structure. La figure 3.6 montre les relevés de la tension appliquée sur le milieu contenu entre deux électrodes espacées de 100 μm et couvertes d'une couche isolante de 100, 300 nm, 1, 3, 10 et 30 μm .

On peut noter deux effets différents :

- d'une part, une baisse de la tension maximale atteignable dans le milieu avec l'augmentation de l'épaisseur de l'isolant ;
- d'autre part, une chute plus rapide du potentiel.

La première observation est en lien avec le fait que plus l'isolant est épais, plus il est difficile de le traverser et plus il est capable de retenir l'énergie qu'on lui fournit. Cela signifie aussi que pour obtenir une même tension maximale dans le milieu, il sera nécessaire d'appliquer une impulsion initiale plus intense, sans toutefois dépasser le seuil limite de claquage. Les tableaux 3.1, 3.2 et 3.3 fournissent les conditions électriques en se plaçant à la limite de claquage de l'isolant - limite de claquage du parylène de 210 MV/m (voir les autres propriétés du parylène en section 5.3.2). On en déduit alors le champ obtenu dans le milieu (conductivité de 1 S/m). Le tableau 3.1 donne les valeurs dans le cas d'un microcanal de 100 μm et les tableaux 3.2 et 3.3 respectivement dans le cas de cuvettes d'électroporation de 1 et de 2 mm d'espace inter-électrodes (surface de contact respectivement de 1 et de 2 cm^2).

TAB. 3.1 : Comparaison des champs maximaux admissibles selon l'épaisseur de parylène déposé. L'espace inter-électrodes est de 100 μm et ne change pas, signifiant que le volume de milieu traité diminue.

Épaisseur isolant	C_{isolant}	Tension maximale*	Tension Milieu	Champ Milieu
0,1 μm	529 pF	40 V	38,5 V	3,85 kV/cm
0,3 μm	174 pF	120 V	93 V	9,3 kV/cm
1 μm	53 pF	400 V	200 V	20 kV/cm
3 μm	17 pF	1.200 V	300 V	30 kV/cm
10 μm	5,3 pF	4.000 V	400 V	50 kV/cm
30 μm	1,7 pF	12.000 V	440 V	110 kV/cm

* La tension maximale applicable est calculée en régime établi ($U_{\text{isolant}} = U/2$) en fonction de la tension de claquage de l'isolant et de son épaisseur ($U_{\text{isolant}} = E_{\text{claquage}} \cdot e$, où e est l'épaisseur de l'isolant).

On peut aussi calculer le champ maximal appliqué *in vivo* par l'intermédiaire d'électrodes isolées sur un tissu. Dans le cas d'un espace inter-électrodes de 6 mm recouvertes d'une couche isolante de 10 μm et rempli d'un gel conducteur utilisé dans les applications *in vivo* (Ivorra *et al.*, 2008), une simulation électrique montre que la tension maximale appliquée sur le gel est égale à la tension appliquée sur les électrodes.

Un second phénomène lié à la diminution de la capacité C_{isolant} lorsque l'isolant s'épaissit est la diminution de la constante de temps $R_{\text{bio}} \cdot C_{\text{isolant}}$. En fonction de l'épaisseur de la couche diélectrique, le

TAB. 3.2 : Comparaison des champs maximaux admissibles selon l'épaisseur de parylène déposé. L'espace inter-électrodes est de 1 mm et ne change pas, signifiant que le volume de milieu traité diminue.

Epaisseur isolant	$C_{isolant}$	Tension maximale	Tension Milieu	Champ Milieu
0,1 μm	26,4 nF	40 V	40 V	0,4 kV/cm
0,3 μm	8,82 nF	120 V	120 V	1,2 kV/cm
1 μm	2,64 nF	400 V	360 V	3,6 kV/cm
3 μm	882 pF	1.200 V	960 V	9,6 kV/cm
10 μm	264 pF	4.000 V	2.000 V	20 kV/cm
30 μm	88,2 pF	12.000 V	3.000 V	30 kV/cm

TAB. 3.3 : Comparaison des champs maximaux admissibles selon l'épaisseur de parylène déposé. L'espace inter-électrodes est de 2 mm et ne change pas, signifiant que le volume de milieu traité diminue.

Epaisseur isolant	$C_{isolant}$	Tension maximale	Tension Milieu	Champ Milieu
0,1 μm	52,9 nF	40 V	40 V	0,2 kV/cm
0,3 μm	17,6 nF	120 V	120 V	0,6 kV/cm
1 μm	5,29 nF	400 V	400 V	2 kV/cm
3 μm	1,76 nF	1.200 V	1.080 V	5 kV/cm
10 μm	529 pF	4.000 V	2.800 V	14 kV/cm
30 μm	176 pF	12.000 V	4.800 V	24 kV/cm

signal reçu par le milieu biologique n'aura donc pas la même forme, que ce soit en amplitude et en durée. Il est aussi à noter que lors de la phase descendante de l'impulsion initiale, la tension dans la capacité créée par l'isolant peut devenir négative.

3.3.2. Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension dans l'isolant

En réutilisant ce même modèle, on peut aussi vouloir étudier l'influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension appliquée dans le matériau diélectrique et par la suite du champ électrique résultant. Ceci peut par exemple être intéressant pour savoir si la tension de claquage est atteinte ou non au cours de l'application d'une impulsion intense et ultra-courte. La figure 3.7 montre que la cinétique de montée de l'impulsion dans l'isolant n'est pas la même selon son épaisseur, lorsque l'on applique une impulsion de 10 ns sur un milieu de culture à 1 S/m contenu dans une cuvette commerciale d'électroporation recouverte d'un film diélectrique d'épaisseur allant de 1 à 30 μm .

Le temps de montée et la tension maximale appliquée sur l'isolant ne sont pas identiques dans tous les cas, selon que l'isolant ait le temps ou non de se charger complètement. Lorsque l'accumulation de charges est complète, la tension totale appliquée à l'ensemble est répartie équitablement sur les deux couches isolantes placées de chaque côté du milieu à exposer. La tension maximale atteinte est alors $\frac{U_{impulsion}}{2}$. Dans les conditions présentées ci-dessus, on atteint cette valeur pour une épaisseur de 10 et de

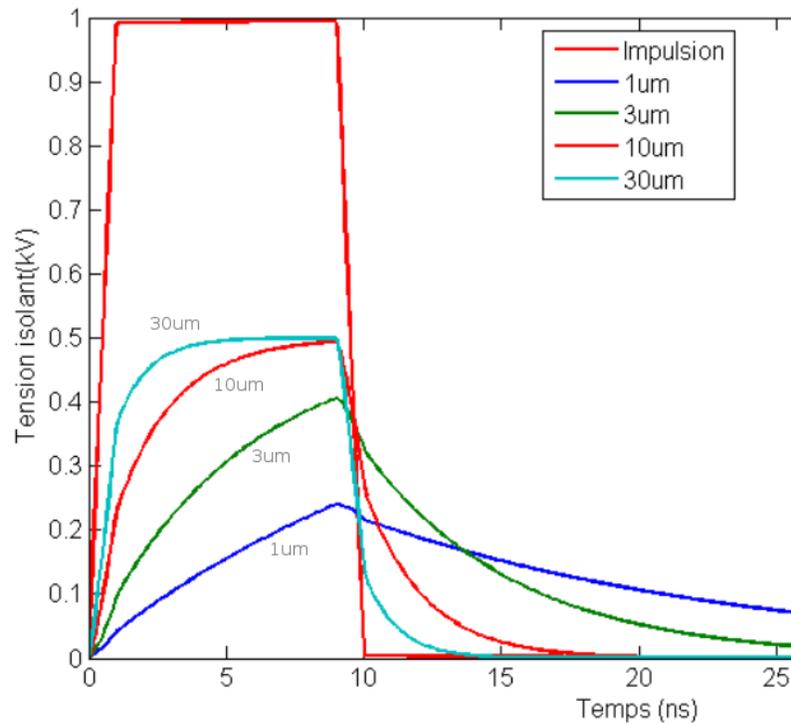


FIG. 3.7 : Influence de l'épaisseur de l'isolant sur la tension à ses bornes. Comparaison entre 1, 3, 10 et 30 μm d'isolant sur une cuvette commerciale d'électroporation de 1 mm d'espace inter-électrodes, remplie d'un milieu de culture à 1 S/m sur une surface de 1 cm^2 .

30 μm .

Dans le cas d'une couche de 3 μm , 80 % de cette valeur maximale est imposée à l'isolant et seulement 40 % pour une couche de 1 μm . En fonction du matériau utilisé et de l'épaisseur déposée, on pourra appliquer une tension initiale plus importante sans atteindre la limite fixée par la tension de claquage de ce matériau.

3.4. Conclusion

A travers cette brève étude théorique, nous avons pu mettre en évidence que l'utilisation d'électrodes isolées par une fine couche diélectrique permettait d'appliquer une tension sur un milieu conducteur. Il est aussi à noter que la forme de l'impulsion résultante dans cette solution diffère de celle appliquée initialement et doit être caractérisée lors de l'utilisation d'un tel système.

Cette méthode semble donc prometteuse, pourvu que les impulsions générées aient un contenu spectral suffisamment large pour outrepasser le comportement isolant du diélectrique à basse fréquence. C'est le cas des impulsions ultra-courtes étudiées, comme le montrent les simulations présentées dans ce chapitre. Il faut aussi ajouter comme avantage à cette technique qu'elle permet aussi de limiter voire annuler le courant de conduction, source principale de l'échauffement par effet Joule. Enfin, elle permet de s'affranchir des effets électrochimiques, discutés dans la section 1.1.3, lorsque l'on applique une tension à l'aide d'électrodes métalliques plongées dans une solution liquide.

Toutefois, il reste à apporter la preuve expérimentale que l'impulsion ainsi délivrée peut avoir un quelconque effet sur le monde biologique, et en particulier sur une population cellulaire. Des expériences réalisées dans cette optique sont présentées dans la partie IV, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

MICRODISPOSITIFS D'EXPOSITION DE CELLULES POUR LA VISUALISATION EN TEMPS RÉEL

Jusqu'à présent peu d'études sur les nsPEF se sont intéressées expérimentalement aux mécanismes sous-jacents à l'exposition de cellules à ce type d'impulsions. Car même si ces impulsions promettent des avancées spectaculaires dans le traitement de cellules, la compréhension des phénomènes observés jusqu'à maintenant, qu'ils soient intracellulaires ou qu'ils affectent la membrane plasmique, ne pourront être interprétés facilement sans une véritable étude de fond sur ces effets.

En particulier, l'observation de modification au niveau de la membrane plasmique peut être intéressante, afin de pouvoir comparer les effets de ces impulsions ultra-courtes (en fonction de l'amplitude, du nombre d'impulsions, de la fréquence de répétition, de la durée...) à des impulsions électroperméabilisantes plus habituelles. Pour cela, des équipes partenaires ont commencé la réalisation d'outils spécifiques : un microscope à diffraction Raman Anti-Stokes cohérente (DRASC) et des générateurs d'impulsions de 300 ps à 5 ns.

L'utilisation des phénomènes Raman va permettre de pouvoir visualiser n'importe quelle interaction moléculaire et notamment des discontinuités dans des zones denses d'une même liaison chimique, telle que les liaisons C-H des bicouches lipidiques ou les liaisons H-O spécifiques aux couches structurées d'eau interfaciale autour des cellules.

Aussi pour pouvoir utiliser ces nouvelles technologies sur des éléments vivants, il est apparu indispensable de réaliser de nouvelles biopuces (voir chapitre 2) pour exposer et observer soit des cellules en suspension, soit des cellules attachées. Dans ce chapitre, nous allons donc nous intéresser à la conception d'une telle biopuce en partant des différentes contraintes qu'elle devra respecter pour arriver jusqu'à sa caractérisation, électrique et optique. Entre temps, nous nous intéresserons aux différents choix technologiques qui ont été faits ainsi qu'aux étapes de fabrication qui ont été nécessaires à sa réalisation.

4.1. Objectifs et contraintes

Encore peu de travaux scientifiques ont exploré la possibilité d'atteindre et de modifier les propriétés des membranes intracellulaires par le biais de nanopulses. Afin de réduire considérablement les tensions à appliquer tout en garantissant des champs suffisamment élevés, l'approche microsystème a été préconisée. De plus, il est envisagé de coupler l'exposition de cellules à ce type d'impulsions avec un système de microscopie particulier, dans le but de suivre par microscopie en temps réel les cellules traitées, et en particulier, les différentes membranes qui composent leurs organites ou leur barrière extérieure.

Aussi, ce microdispositif devra s'intégrer dans un environnement particulier (voir Fig. 4.1) et permettre de remplir certains objectifs que nous allons aborder à présent.

4.1.1. Un microdispositif pour la visualisation en temps réel lors de l'exposition à des impulsions courtes

Le dispositif que nous souhaitons développer a pour vocation première de permettre l'application d'impulsions ultra-courtes (telles que celles discutées dans la section 1.3) sur des cellules tout en visualisant leurs effets sur les membranes lipidiques, celles des vésicules internes comme la membrane plasmique, par l'intermédiaire d'un microscope basé sur le principe de la diffusion Raman. La visualisation d'objets par microscopie Raman nécessite la focalisation de deux lasers au foyer image du microscope.

Le système proposé ici devra donc pouvoir recevoir des cellules (en suspension ou adhérentes) sur un substrat permettant le passage des faisceaux laser, surmonté d'électrodes pour l'exposition de ces cellules à des champs électriques. L'idée retenue est de développer ce système à l'aide des techniques de fabrication de la microtechnologie afin de proposer des microcanaux à la fois suffisamment larges pour laisser passer un flux cellulaire et suffisamment compacts pour pouvoir appliquer des champs toujours plus intenses.

4.1.2. Contraintes environnantes

Pour remplir ces objectifs, le microdispositif à réaliser devra se plier à des contraintes d'ordre divers :

- géométrique, afin de pouvoir être inséré dans les 8,6 mm de hauteur permis entre le condenseur et l'objectif ;
- mécanique, le poids maximal supportable par le bras étant limité ainsi que la force de traction des différents éléments de positionnement (platines micrométriques et nanométrique) ;
- électrique, pour garantir une transmission parfaite du signal entre le générateur et la biopuce par l'intermédiaire d'un bon contact électrique ;
- fluïdique, pour permettre le changement rapide de cellules sous le champ visuel du microscope sans avoir à dérégler la focalisation des faisceaux laser.

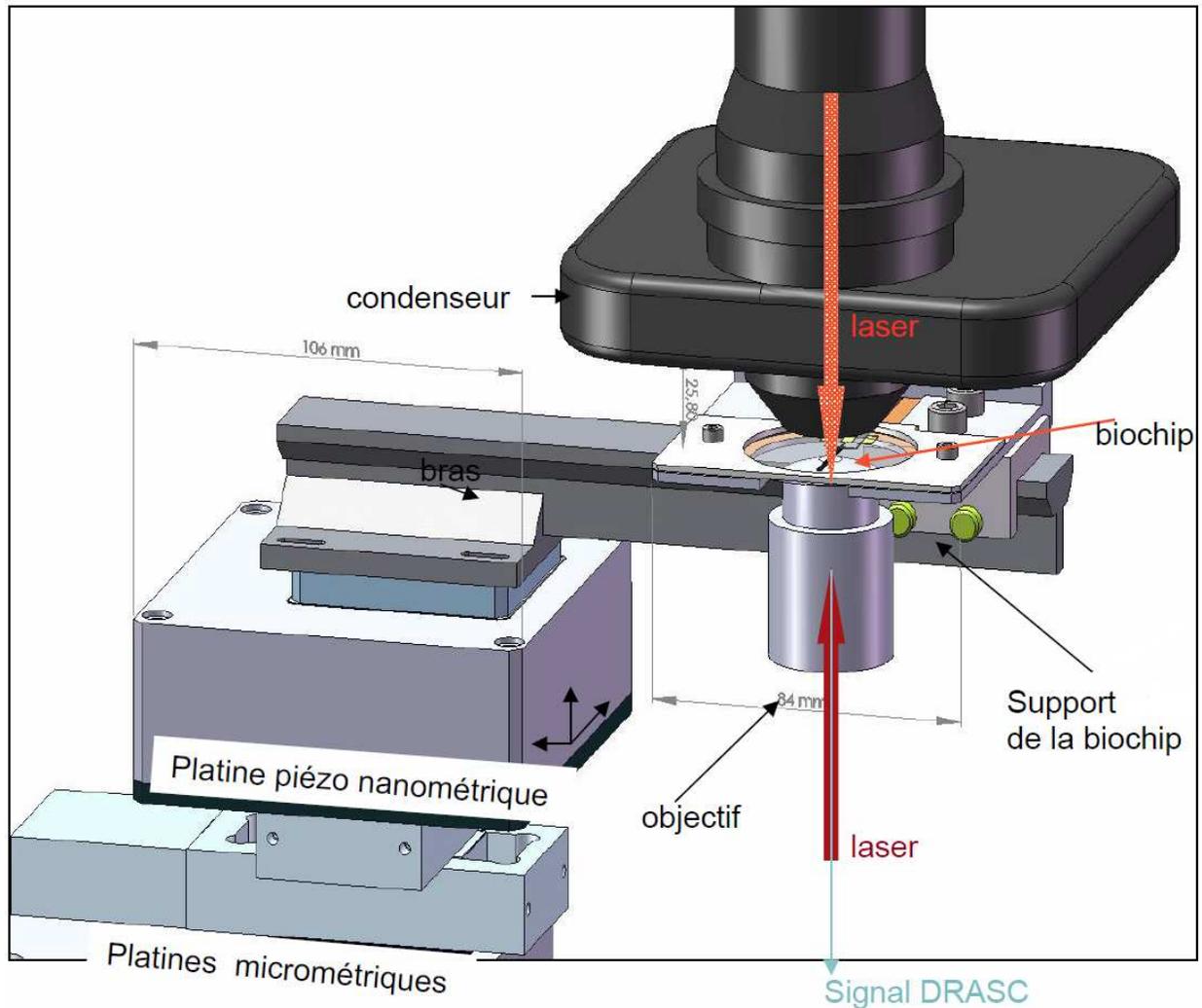


FIG. 4.1 : Schéma du support de la biopuce au niveau du microscope DRASC, incluant la platine micrométrique et nanométrique pour le déplacement des objets à visualiser dans le champ du microscope, le bras support de la biopuce. Le condenseur et l'objectif par lesquels arrivent respectivement le faisceau laser pompe et le faisceau laser Stokes sont également représentés. Dessin réalisé par Thomas Schmid, ONERA, département DMPH, dans le cadre de l'ANR Nanopulsebiochip.

Mais la principale contrainte provient de la méthode de détection et de visualisation des objets qui impose un trajet optique avec un minimum d'obstacles ainsi que des déviations les plus minimales des faisceaux laser. La transparence des matériaux à utiliser est donc indispensable, ainsi que la planéité des diverses surfaces qui constitueront le microdispositif et leur parallélisme, ceci afin de ne pas dévier le faisceau. Enfin, les divers objectifs utilisables dans la configuration DRASC ont des zones de travail aux alentours de $200\ \mu\text{m}$ (c'est à dire que leur plan focal est situé à environ $200\ \mu\text{m}$ du haut de l'objectif). L'une des faces du canal dans lequel circuleront les cellules devra donc être moins épaisse que cette distance et l'utilisation d'une lamelle de microscope (épaisseur de $170\ \mu\text{m}$) semble inévitable.

Ces dernières limitations vont cependant être amenées à s'assouplir fortement en vue de la mise au point d'une nouvelle configuration d'observation des cellules à l'aide du microscope DRASC.

4.1.3. Caractéristiques des générateurs et signaux associés

Une autre contrainte, impactant essentiellement la géométrie des électrodes, vient de la nécessité de transmettre un maximum d'énergie des générateurs d'impulsions jusqu'au milieu biologique contenu dans le biomicrosystème. En effet, les générateurs mis à notre disposition pour l'application d'impulsions ultra-courtes ont des impédances internes de 50 Ω et délivrent des signaux tels que ceux représentés en figure 4.2.

On peut notamment remarquer sur cette figure (Fig. 4.2) que les spectres des signaux unipolaires s'étendent du continu jusqu'à 400 MHz pour le signal le plus long (4 ns - a) et jusqu'à 700 Mhz pour le plus court (3 ns - b). Dans le cas d'un signal bipolaire, il existe une fréquence centrale autour de laquelle le spectre s'étale (c). Ces différentes caractéristiques devront être prises en compte lors de la conception du système et en particulier dans la géométrie des électrodes.

4.1.4. Limitation technologique

Enfin, il existe des contraintes imposées non pas par l'environnement ou le fonctionnement souhaité du système à développer, mais par les technologies disponibles pour sa réalisation et leurs limitations actuelles.

L'utilisation de certains substrats, par exemple, restreint le choix des résines pour la réalisation des microsystèmes, essentiellement à cause de leur propriété d'adhésion sur ces matériaux. Les techniques mises à disposition par les diverses centrales technologiques de développement ont elles aussi leurs limites, par exemple dans l'épaisseur maximale qui peut être déposée, en lien aussi avec la précédente remarque.

Dans le cadre de notre application et en regard des points abordés à l'instant, il ne sera guère envisageable de développer des systèmes ayant des hauteurs de canaux supérieurs à une cinquantaine de micromètres. Cette limitation sera à prendre en compte dans les calculs d'impédance qui vont suivre.

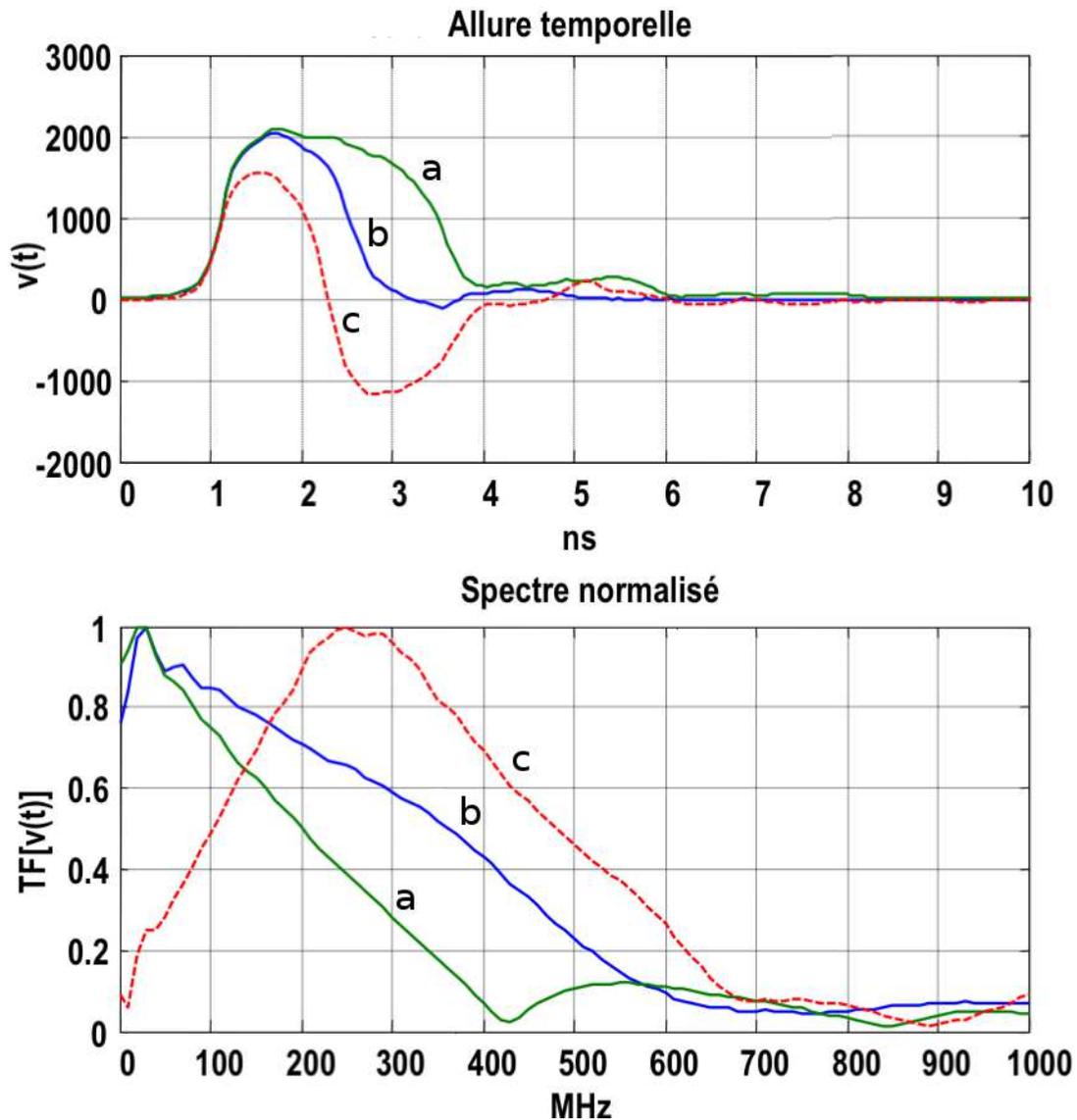


FIG. 4.2 : Signaux délivrés par les générateurs d'impulsions ultra-courtes (XLim, Limoges, France). (A) Allure temporelle des signaux et (B) allure spectrale des signaux. (a) Impulsion unipolaire de 4 ns, temps de montée de 500 ps, amplitude maximale 4 kV. (b) Impulsion unipolaire de 4 ns, temps de montée de 500 ps, amplitude maximale 4 kV. (c) Impulsion bipolaire de 4 ns, temps de montée de 500 ps, amplitude maximale crête à crête 4 kV.

4.2. Adaptation d'impédance

L'adaptation d'impédance est une méthode visant à optimiser le transfert d'énergie entre deux systèmes. Elle est d'autant plus indispensable en haute fréquence afin de permettre ce transfert via des lignes de transmission ayant une certaine impédance caractéristique, elle-même adaptée à l'impédance de sortie du générateur fournissant l'énergie.

Les générateurs utilisés dans nos applications (décrits au paragraphe 4.1.3) délivrent des impulsions

dont la durée est comprise entre 2 et 10 ns. Les fréquences qu'elles mettent alors en jeu peuvent être dissociées en deux domaines distincts :

- basse fréquence, pour les plateaux de tension ;
- haute fréquence, pour les transitions (fronts de montée/descente).

Selon le phénomène qui sera prépondérant dans les effets biologiques recherchés (aspect encore non étudié), il sera bon de s'intéresser à ces deux aspects. Cependant l'étude de l'adaptation d'impédance ne peut se faire avec les mêmes outils dans les deux cas. Nous allons aborder ces deux méthodes et montrer que la première décrite convient pour des signaux unipolaires ou bipolaires "lents" (durée supérieure à quelques nanosecondes) alors que la seconde pourra être utilisée dans le cas d'impulsions beaucoup plus courtes.

4.2.1. Approche basse fréquence : impédance de charge

Dans cette approche, le milieu contenant des cellules est alors modélisé par un ensemble $R_{Bio} C_{Bio}$ en parallèle, comme déjà proposé dans la sous-section 1.1.3.4. Ce modèle montrait aussi que l'impédance associée était constante en basse fréquence et jusqu'à la fréquence de coupure intrinsèque du milieu choisi : 225 MHz dans le cas d'un milieu de culture de conductivité de 1 S/m, type S-MEM (Invitrogen).

4.2.1.1. Hypothèses et objectifs

Nous avons montré précédemment (figure 1.3 de la section 1.1.3.4) que lorsque des signaux intenses étaient appliqués sur des solutions biologiques, l'impédance restait constante sur un très grande plage en basse fréquence, dans le cas de grands signaux (capacité double-couche court-circuitée).

Si l'on considère que la plus grande partie de l'énergie du type d'impulsions que l'on souhaite appliquer est contenue dans les basses fréquences (jusqu'à quelques centaines de MHz), ce qui est vrai pour des impulsions d'une dizaine de nanosecondes, on peut alors chercher à adapter le volume de milieu de telle façon que la résistance globale du système soit égale à 50Ω en basse fréquence (voir figure 4.3).

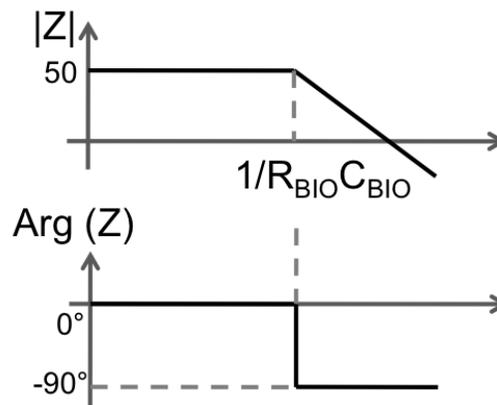


FIG. 4.3 : Diagramme de Bode théorique du système adapté à 50Ω en basse fréquence.

4.2.1.2. Modèle électrique

Dans la partie basse fréquence, le comportement fréquentiel de l'impédance est uniquement due à la résistance R_{Bio} . On peut donc, en première approximation, négliger la capacité C_{Bio} et modéliser le système uniquement par : $Z_{Bio}(\omega) = R_{Bio}$, où $Z_{Bio}(\omega)$ est l'impédance du système.

Dans ces conditions, il sera donc simple de déterminer les paramètres géométriques du canal et des électrodes afin de satisfaire $Z_{Bio}(\omega) = 50\Omega$, en tout cas dans le domaine des basses fréquences. En effet, la résistance du milieu dépend de sa conductivité σ_{Bio} , de l'espace inter-électrodes dans lequel il est contenu e et de la surface de passage du courant S (correspondant au produit de la hauteur h des électrodes par leur largeur L , $S = h \cdot L$ - si l'on considère que le canal se referme sur les électrodes). Cette résistance vérifie alors l'équation :

$$R_{Bio} = \frac{1}{\sigma_{Bio}} \cdot \frac{e}{S} \quad (4.1)$$

4.2.2. Approche haute fréquence : micro-ligne de transmission

La seconde possibilité pour traiter l'adaptation d'impédance est de considérer un problème purement haute fréquence et d'utiliser les outils spécifiques à ce domaine. On peut alors voir le microsysteme à développer comme étant une micro-ligne de transmission coplanaire. Cette ligne coplanaire sera ensuite reliée à une résistance de 50Ω qui absorbera l'énergie émise par les générateurs.

4.2.2.1. Modèle de ligne à constantes réparties

Deux points, au moins, sont à aborder pour étudier des phénomènes d'adaptation haute fréquence : d'une part l'impédance complexe de la ligne, qui donne les caractéristiques intrinsèques du système, et d'autre part le coefficient de réflexion, qui permet de préciser le comportement de l'onde à la transition entre sa sortie du câble coaxial et son arrivée dans la ligne de transmission. Le modèle de ligne à constantes réparties ainsi que les problèmes de réflexion liés à la propagation d'ondes sont largement détaillés dans l'article en page [xix](#).

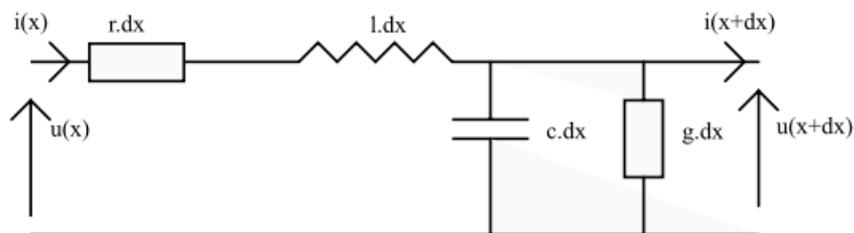


FIG. 4.4 : *Modèle de ligne à constantes réparties. r et l représentent l'impédance de la ligne et c et g l'impédance du milieu.*

Dans notre cas, on peut rajouter un élément conducteur en parallèle de la capacité caractérisant le

comportement résistif du "diélectrique" utilisé pour séparer les deux lignes (voir figure 4.4), qui est dans notre cas le milieu de culture contenant les cellules et non de l'air comme dans la plupart des cas.

L'impédance complexe associée à ce modèle est donnée par l'équation suivante :

$$Z_0 = \sqrt{\left| \frac{r + j \cdot l \cdot \omega}{g + j \cdot c \cdot \omega} \right|} \quad (4.2)$$

Lorsque l'on souhaitera réaliser une telle micro-ligne, il faudra alors s'intéresser au comportement global de ce système. Il existe en effet deux types de comportements. Le premier correspond à une ligne dont l'impédance est principalement caractérisée par la résistance de ligne et la conductivité élevée du milieu qui sépare les deux lignes de propagation. Dans ce cas, l'équation 4.2 devient :

$$Z_0 = \sqrt{\frac{r}{g}} \quad (4.3)$$

Ce cas est proche de celui décrit dans le paragraphe précédent et définit très bien le comportement basse fréquence d'un tel système. On parlera alors d'adaptation lorsque cette impédance caractéristique sera égale à l'impédance caractéristique de la source associée. La conductance g correspond à l'inverse de la résistance R_{Bio} décrite précédemment et r peut être simplement calculée à l'aide des différents paramètres géométriques et électriques des électrodes considérées.

Le second cas à envisager est obtenu lorsque la fréquence augmente ou bien lorsque la résistance de ligne ainsi que la conductivité du diélectrique utilisé sont faibles. Des impulsions "rapides" (dont la durée est inférieure à quelques nanosecondes) peuvent être par exemple considérées ici, contrairement à des impulsions "lentes" (durée inférieure à quelques nanosecondes) dont le spectre est limité en fréquence. Dans ce cas là, l'impédance caractéristique vaut alors :

$$Z_0 = \sqrt{\frac{l}{c}} \quad (4.4)$$

De la même manière que précédemment, on cherchera à obtenir $Z_0 = Z_c$, où Z_c est l'impédance caractéristique des générateurs. l et c sont eux aussi dépendants de la géométrie des canaux et des paramètres électriques des matériaux utilisés.

4.2.2.2. Intérêt de l'isolation

On peut aussi se pencher sur le cas d'électrodes isolées, comme précédemment décrites dans le chapitre 3. En plus d'éviter la création d'espèces chimiques toxiques par application de champs électriques pulsés, cette couche isolante peut aussi avoir pour rôle de limiter le passage de courant de conduction dans le milieu contenu entre les électrodes constituant la ligne coplanaire.

La conductance g dans le modèle précédent peut alors être remplacée par un ensemble d'une conduc-

tance et d'une capacité en série, la capacité modélisant le diélectrique déposé sur les électrodes pour isoler le milieu. En basse fréquence, cette capacité se comporte comme un circuit ouvert et ne permet ainsi pas à l'onde de transiter dans le milieu g . En haute fréquence, le comportement du système reste identique à celui décrit dans le cas non isolé.

L'isolation peut donc permettre d'obtenir plus aisément un phénomène propagatif, y compris à basse fréquence. Ce type de système ne sera pas étudié ici.

4.3. Conception des électrodes

Après avoir vu les diverses approches qu'il existait pour l'adaptation d'impédance, nous allons nous intéresser à la conception des électrodes, point essentiel du développement de ce biomicrosystème, dont les objectifs sont définis dans la première section de ce chapitre.

La géométrie du canal est en effet crucial que ce soit sur le plan électrique, en terme d'adaptation d'impédance mais aussi de connectique, sur le plan fluide ou bien encore biologique. Et les électrodes jouent ici divers rôles : murs du canal, soutien pour la fermeture du canal et liaison électrique entre le milieu et les générateurs.

Nous allons voir ici comment nous les avons choisis, calculés et conçus pour arriver jusqu'au masque final qui servira dans le procédé de fabrication de la biopuce.

4.3.1. Choix du type d'électrodes

Dans le domaine des biomicrosystèmes et lorsqu'on veut appliquer des champs électriques sur des cellules, deux grandes familles d'électrodes sont utilisées :

- des électrodes fines, de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur, encore appelées électrodes 2D ;
- des électrodes épaisses, de quelques dizaines de micromètres d'épaisseur, encore appelées électrodes 3D.

Dans le premier cas, la technique utilisée pour déposer des couches fines conductrices est relativement bien maîtrisée. La pulvérisation cathodique de métaux, d'or ou de cuivre par exemple, est une étape indispensable dans la conception de la plupart de micro-circuits afin de pouvoir faire transiter des informations électriques sur quelques dizaines de nanomètres de hauteur. Cependant, la hauteur des électrodes étant faible comparée au diamètre des objets à manipuler, l'utilisation d'un autre matériau est indispensable pour réaliser la partie fluide du système, afin de surélever le capot refermant le système par rapport aux électrodes.

Dans le cas des électrodes épaisses, les flancs des électrodes sont suffisamment élevés pour constituer eux-mêmes les bords du canal. Les matériaux conducteurs généralement durs peuvent aussi être utilisés pour supporter l'élément qui sert de fermeture du haut du canal. Mais leur réalisation nécessite une seconde étape, plus contraignante, permettant le dépôt d'une épaisseur importante de métaux (quelques micromètres), tels que le cuivre ou l'or.

Deux avantages ne sont cependant pas à négliger. Le premier vient de l'augmentation de la surface de passage du courant par rapport à des électrodes fines, entraînant ainsi une diminution de la résistance des électrodes. Et afin de minimiser les pertes ohmiques (par effet Joule notamment) dans le transport de l'information, cette résistance doit être la plus faible possible. Le second est illustré par la figure 4.5.

Celle-ci montre que la répartition du champ électrique dans la zone d'intérêt située entre les électrodes, c'est à dire là où seront placées les cellules à traiter, est beaucoup plus homogène dans le cas d'électrodes épaisses.

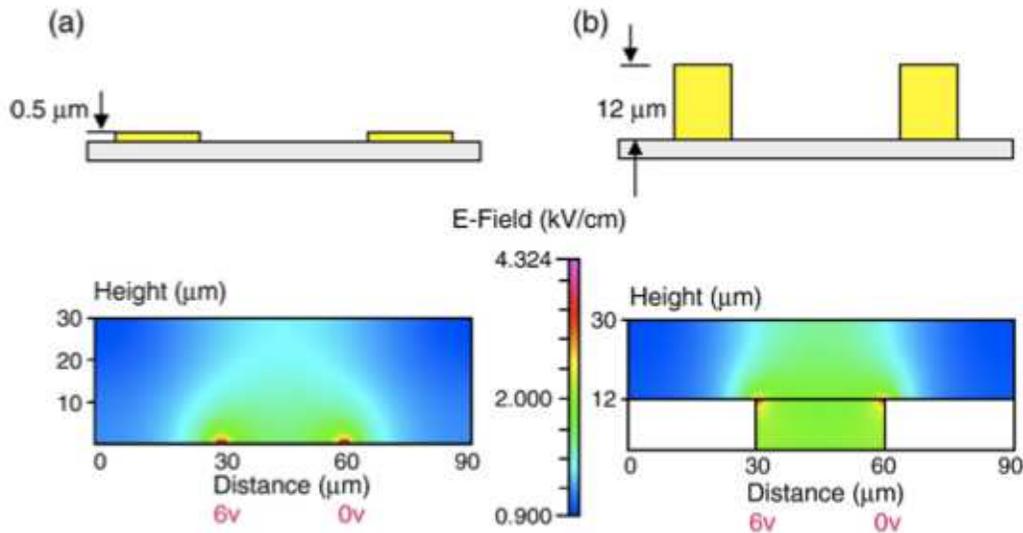


FIG. 4.5 : Distribution du champ électrique dans le cas (a) d'électrodes 2D et (b) d'électrodes 3D. Simulation par éléments finis (He et al., 2007).

4.3.2. Impédance du système

Cette première approche favorise l'utilisation d'électrodes épaisses dans notre application. Une autre raison du choix des électrodes épaisses, dans le cas d'impulsions "lentes" (durée supérieure à quelques nanosecondes), vient de l'impédance que présente ces deux types de système. En effet, si l'on s'intéresse au modèle de ligne présenté en section 4.2.2.1, on peut noter qu'il y a deux parties distinctes : la partie $\{r, l\}$ qui représente les électrodes et la partie $\{g, c\}$ la solution dans laquelle se trouve les cellules à traiter.

On peut alors s'intéresser à l'influence de chacun de ces sous-ensembles sur le comportement fréquentiel global du système. La figure 4.6 montre séparément les module de l'impédance de la ligne et du milieu dans deux configurations d'électrodes différentes : (a) électrodes épaisses (hauteur de 50 µm) et (b) électrodes fines (hauteur de 150 nm). Dans le cas (a), on peut noter que l'impédance du milieu est prépondérante à basse fréquence (zone qui nous intéresse dans le cas d'impulsions monopolaires d'une dizaine de nanosecondes). Dans le cas (b), l'impédance de la ligne n'est non seulement plus négligeable par rapport à celle du milieu mais devient supérieure, impliquant une plus grande dissipation de l'énergie dans les électrodes que dans le milieu.

Cette augmentation de la résistance entraîne deux effets négatifs. D'une part, la tension réellement appliquée au milieu d'exposition est réduite du rapport qu'il existe entre la résistance du milieu et la somme de cette résistance et la résistance de la ligne (pont diviseur de tension). D'autre part, une augmentation

locale de la température au niveau des électrodes peut avoir lieu et entraîner des effets secondaires non souhaités sur les cellules.

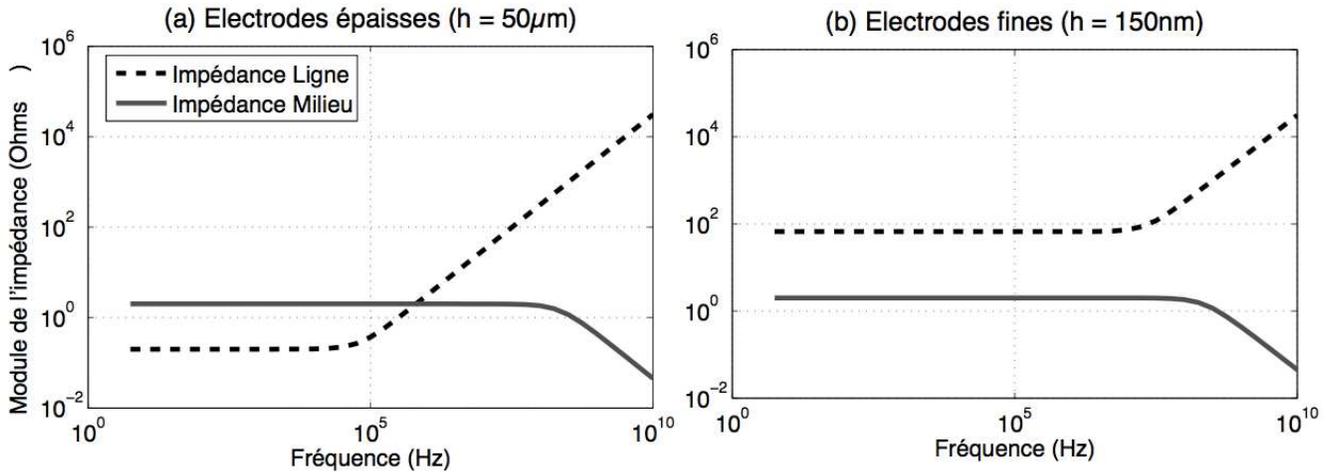


FIG. 4.6 : Calcul de l'impédance de la ligne et du milieu dans le cas d'électrodes épaisses (a) et d'électrodes fines (b). Les paramètres utilisées sont : une hauteur de canal de $50 \mu\text{m}$, une largeur d'électrodes de 1mm , une longueur de 1cm et un espace entre les électrodes de $100 \mu\text{m}$. La hauteur des électrodes est de $50 \mu\text{m}$ dans le cas des électrodes épaisses (a) et de 150nm dans le cas d'électrodes fines (b). L'axe des abscisses est représenté en échelle logarithmique.

Cependant, l'utilisation d'électrodes fines pourra être intéressante, d'un point de vue fréquentiel, lorsque l'on voudra réaliser des micro-lignes de transmission (voir section 4.2.2).

4.3.3. Calcul des paramètres géométriques

Dans la section 4.2, nous avons montré qu'il existait deux méthodes pour calculer les paramètres géométriques du système que nous souhaitons développer, selon que l'on souhaite obtenir une impédance de fin de ligne ou au contraire une micro-ligne de transmission. L'idée initiale était de réaliser une adaptation par le biais du système lui-même. Nous utiliserons donc la première solution proposée, en considérant que le milieu n'est que purement résistif.

Le milieu d'exposition des cellules étant donné, et donc sa conductivité fixée, il reste cependant 3 éléments à définir : la hauteur des électrodes, la largeur du canal et sa longueur totale.

Le premier de ces éléments est contraint d'une part par la taille des objets qui transiteront dans le canal délimité par les électrodes et d'autre part par la technologie de dépôt utilisée. Les cellules ayant un certain diamètre, le canal devra avoir une hauteur supérieure à ce diamètre (de l'ordre de $15 \mu\text{m}$ pour des cellules DC-3F ou LPB). Nous choisirons une hauteur h de $30 \mu\text{m}$.

La seconde dimension a un impact direct sur le champ électrique maximal atteignable avec un générateur donné. En effet, l'intensité du champ électrique E est donnée par le rapport de la tension appliquée U sur la distance entre les électrodes e . Plus cette distance est faible, plus le champ électrique pour un

valeur de tension donnée sera élevée dans le canal. Mais cette largeur de canal est aussi dépendante de la taille de la zone à visualiser, contrainte par la taille des faisceaux laser utilisés. Une largeur d'une centaine de micromètres semble être un bon compromis entre valeur de champ et zone de visualisation.

Il ne reste alors plus qu'une seule dimension à paramétrer. Si l'on considère l'équation 4.5 et si l'on souhaite obtenir une résistance précise, la longueur du canal est alors complètement défini et vaut :

$$L = \frac{1}{\sigma_{Bio}} \cdot \frac{e}{R_{Bio} \cdot h} \quad (4.5)$$

Pour obtenir une résistance R_{Bio} de 50 Ω , en considérant l'ensemble des paramètres précédemment fixés ($h = 30 \mu\text{m}$ et $e = 100 \mu\text{m}$) et dans le cas de milieu d'exposition de conductivité $\sigma_{Bio} = 1 \text{ S/m}$, on obtient alors une longueur totale L de 6,6 cm, à séparer sur deux canaux.

4.3.4. Validation par modélisation quasi-statique et dynamique par éléments finis

Afin de valider cette géométrie de canal lors de l'application d'un signal électrique ultra-court, nous nous sommes tournés vers des méthodes de modélisation et de calculs par éléments finis (FEM) pour l'analyse statique et par différences finies (FDTD) pour l'analyse temporelle. Ces méthodes sont utilisées pour résoudre numériquement des équations aux dérivées partielles et ainsi représenter analytiquement le comportement dynamique de certains systèmes physiques (mécaniques, thermodynamiques, acoustiques, etc.).

4.3.4.1. Modélisation par éléments finis

Nous nous sommes intéressés à plusieurs cas. Le premier est celui présenté jusqu'à présent, les électrodes servant alors de support du canal et couvrant alors toute sa hauteur. Dans ce cas, le calcul de la résistance du canal est celui présenté dans la section précédente, où R_{bio} est directement proportionnel à l'espace inter-électrodes et à l'inverse de la surface de passage du courant (figure 4.7-a).

Dans un second cas, on s'autorise à ce que la hauteur du canal soit supérieure à celle des électrodes, dans le cas où technologiquement, par exemple, on ne puisse atteindre une hauteur suffisante pour permettre le passage de cellules dans le canal. On pourra alors déposer une couche supplémentaire de quelques micromètres afin de surélever le capot du canal et permettre ainsi le bon écoulement des cellules (figure 4.7-a).

Avec la première géométrie proposée, une simulation par éléments finis permet d'une part de confirmer que le champ est homogène dans toute la structure et d'autre part que la résistance obtenue est bien de 50 Ω , en continu.

Pour la seconde structure, la modélisation FEM a un double intérêt : déterminer la résistance linéique de la structure souhaitée, qui ne peut se faire simplement par le calcul, et visualiser la distribution du champ électrique à l'intérieur du canal, qui n'est pas homogène. La figure 4.8 montre la distribution du champ électrique dans le canal (lignes de champ).

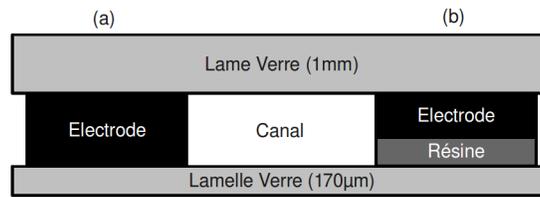


FIG. 4.7 : *Modèle géométrique du microsystème : (a) dans le cas où les électrodes ont la même hauteur que le canal et (b) dans le cas où les électrodes sont plus petites que la hauteur du canal. Pour le calcul par FEM, les électrodes sont considérées comme un métal conducteur, le verre a une conductivité de 10^{-14} S/m, la résine de 10^{-10} S/m et le milieu de 1 S/m.*

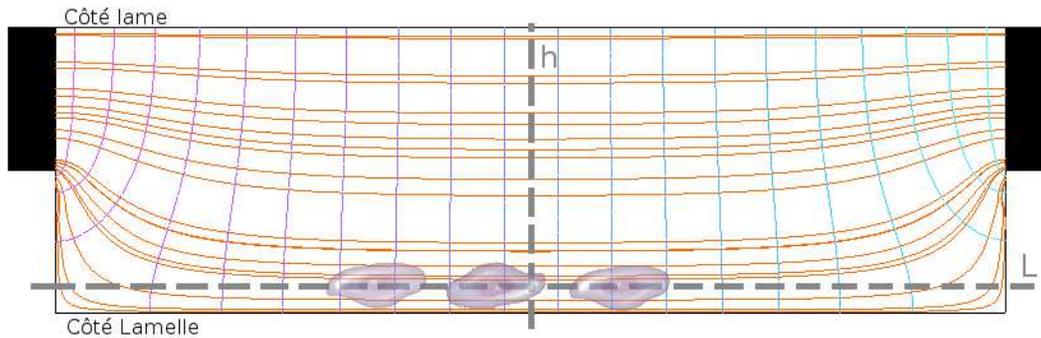


FIG. 4.8 : *Simulation par éléments finis de la seconde structure proposée dans la figure précédente (électrodes, représentées en noir, de $30\ \mu\text{m}$ de hauteur pour un canal d'une hauteur totale de $60\ \mu\text{m}$). Les lignes de champ (orange) ainsi que les courbes d'isopotential (bleu) sont représentées. Le canal a une largeur de $200\ \mu\text{m}$.*

Cette simulation permet de déterminer la résistance linéique du milieu et ainsi de calculer la longueur totale que doit avoir le canal. Dans ces conditions, on obtient une longueur de 4,3 cm pour obtenir une résistance de $50\ \Omega$. On peut aussi noter que les lignes de champ ne sont pas réparties équitablement sur toute la hauteur, signifiant que le champ électrique n'est pas homogène dans tout le volume de milieu. Cette conclusion était prévisible compte tenu de la géométrie proposée. De plus, pour la même amplitude de tension appliquée sur les électrodes, on obtient dans cette géométrie un maximum de champ électrique de 89 % de la valeur maximale atteignable dans une structure du premier type.

Connaître la différence en terme de champ électrique que verrait une cellule se présentant au centre du canal par rapport à une autre positionnée en bordure du canal permet aussi de savoir si la géométrie proposée est envisageable ou non par rapport à l'étude envisagée par la suite. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'intensité du champ électrique selon les droites h et L représentées sur la figure 4.8. On obtient alors une différence de 2 % entre une extrémité et l'autre dans le sens de la hauteur (h) et de 5 % entre le centre du canal et un point à $50\ \mu\text{m}$ sur la gauche ou sur la droite par rapport au centre dans le sens de la largeur (L).

4.3.4.2. Modélisation par différences finies dans le domaine temporel

Une autre approche permet de tenir compte de l'aspect temporel des impulsions. En effet, jusqu'à présent, nous n'avons obtenu que des résultats statiques ou quasi-statiques. Des simulations par différences finies (FDTD) ont été réalisées par l'équipe de Philippe Lévêque de XLim à Limoges, dans le cadre de l'ANR Nanopulsebiochip. Cette simulation, prenant en compte la première géométrie proposée précédemment pour le canal, a été réalisée dans le but de valider cette dernière par l'utilisation d'outils de modélisation plus adaptés au monde des hautes fréquences.

La figure 4.9 montre la partie réelle de l'impédance complexe du microdispositif proposé, calculée par cette méthode à différences finies, en fonction de la fréquence. On peut noter que l'impédance diminue en fonction de la fréquence, mais qu'elle conserve une valeur de 50Ω jusqu'à une centaine de mégahertz. La partie imaginaire est nulle (ou quasi-nulle) pour cette plage de fréquence puis augmente par la suite, la partie capacitive du système prenant alors le dessus sur la partie résistive. Ce changement de comportement est essentiellement dû aux caractéristiques électriques intrinsèques du milieu utilisé (ici du S-MEM - conductivité de 1 S/m et permittivité relative de 80) comme déjà discuté dans la section 4.2.1.

Les résultats d'une simulation temporelle basée sur l'application d'une impulsion électrique de 10 ns de durée (temps de montée et de descente de 1 ns) sur ce même milieu, à l'aide du microdispositif proposé, sont présentés en figure 4.10. La tension dans le canal est calculée et représentée en fonction du temps et de la position dans le canal (selon sa longueur).

4.3.5. Masque pour les électrodes

A partir de cette étude, il est alors possible de définir les différentes géométries pour obtenir un microsystème comportant un canal entouré d'électrodes épaisses permettant de satisfaire l'ensemble des paramètres et contraintes développés dans ce chapitre. Le transfert de ces géométries sur le substrat sera réalisé par photolithographie, incluant l'utilisation de résines photosensibles (voir chapitre 5 sur le développement des microsystèmes). Cette étape nécessite l'utilisation d'un ou plusieurs masques, selon la complexité du système, à une résolution de quelques micromètres. Dans notre cas, un seul niveau de masquage est requis. Mais lorsqu'il est nécessaire de produire des géométries sur plusieurs épaisseurs de résine ou autre matériau photosensible, des motifs spécifiques d'alignement doivent être rajoutés afin de pouvoir les positionner les uns par rapport aux autres.

Deux types de masques peuvent être utilisés, selon la qualité et la résolution des motifs souhaitées. Dans le cas de la réalisation de premiers essais ou de prototypes de biopuce, ou/et si une faible résolution n'est pas nécessaire (au-dessus de la dizaine de micromètres), des masques en plastique suffisent. Ces derniers sont dessinés à l'aide du logiciel Adobe® Illustrator®. La figure 4.11 montre le masque utilisé pour réaliser les microdispositifs qui ont permis d'obtenir les résultats présentés dans le chapitre 8.

Pour obtenir une meilleure stabilité du masque et une meilleure résolution, il est indispensable de

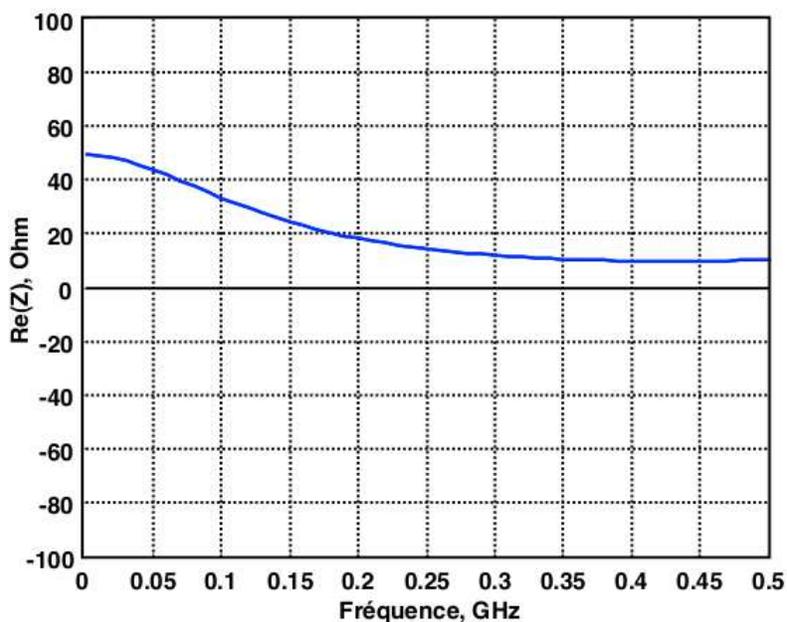


FIG. 4.9 : Impédance calculée par FDTD de la géométrie proposée pour le microdispositif. Le canal est rempli d'un milieu ayant une conductivité de 1 S/m et une permittivité relative de 80.

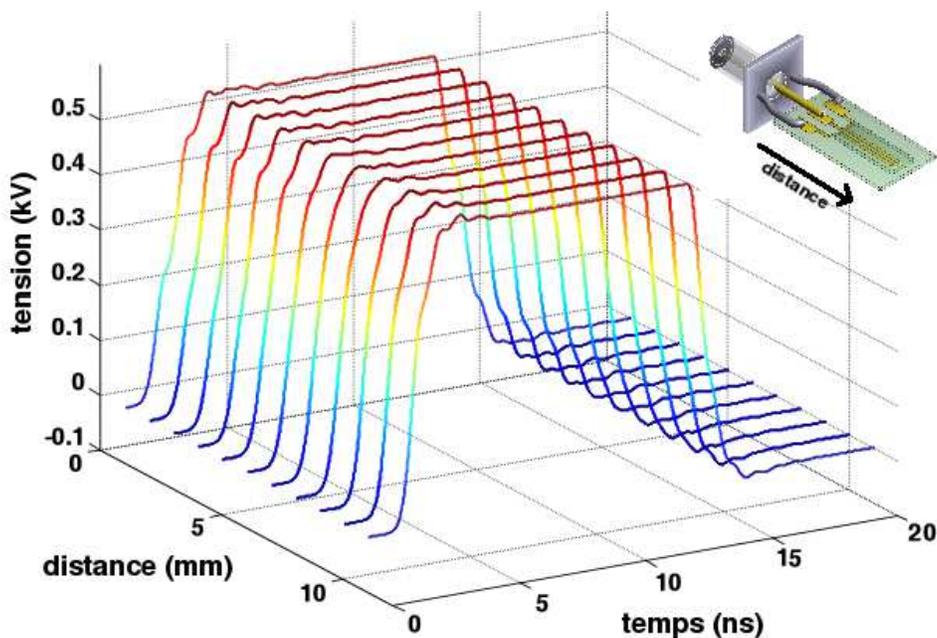


FIG. 4.10 : Simulation par FDTD de l'application d'une impulsion de 10 ns, avec des fronts de montée et de descente de 3 ns, sur la géométrie proposée pour le microdispositif. Le canal est rempli d'un milieu ayant une conductivité de 1 S/m et une permittivité relative de 80. Les différentes courbes représentent la tension à diverses positions dans le canal en fonction du temps. En haut à droite : le modèle 3D utilisé pour la simulation (discrétisation spatiale de 0.2 mm pour la partie électrique et 0.05 mm pour la solution). Simulation réalisée par l'équipe de Philippe Lévêque, XLim, Limoges, France.

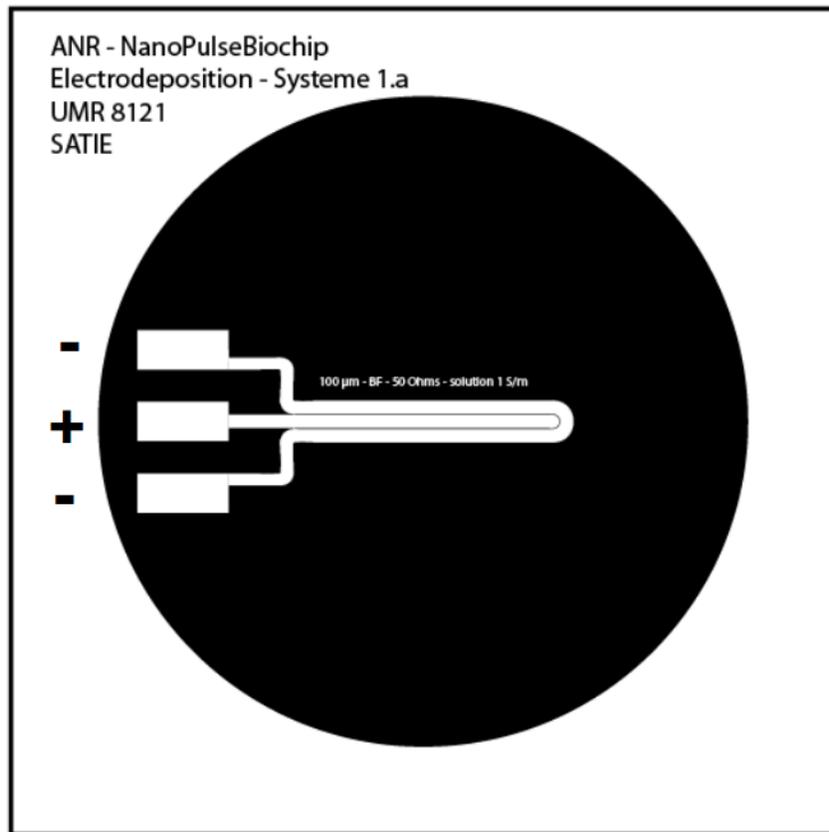


FIG. 4.11 : *Masque pour la réalisation d'un microdispositif à électrodes épaisses. Le canal a une longueur totale de 4 cm et un espace inter-électrodes de 100 μm . L'impédance de 50 Ω est calculée pour une hauteur de 50 μm .*

passer à l'utilisation de masques au chrome. Ceux-ci ont une longévité plus longue grâce à la possibilité de les nettoyer à l'aide de solvants ou d'un plasma à oxygène, contrairement aux masques plastique qui perdent en opacité. Des résolutions inférieures à 0,25 micromètre peuvent être atteintes. Le principal inconvénient est toutefois leur coût, entre 30 et 60 fois le prix d'un masque plastique. Ils sont donc réservés à une utilisation de routine, une fois que l'ensemble des géométries est clairement défini et validé. Ce type de masques est dessiné sous le logiciel Tanner EDA[®] L-Edit Pro[®].

Le dispositif présenté en figure 4.12 (longueur du canal de 3,3 cm, largeur de 100 μm , hauteur de 30 μm) a une impédance de 50 Ω en basse fréquence lorsqu'il est rempli d'un milieu ayant une conductivité de 1 S/m. Il permet en plus d'être relié d'un côté au générateur d'impulsions et à une charge de 50 Ω de l'autre côté, dans le cas par exemple d'un système isolé. Dans ce cas là, l'onde transitera le long de la micro-ligne de transmission pour ensuite s'évanouir dans la résistance de charge finale. Les électrodes ont aussi la particularité d'être découpées en plusieurs petits motifs d'une cinquantaine de micromètres dans le but d'améliorer le profil de déposition du cuivre par la suite.

Les étapes de réalisation sont décrites dans la prochaine partie de cette thèse.

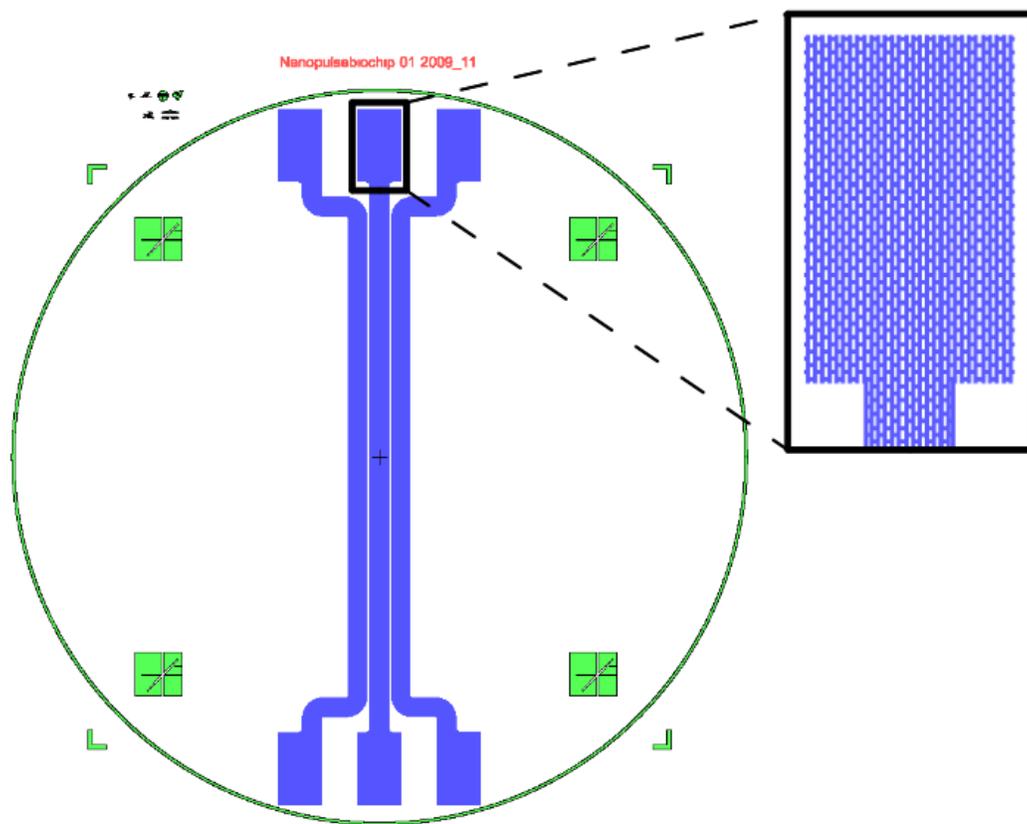


FIG. 4.12 : Masque pour la réalisation d'un microdispositif à électrodes découpées. Le canal a une longueur totale de 3,3 cm et un espace inter-électrodes de 100 μm . L'impédance de 50 Ω est calculée pour une hauteur de 30 μm .

PARTIE III

MATÉRIELS, MÉTHODES ET PROCÉDÉS DE FABRICATION

MICROSYSTEMES SUR VERRE

Le développement de microsystemes nécessite l'utilisation et la maîtrise d'un certains nombres de techniques de fabrication adaptées de la micro-électronique. Chaque application, en particulier dans le monde des biotechnologies, a son propre procédé de fabrication défini à partir des contraintes que ce microsysteme doit respecter. Nous allons voir à travers ce chapitre les différentes étapes de la fabrication des biopuces dont nous avons déjà discuté dans les précédentes sections. Mais avant de nous lancer dans la description de ces procédés, voyons tout d'abord les différents types de substrats et de résines qui s'offrent à nous pour le développement de tels systemes (déjà brièvement introduits dans la section [2.1.3](#)).

5.1. Résines et substrats

Le développement de microsystèmes passe généralement par l'utilisation de matériaux à la fois facilement "usinables" et permettant d'obtenir des résolutions très faibles (quelques micromètres ou moins). Les résines photosensibles se polymérisent par exposition à des rayonnements ultraviolets (cas des résines positives) ou subissent une transformation chimique (cas des résines négatives) permettant ainsi de rendre soluble à un produit révélateur certaines zones. La résolution de ces méthodes de photolithographie dépend alors de la résolution des masques qui seront utilisés pour décrire les motifs souhaités.

Différents types de résines existent ayant des viscosités et des propriétés chimiques particulières et permettant ainsi de déposer des épaisseurs pouvant aller de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres. On peut notamment citer la SU-8 2000 et 3000 (MicroChem), résine négative qui permet d'atteindre des épaisseurs de 2 à 250 μm selon le type utilisé et les paramètres d'enrésinement choisis ou bien encore la AZ4562 (AZ-Electronic Materials), résine positive qui permet d'obtenir des épaisseurs comprises entre 10 et 50 μm .

Selon les substrats et les différentes étapes du développement d'un microsystème, il sera bon de définir les résines à utiliser. En effet, certains types de résines sont connus pour leur faible adhésion sur certains matériaux ou substrats (par exemple la SU-8 2000 sur le verre).

Pour notre utilisation, des substrats en silice fondue (ou en verre) ont été choisis principalement pour leur transparence optique, qui permet de visualiser facilement et directement sous microscope. Le deuxième intérêt vient de leur comportement chimique totalement inerte, rendant le verre totalement biocompatible.

Avant toute utilisation de tels substrats, il est indispensable de réaliser une étape de nettoyage dans divers bains, afin de rendre les surfaces totalement propres de tout élément organique qui pourrait interagir avec les étapes suivantes de la fabrication. Dans le cas du verre (ou de la silice fondue), deux types de bains sont utilisés successivement :

- une première série de bains de solvants : acétone (avec des ultrasons), éthanol (à 99 %) et eau désionisée (avec de l'azote gazeux) ; chacun des bains durant 3 min.
- un bain d'acide dans une solution dite piranha (mélange de H_2SO_4 et de H_2O_2 , dans un rapport 3~5 :1) pendant 5 min, suivi d'un bain dans de l'eau dé-ionisée (avec de l'azote gazeux).

Cette seconde étape permet d'augmenter l'adhésion entre le substrat et la première couche d'accroche ou la résine photosensible que l'on pourrait déposer, par ajout de groupements OH à sa surface.

5.2. Biopuce pour la visualisation en temps réel

Pour l'application décrite dans le chapitre 4, les contraintes liées au système de visualisation en temps réel, utilisant un microscope à transmission DRASC, imposent l'utilisation d'un substrat transparent. Mais ce seul critère ne suffit pas à définir l'ensemble des étapes de fabrication, il limite seulement l'utilisation d'un certain type de matériaux dont les propriétés d'adhésion sur le verre (ou équivalent) sont connues pour être médiocres ou nécessiter des techniques complexes (SU-8 par exemple) (Yu *et al.*, 2006; Chen et Lee, 2007). Le choix limité de la résine pour la fabrication du moule de croissance des électrodes par électrodéposition entraîne une limitation dans la hauteur maximale de ce moule et donc de la hauteur maximale des électrodes.

5.2.1. Micromoulage et dépôt électrolytique de cuivre

L'électrodéposition de cuivre est une technique basée sur la réaction électrochimique (échange d'électrons) entre des ions présents dans une solution électrolytique et la surface d'une couche métallique. La CTU d'Orsay (MINERVE) est une centrale technologique mettant à disposition des équipements de salle blanche pour des groupes de recherche dans le domaine des microtechnologies. En relation avec le département MINASYS de l'IRF, un équipement pour le dépôt électrolytique du cuivre est proposé. L'équipe BioMIS du SATIE dispose aussi depuis peu d'un banc permettant l'électrodéposition de l'or (Claire Dalmay). Dans ce manuscrit, seule l'électrodéposition de cuivre est développée car c'est la technique qui a été principalement utilisée.

Les précédents procédés autour du cuivre, mis en place par l'équipe MINASYS de l'IEF dans le cadre de la réalisation de microbobines (Quemper *et al.*, 2000), ont été utilisés pour le dépôt de couche de cuivre d'une épaisseur inférieure à 50 μm . Plus récemment, Guillaume Mottet, dans le cadre de sa thèse, a développé un procédé permettant d'obtenir des épaisseurs d'électrodes de 15 à 20 μm basé sur un procédé de fabrication dérivé du précédent (Mottet, 2009; Mottet *et al.*, 2010).

Dans le cadre de notre application, nous souhaitons obtenir des électrodes dont la hauteur est supérieure au diamètre des cellules qui seront traitées. Ces cellules ont des diamètres compris entre 10 et 20 μm . Le procédé de fabrication, repris de Woytasik *et al.* (2006), est présenté dans la figure 5.1. Les différentes étapes seront détaillées par la suite.

5.2.1.1. Couche d'accroche

La première étape du développement d'un microsystème à électrodes épaisses, après le nettoyage des substrats, est basée sur un dépôt fin d'une couche d'accroche conductrice dont la nature des matériaux utilisés varie en fonction du substrat et du type de métal à déposer. Dans le cas d'un substrat en verre (ou silice fondue), la première couche est du titane (Ti). Entre 5 et 10 nm de titane sont déposés par pulvérisation cathodique. Cette couche a deux rôles : (i) augmenter l'adhésion du cuivre sur le verre et

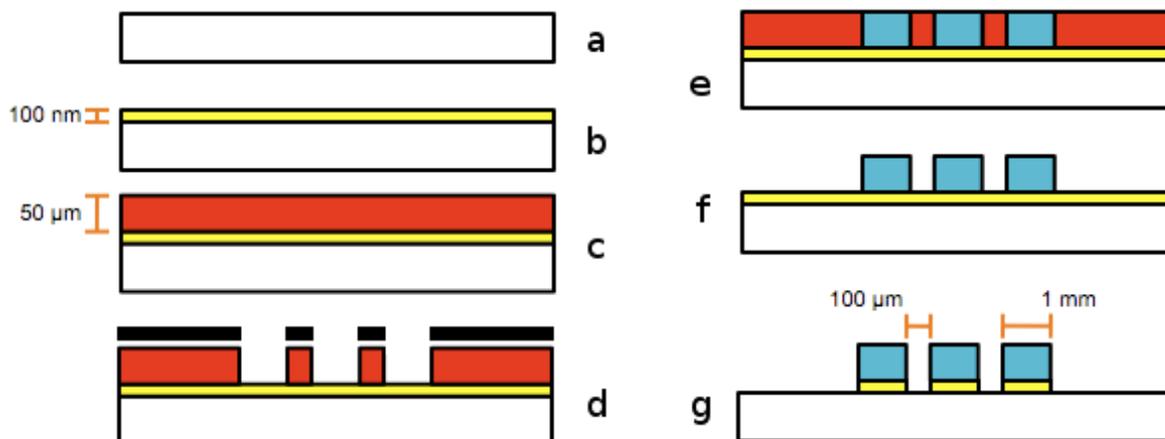


FIG. 5.1 : Procédé de fabrication d'électrodes épaisses par électrodéposition repris de *Woytasik et al. (2006)*. En blanc : verre, en jaune : couche d'accroche (titane/cuivre), en rouge : résine photosensible, en bleu : cuivre, en noir : masque en chrome. A partir d'un substrat de verre nettoyé (ou silice fondue) (a), on vient déposer une première couche d'accroche (b). (c) Une couche de 30 à 50 µm d'épaisseur de résine photosensible est ensuite déposée, (d) puis insolée à l'aide d'un masque en chrome définissant la géométrie des électrodes (ici un canal de 100 µm et des électrodes de 1 mm de largeur). (e) L'ensemble est ensuite plongé dans un bain électrolytique au sulfate commercial (Shipley), pour déposer entre 15 et 50 µm de cuivre. (f) La résine est ensuite dissoute dans l'acétone et (g) la couche d'accroche est attaquée chimiquement pour supprimer les liens électriques existant entre les différentes électrodes.

(ii) empêcher la diffusion du cuivre dans le verre, et ainsi éviter toute perte de courant dans ce matériau.

Ensuite une couche de cuivre d'environ 100 nm est déposée par le même procédé. Cette couche de cuivre permet d'amorcer le dépôt électrolytique dans les étapes suivantes de la fabrication en permettant le passage du courant. Les paramètres de pulvérisation sont donnés dans le tableau 5.1. Deux paramètres sont essentiels pour la répétabilité du dépôt : la pression de travail du gaz utilisé durant la pulvérisation et le courant injecté dans la cathode, définissant la vitesse de dépôt et contrôlé par mesure de la tension sur cette cathode.

TAB. 5.1 : Paramètres pour la pulvérisation cathodique de la couche d'accroche (Ti/Cu).

Cathode	Courant injecté	Temps de pré-pulvérisation	Temps de pulvérisation	Débit Argon	Pression de travail
Ti	200 mA	600 s	200 s	35 ccm	7,8 µbar
Cu	400 mA	120 s	200 s	35 ccm	7,8 µbar

Après cette étape, l'ensemble du substrat est recouvert d'une couche de cuivre, rendant alors la totalité de sa surface fonctionnelle d'un point de vue croissance électrolytique.

5.2.1.2. Moule de croissance

Pour la réalisation de microcanaux entourés d'électrodes pour l'application de champs électriques sur des objets divers, le cuivre ne doit pas croître sur l'ensemble de la surface du substrat, mais une géométrie particulière doit être appliquée. Pour cela, il est nécessaire de rendre isolante certaines parties du substrat. L'idée retenue est l'utilisation d'une résine photosensible permettant d'obtenir la topologie souhaitée à l'aide d'un masque par lithographie.

L'utilisation d'un moule dans une telle résine permet aussi, selon la hauteur déposée, de garantir des flancs relativement plans et perpendiculaires à la surface du substrat. Il faudra veiller à obtenir des épaisseurs de moule en résine supérieures à la hauteur souhaitée pour les électrodes.

La résine AZ4562 est une résine photosensible positive, c'est à dire que les parties exposées aux rayonnements ultraviolets deviennent solubles dans le révélateur ou développeur. L'enrésinement se fait à 2.000 tr/min pendant 5 s pour une épaisseur d'environ 30 μm et à 500 tr/min pendant 10 s suivi d'une étape à 1.000 tr/min pendant 6 s pour 40 μm . Une étape de recuit à 90 °C pendant 1 h, commençant à température ambiante pour éviter tout choc thermique, est indispensable. Les substrats ainsi traités doivent ensuite être réhydratés durant au moins 2 h en les laissant à température ambiante. L'effet de bord qui apparaît après l'enrésinement est supprimé afin de garantir un contact entre le masque et le substrat.

Une dose de 300 mJ/cm^2 à une longueur d'onde de 365 nm est ensuite appliquée sur l'échantillon à travers un masque, comme défini dans la section 4.3.5 et montré dans la figure 5.1. Une étape de développement est ensuite nécessaire pour retirer la résine exposée aux ultraviolets. Cette étape consiste en une succession de deux bains de l'échantillon dans une solution diluée d'AZ400k (1 volume pour 4 volumes d'eau désionisée) pendant 2 min chacun. L'échantillon est enfin rincé à l'eau désionisée et séché à l'azote.

5.2.1.3. Dépôt électrolytique de cuivre

Avant de plonger l'échantillon dans la solution électrolytique, il est nécessaire de couvrir à nouveau le bord du substrat afin de limiter la surface de dépôt au motif utile. Ce pré-traitement permet de mieux contrôler la densité de courant à appliquer lors du dépôt et ainsi garantir une meilleure déposition. Cette étape se fait à l'aide d'une résine photosensible : la S1805 (Shipley). Un recuit de 5 à 10 min à 65 °C est ensuite réalisé avant que l'échantillon soit totalement prêt.

Le contact électrique sur l'échantillon se fait à l'aide d'une pince crocodile permettant aussi son maintien à bonne distance et à bonne hauteur dans le bain électrolytique. Ce dernier est un mélange d'une solution de cuivre (Electroposit Stater Solution, Shipley) ($\text{pH} < 1$) et d'un additif organique (Electroposit 270, Shipley) (5 ml pour 2 l de solution initiale). Celui-ci permet d'obtenir un meilleur état de surface et une meilleure résistance à l'usure. Un schéma de principe de l'électrodéposition est donné en figure 5.2.

L'électrodéposition est réalisée à température ambiante. Une densité de courant de 30 mA/cm^2 est appliquée entre l'échantillon (substrat de 5,08 cm de diamètre), qui sert de cathode, et un bloc de cuivre

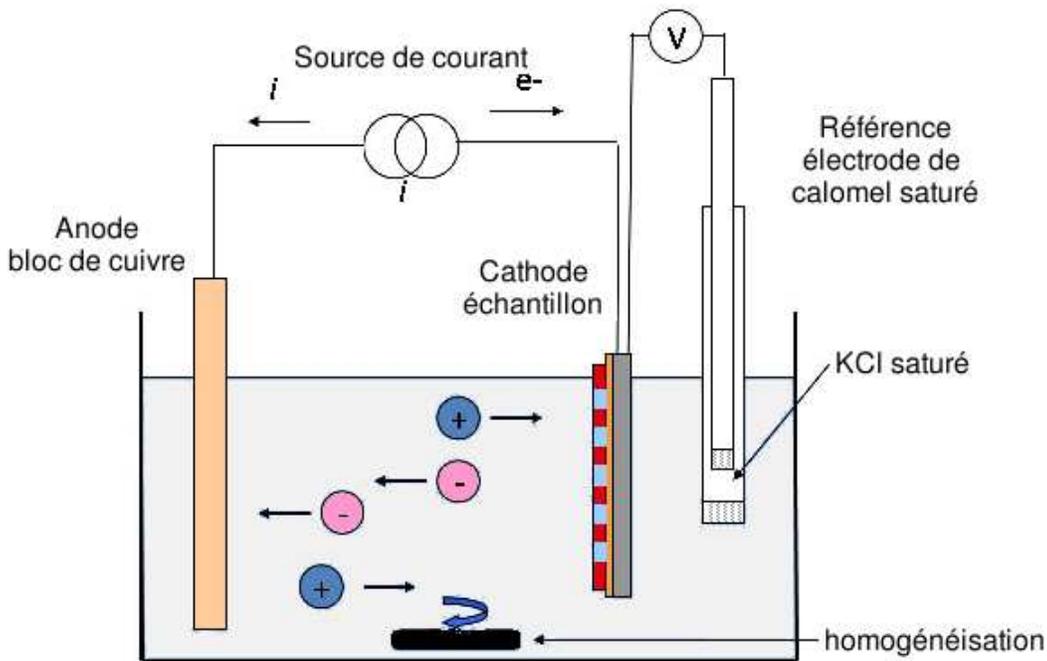


FIG. 5.2 : Système utilisé pour l'électrodéposition, basé sur le principe de l'électrolyse. Une source de courant délivre un courant continu entre la cathode, l'échantillon, et l'anode, une contre-électrode en cuivre. Le potentiel est contrôlé par rapport à une électrode de référence au calomel. La solution est homogénéisée tout au long du dépôt.

($6 \times 8 \times 0,5 \text{ cm}^3$), qui sert d'anode et de réserve à cuivre. Ces deux éléments sont séparés d'environ 15 cm et doivent être maintenus parfaitement parallèles durant tout le procédé. Dans ces conditions, la vitesse de dépôt est de l'ordre de $0,8 \mu\text{m}$ par minute.

5.2.1.4. Suppression de la résine et de la couche d'accroche

Une fois la croissance électrolytique terminée, il est ensuite nécessaire de retirer d'une part la résine et d'autre part le contact électrique existant entre chacune des électrodes par l'intermédiaire de la couche d'accroche.

De l'acétone et de l'éthanol sont utilisés pour dissoudre la résine photosensible AZ4562 (ainsi que la résine S1805 sur les bords). Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau désionisée avant d'attaquer chimiquement les fines couches de cuivre et de titane. L'échantillon est plongé 3 à 5 s dans une solution commerciale de Cr-etch-1 afin de graver la fine couche de cuivre déposée par pulvérisation cathodique puis dans un bain d'acide fluorhydrique (HF) pendant 1 min pour le titane.

La figure 5.3, réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage, montre le résultat final après toutes les étapes décrites ci-dessus. Il s'agit d'un système à deux électrodes d'environ $30 \mu\text{m}$ déposées dans des moules d'une épaisseur quasi-identique. La vitesse de croissance n'étant pas totalement uniforme sur l'ensemble du substrat, il peut arriver qu'à certains endroits les électrodes débordent du moule

de croissance (comme c'est le cas dans la figure 5.3). Une meilleure homogénéité de croissance sera cependant requise pour les étapes décrites par la suite consistant à refermer les micro-canaux.

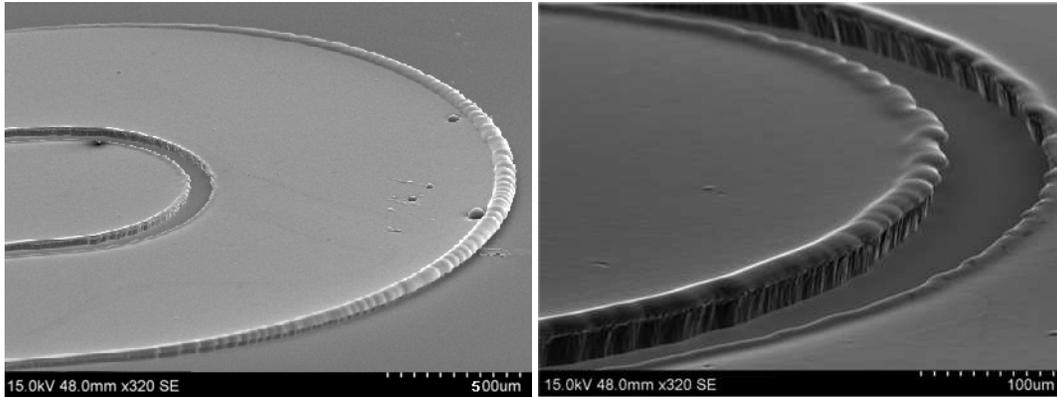


FIG. 5.3 : *Electrodes épaisses (30 μm d'épaisseur) de cuivre réalisées par dépôt électrolytique. On peut voir le débordement de la croissance électrolytique en dehors du moule sur les bords des deux électrodes.*

5.2.2. Amélioration du profil de dépôt

Dans la version initiale de ce procédé, il a été observé, à l'aide d'un profilomètre Dektak 8 (Veeco Instruments, Plainview, NY, USA), que le profil de dépôt du cuivre sur l'ensemble de l'échantillon n'était pas homogène (voir figure 5.4).

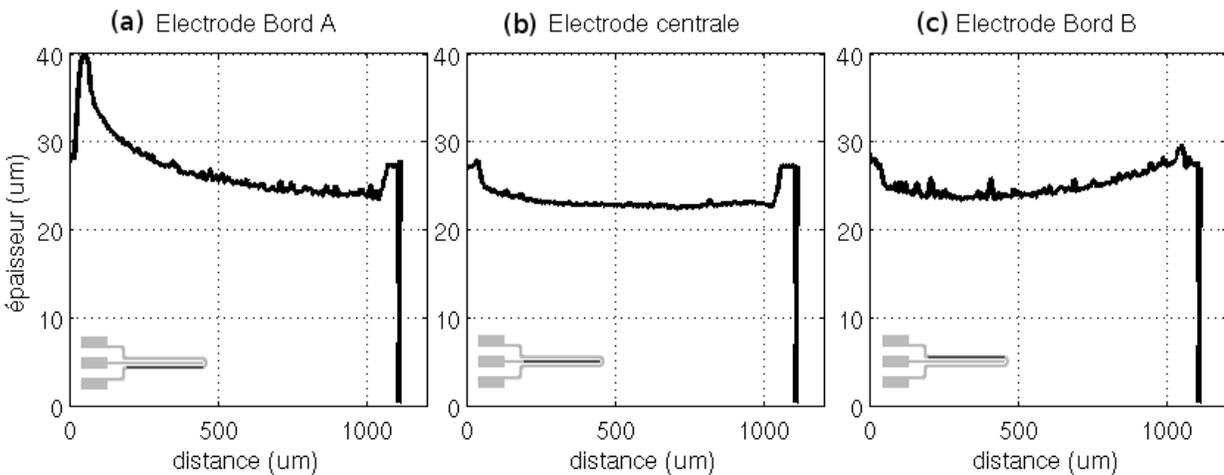


FIG. 5.4 : *Profil de dépôt de cuivre pour une épaisseur souhaitée de 25 μm .*

Une possible explication provient de la non uniformité du champ électrique, paramètre important pour un dépôt homogène par ce procédé, due à la présence de résine isolante sur la face conductrice de l'échantillon (voir figure 5.5).

Un autre facteur de perturbation du dépôt provient d'un défaut d'homogénéisation de la solution électrolytique. Ce mélange permanent de la solution obtenu à l'aide d'un agitateur magnétique au cours

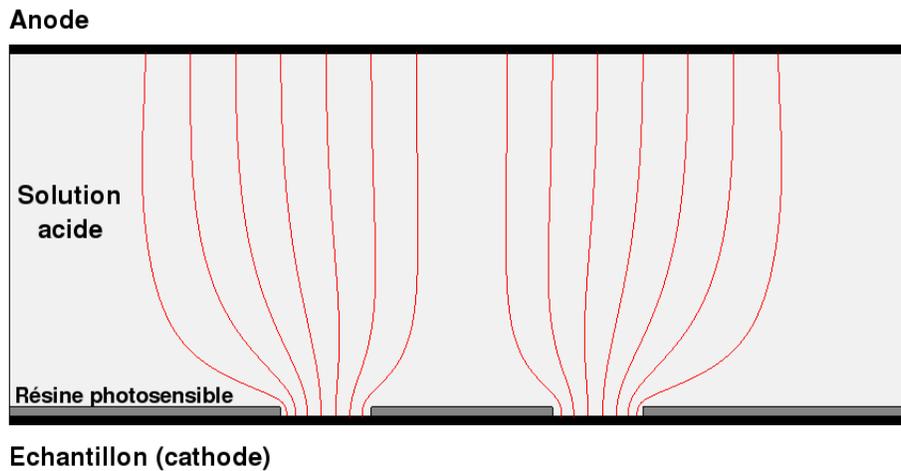


FIG. 5.5 : Lignes de champ électrique associées au procédé utilisé d'électrodéposition de cuivre sur un substrat en présence d'une couche isolante de résine photosensible.

du procédé de déposition est indispensable car il permet d'amener de manière continue des ions au contact de la surface métallique où la croissance a lieu et ainsi garantir un meilleur état de surface.

Nous nous sommes alors intéressés à plusieurs solutions pour remédier à ce problème ayant des répercussions sur la fermeture du canal et la technique à utiliser.

5.2.2.1. Rotation du substrat et dépôt multi-couches

Dans un premier temps, nous avons voulu voir si cette hétérogénéité de dépôt était dépendante du sens dans lequel l'échantillon était positionné dans le bain. Un premier dépôt de cuivre a été réalisé pendant 1.200 s, permettant d'atteindre une épaisseur moyenne de $13 \mu\text{m}$, puis le substrat a subi un demi-tour avant d'être replongé dans le bain électrolytique pour une seconde croissance pendant à nouveau 1.200 s, dans les mêmes conditions de dépôt. Nous avons alors observé le profil de la première et de la seconde couche déposées (figure 5.6).

On peut noter que la seconde couche déposée garde un profil quasi-identique à la première couche. L'inversion de la prise de contact dans le bain ne semble donc pas suffire à améliorer le profil. Une différence de 60 % de la hauteur minimale obtenue entre un bord et l'autre d'une des électrodes extérieures a ainsi été relevée, alors qu'une différence de seulement 15 % a été mesurée sur l'électrode centrale.

5.2.2.2. Motif leurre

Une nouvelle idée, basée sur les observations précédentes, a été de rajouter un motif supplémentaire autour de la partie utile du système afin de déporter les pics de matière électrodéposée loin de ce dernier. En effet, les effets de pointe semblent plus marqués à l'extrémité des zones électrodéposées. Nous avons donc rajouté un élément suffisamment proche du motif initial pour éviter l'apparition de surplus de matière sur la zone utile lors de l'électrodéposition mais en laissant suffisamment d'espace autour des

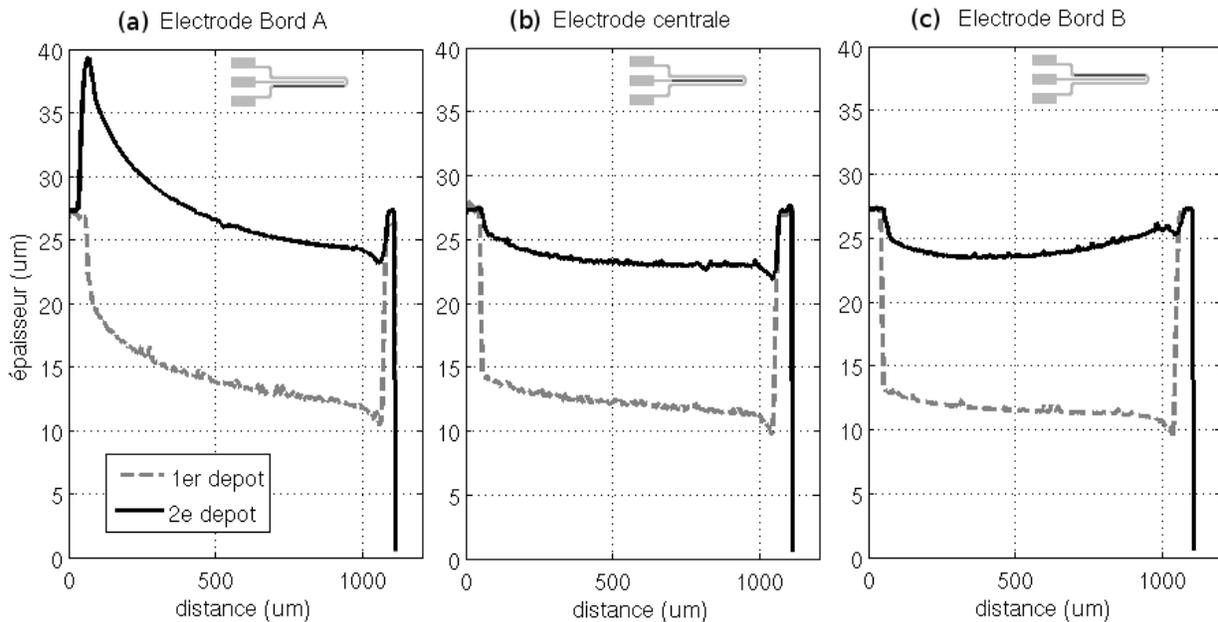


FIG. 5.6 : Profil d'un dépôt électrolytique de cuivre en 2 couches successives après ré-orientation du substrat dans le bain électrolytique. Les 3 électrodes, 2 extérieures (a) et (c) et 1 centrale (b), du motif initial ont été mesurées.

électrodes pour laisser la possibilité de refermer le canal.

Lors de la photolithographie permettant le transfert du motif des électrodes, après la première exposition aux ultraviolets, nous avons exposé à nouveau les mêmes échantillons enrésinés (AZ4562) en déportant le masque et en répercutant ce même motif $500\ \mu\text{m}$ à côté du premier. Nous avons ensuite mesuré puis analysé le profil et obtenu la courbe de la figure 5.7.

Le motif leurre présente une différence de hauteur entre un bord et l'autre de l'électrode la plus extérieure de 100 % de la hauteur minimale relevée ($28\ \mu\text{m}$), alors que les deux autres électrodes ont une différence de 50 %. La hauteur moyenne relevée sur chacune d'entre elles fluctue elle aussi de 29 à $21\ \mu\text{m}$. Concernant le motif utile, une différence de hauteur de 50 % entre un bord et l'autre des électrodes a là encore été observée, montrant que cette solution ne résout en rien le problème d'inhomogénéité de déposition du cuivre.

5.2.2.3. Fragmentation des électrodes

Nous avons fractionné les électrodes en motifs plus fins, l'électrodéposition de petits éléments (quelques dizaines de micromètres carrés) apparaissant être plus homogène (refs). Les électrodes ont ainsi été découpées en fragments de 50 sur $100\ \mu\text{m}$ (voir figure 4.12). Un seul dépôt d'une durée de $1.500\ \text{s}$ a été réalisé et a permis d'obtenir une couche de cuivre d'environ $14\ \mu\text{m}$ d'épaisseur. Le contact électrique a été pris sur l'électrode centrale. La figure 5.8 montre le profil des trois électrodes (a,b et c) mesuré à 2 positions différentes : au centre de l'échantillon et proche d'une des extrémités du canal.

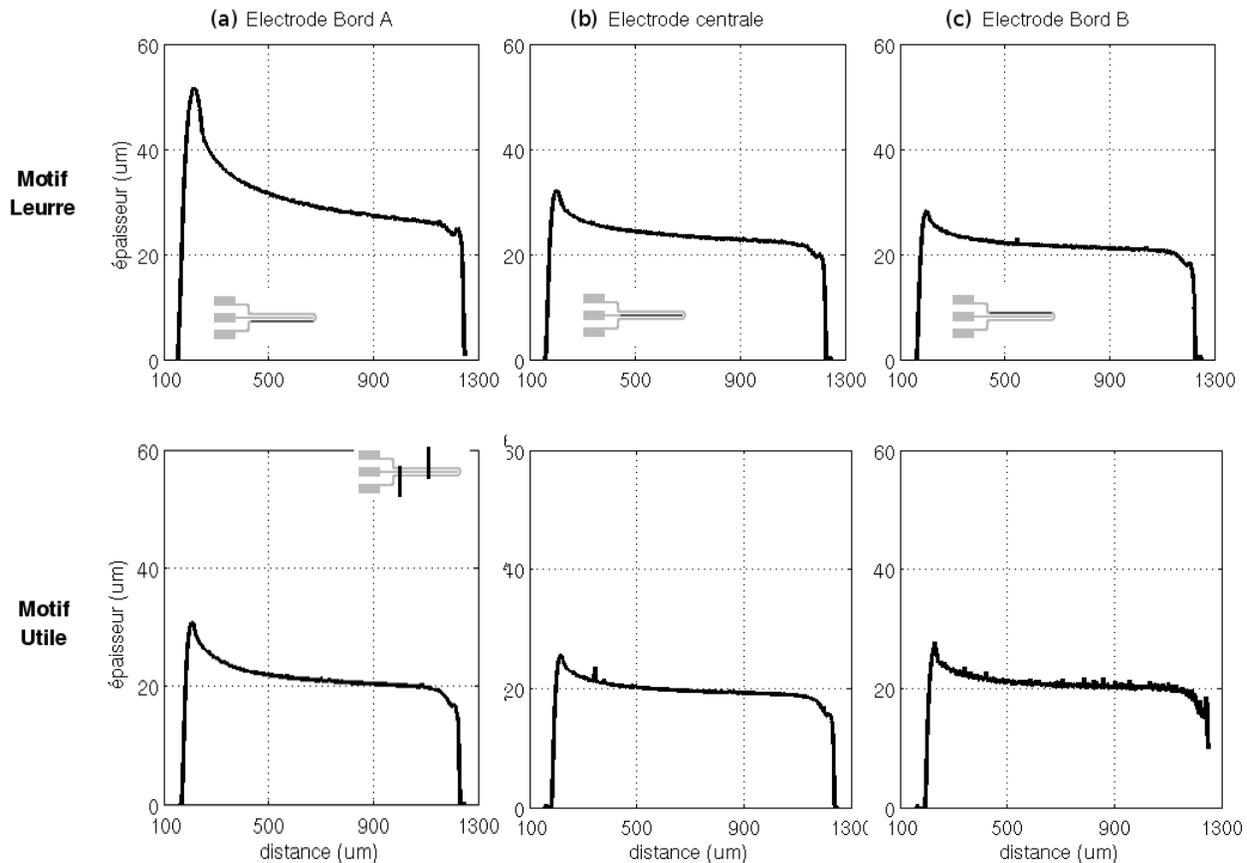


FIG. 5.7 : Profil d'un dépôt électrolytique de cuivre en présence d'un motif leurre (répétition du motif utile espacé de $500\ \mu\text{m}$ par rapport à celui-ci). Les 3 électrodes, 2 extérieures (a) et (c) et 1 centrale (b), du motif initial ont été mesurées.

La mesure au centre de l'échantillon montre une différence de 15 % entre un bord et l'autre du motif mais cette même mesure effectuée à l'extrémité du canal donne une différence de 50 % par rapport à la hauteur minimale relevée ($11\ \mu\text{m}$).

5.2.2.4. Autres solutions

La surface importante sur laquelle s'étend le dessin des canaux et des électrodes semble être le point critique dans le procédé proposé. Afin de s'affranchir de ce problème et permettre une fermeture étanche du canal, d'autres solutions ont été proposées.

Le dépôt pleine plaque, par exemple, permet une meilleure distribution du champ électrique lors de la réaction d'électrolyse. Des essais lors d'un dépôt d'or de $6\ \mu\text{m}$ puis de $20\ \mu\text{m}$ sur un substrat de verre ont permis d'obtenir une rugosité de surface de $0,17\ \mu\text{m}$ et un écart de seulement 6 % entre l'épaisseur déposée au centre et sur le bord du substrat (résultats non présentés). Cette méthode nécessite par la suite une attaque chimique de la couche électrodéposée afin de définir la géométrie des canaux. Elle est aussi plus "gourmande" en quantité de métal à déposer.

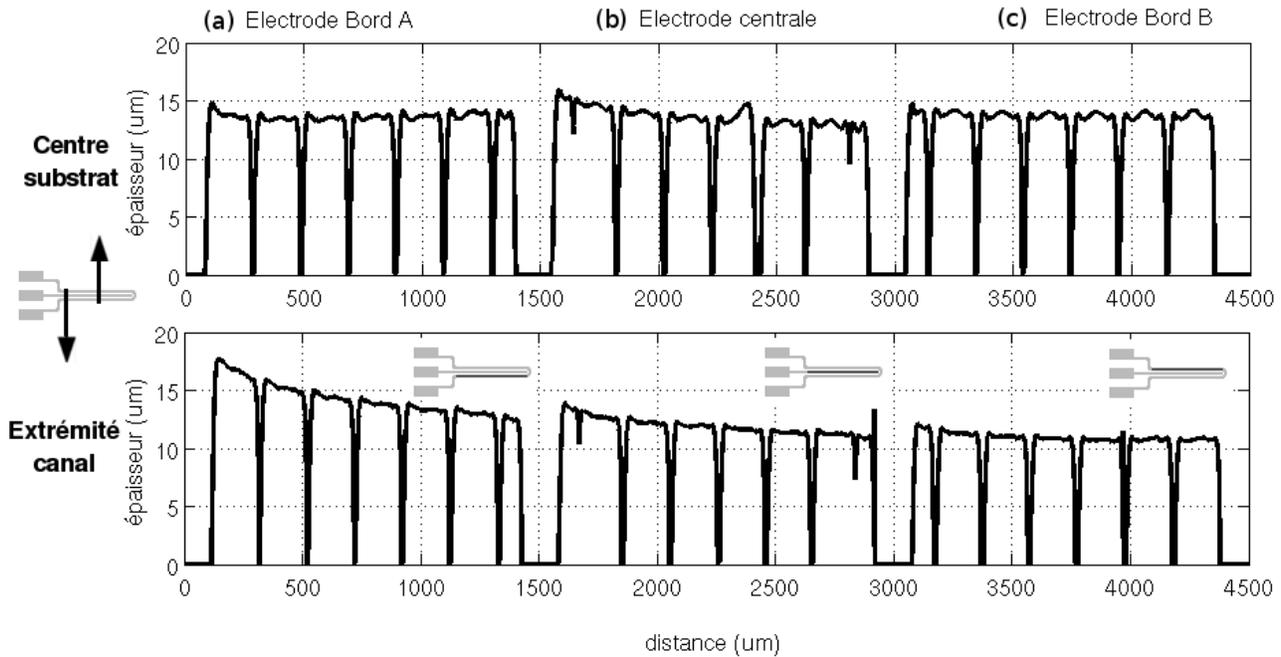


FIG. 5.8 : Profil d'un dépôt électrolytique de cuivre à l'aide d'électrodes fractionnées mesurées : au centre de l'échantillon et proche d'une des extrémités du canal. Les 3 électrodes, 2 extérieures (a) et (c) et 1 centrale (b), du motif initial ont été mesurées.

Une autre technique consiste à utiliser des courants pulsés pour améliorer la qualité des dépôts métalliques. Une impulsion intense mais courte permet de déposer une quantité importante d'ions sur le substrat voulu puis l'application d'une faible intensité inverse sur un temps plus long a un effet de lissage de cette couche par arrachage de certains des ions précédemment déposés. Bien que cette méthode ne semble pas améliorer l'homogénéité du dépôt pour de petits motifs (Quemper *et al.*, 2000), elle a un avantage certains pour de grandes surfaces à déposer, pourvu que le procédé soit maîtrisé.

La dernière solution envisagée permettrait de conserver le procédé actuel de dépôt et d'y rajouter une étape de micro-polissage des électrodes, permettant ainsi d'améliorer l'état de surface et le profil des électrodes. Cette technique n'est cependant pas encore accessible dans les salles blanches de la CTU.

5.2.3. Packaging

La dernière grande étape dans la conception d'une biopuce concerne la fermeture du système et les différentes connexions (électrique et fluide) associées. Il est essentiel de prévoir cette étape lors du développement d'un microsystème car le choix des différents matériaux, substrats ou résines par exemple, peuvent différer selon le mode de fermeture souhaité, ou inversement.

De plus, les fortes contraintes évoquées dans le chapitre 4 limitent le choix de certains éléments. En particulier, la fermeture du canal doit obligatoirement se faire par une épaisseur de verre de $170\ \mu\text{m}$ et la hauteur totale du packaging ne doit pas dépasser 9 mm. Il a aussi été envisagé d'utiliser un support

spécifique pour la biopuce incluant des bras mobiles montés sur des platines piézo-électriques, pour le positionnement de la biopuce sous le microscope (voir figure 4.1).

5.2.3.1. Fermeture du canal

Le choix de la méthode de packaging fluïdique d'un microsysteme est très dépendante du type de substrat utilisé ainsi que des différentes couches qui y ont été déposées. L'environnement dans lequel doit s'insérer la biopuce est aussi source de limitation.

Dans notre cas, deux solutions peuvent être envisagées selon la hauteur obtenue pour les électrodes. Si ces électrodes sont suffisamment épaisses pour garantir le passage de cellule à l'intérieur du canal qu'elles longent, la fermeture du canal peut se faire par une lamelle de verre de microscopie (épaisseur de 170 μm) reposant directement sur celles-ci. Son scellement est ensuite réalisé par dépôt d'une colle photosensible (type NOA) sur la zone extérieure aux électrodes. Après exposition aux ultraviolets, le système est alors fermé.

L'autre possibilité, dans le cas d'électrodes peu épaisses, est de déposer une couche épaisse de résine photosensible dans le but de surélever le haut du canal et ainsi permettre un flux de cellules à l'intérieur. Cette technique nécessite alors un second niveau de masque permettant la photolithographie et l'alignement de cette nouvelle couche structurée en résine. Une dernière étape de scellement par application d'une force verticale, comme présenté dans l'article en annexe 9.8 (page xxxvii), est alors nécessaire.

Une fois cette étape de fermeture terminée, il reste à réaliser les différentes connexions, électrique et fluïdique, permettant à la biopuce d'interagir avec son environnement.

5.2.3.2. Connexion électrique

Afin de limiter au maximum les connexions électriques et surtout les transitions d'un milieu à un autre, et ainsi éviter de déformer le signal généré lors de son transport jusqu'au milieu d'exposition, la liaison entre la biopuce et son support se fait par simple contact sur des pistes en cuivre déposées sur ce dernier, ces pistes ayant des caractéristiques géométriques et électriques calculées pour présenter une impédance caractéristique de 50 Ω . Une bague de serrage permet de garantir la jonction électrique et de maintenir la biopuce en place. On peut noter que la connexion entre le support de la biopuce et les générateurs se fait à l'aide de connecteurs SMA.

Actuellement, ce système d'interface électrique est effectué à l'aide d'un circuit imprimé. Dans un proche avenir, nous envisageons de l'intégrer sur le microscope comme montré sur la figure 5.9.

5.2.3.3. Connexion fluïdique

Pour ce qui est de la connectique fluïdique, le faible encombrement en hauteur imposé par l'environnement du microscope nous a conduit à réfléchir à une solution permettant l'accès par la tranche du système. Cette solution contraint le diamètre maximal que devra avoir la liaison entre la biopuce (ayant un canal d'une cinquantaine de micromètres en hauteur et d'une centaine de micromètres en largeur) et

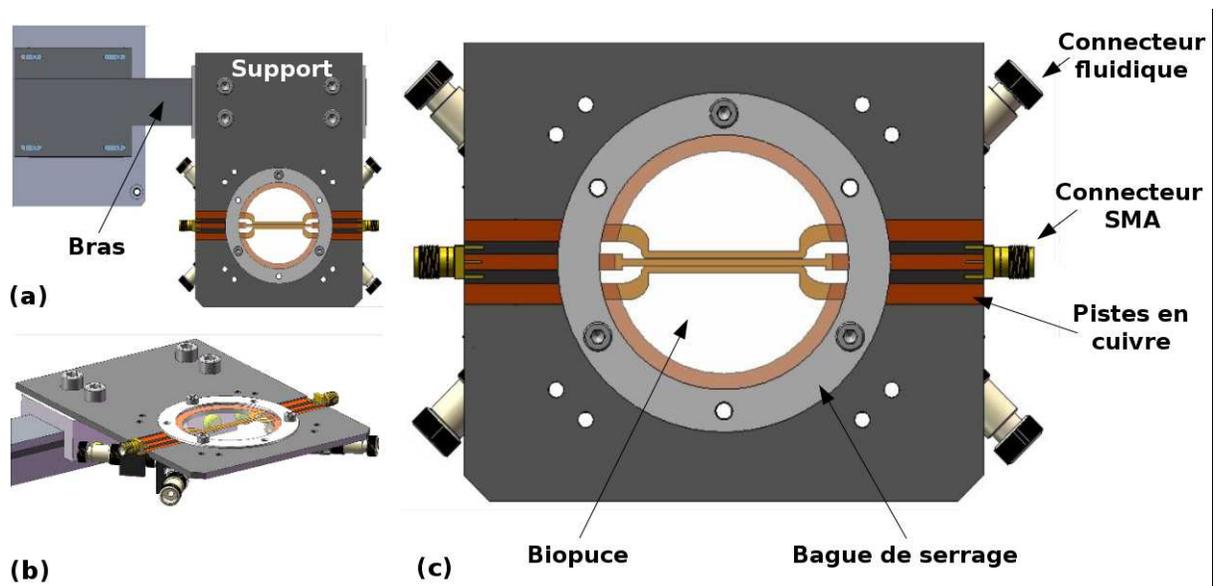


FIG. 5.9 : Support de la biopuce, incluant la connectique fluide et électrique. Vue générale (a) de dessus et (b) en 3D. Vue détaillée du support (c). Adapté de Thomas Schmid, ONERA, département DMPH.

le système de contrôle du flux.

Chiou et Lee (2004) propose une solution utilisant le moulage de cette liaison autour d'un fil fin de quelques dizaines de micromètres de diamètre. La figure 5.10 montre les différentes étapes de la réalisation de cette interface :

- (a) : un capillaire (75 ou 100 μm de diamètre intérieur et 150 ou 175 μm de diamètre extérieur) sert de guide à un fil métallique en acier inoxydable (diamètre de 50 μm) inséré dans le canal (vue de profil) ;
- (b) : du PDMS est ensuite déposé sur l'ensemble, servant à la fois de fermeture latérale du canal et de jonction entre l'intérieur du capillaire et du canal (vue de dessus) ;
- (c) : après 2 h à 75 °C, le PDMS s'est alors réticulé (vue de profil) ;
- (d) : le fil métallique est alors retiré laissant place à une jonction entre le capillaire et le canal (vue de profil).

Le figure 5.11 montre le résultat d'un essai du moulage d'un ensemble capillaire/fil métallique dans du PDMS. De l'éosine (solution fluorescente) a été utilisée pour tester la connectique fluide.

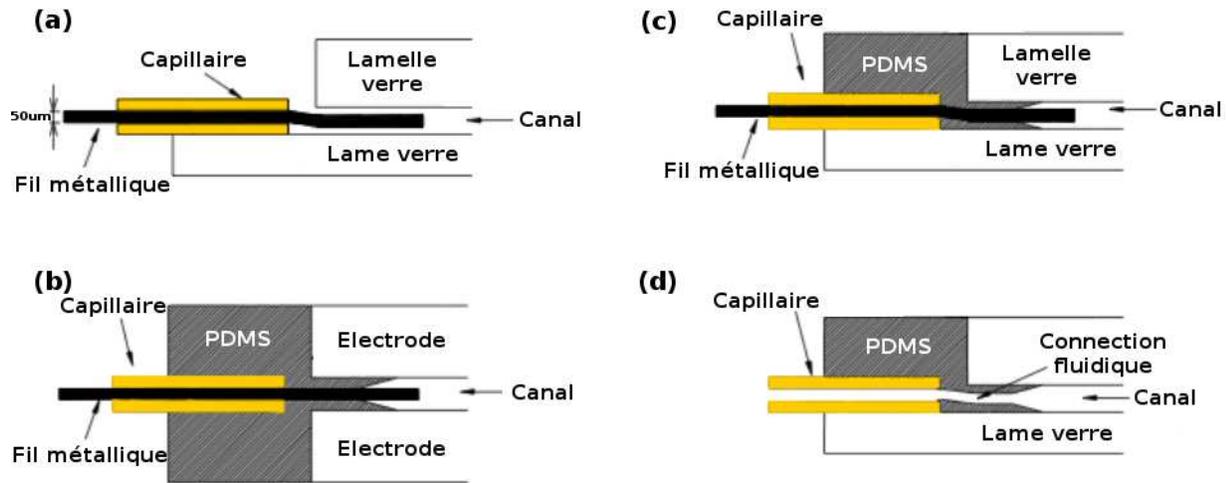


FIG. 5.10 : Connectique fluidique par la tranche d'un microsysteme. Adapté de *Chiou et Lee (2004)*.

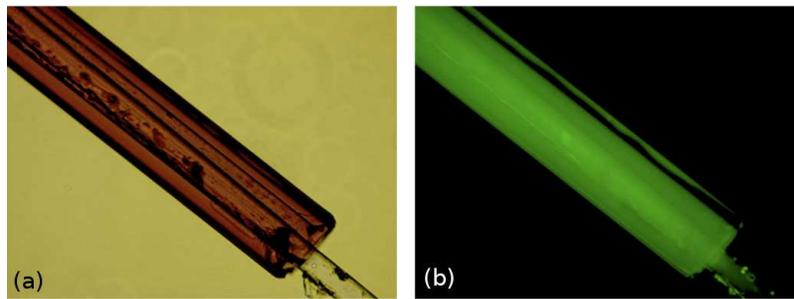


FIG. 5.11 : Test de la connectique fluidique par moulage, en présence d'éosine : (a) en champ clair et (b) par fluorescence.

5.3. Electrodes isolées pour l'*in vitro* et l'*in vivo*

Comme il a été abordé dans le chapitre 3, nous avons évalué la possibilité d'appliquer des impulsions ultra-courtes par le biais d'électrodes isolées électriquement. Dans cette section, nous allons nous intéresser à diverses façons de réaliser cette isolation afin de garantir de la biocompatibilité du système d'exposition.

Deux techniques différentes sont présentées ici. La première est basée sur des techniques classiques de fabrication de microsystemes en PDMS et permet la réalisation d'électrodes isolées et liquides. La seconde méthode proposée consiste en un dépôt par évaporation d'un film polymère, le parylène.

5.3.1. Microsystème à électrodes liquides

5.3.1.1. Description

Le système présenté ici repose sur l'utilisation de microcanaux fluidiques, isolés les uns des autres, permettant ainsi de réaliser des micro-électrodes tridimensionnelles par remplissage d'un liquide conducteur dans ces circuits microfluidiques. La mise en œuvre de ces micro-électrodes liquides permet l'obtention de formes d'électrodes qui ne pourraient pas être obtenues par des voies conventionnelles (usinage mécanique, moulage conventionnel...). Des facteurs de formes importants et des précisions dimensionnelles submicrométriques sont rendus possibles.

Le liquide conducteur utilisé pour réaliser l'électrode est placé à l'intérieur de réservoirs isolants moulés avec une grande précision en utilisant des techniques classiques en micro-technologie. Réalisé en matériau polymère, le dit réservoir permet de mouler des électrodes à phase liquide lors de leur dépôt (laque d'argent par exemple) avec des géométries variées et des facteurs de forme intéressants.

En plus de permettre la réalisation d'électrodes à géométries très spécifiques (formes sans arêtes, formes variables, formes souples) s'adaptant aux cellules ou aux tissus, afin d'assurer la parfaite homogénéité du champ électrique appliqué, cette invention, faisant l'objet du brevet WO/2010/020674, ouvre aussi la possibilité de développer des électrodes souples pour l'exposition à des impulsions ultra-courtes *in vivo* ou dans des applications cliniques. Des électrodes déformables sont alors adaptables à toute géométrie de tissus ou organes.

Cependant une limitation importante provient de l'utilisation du PDMS comme isolant, et en particulier de sa faible tension de claquage. En effet, comme tout diélectrique, le PDMS a une valeur seuil de tension à ne dépasser au delà de laquelle il devient conducteur et de façon non réversible. Cette limitation impacte aussi le champ électrique maximal applicable au milieu de culture contenant les cellules à traiter. D'autres études, en particulier l'utilisation du parylène comme isolant, permettront d'augmenter cette valeur limite et d'atteindre ainsi des champs électriques importants sur les cellules.

La communication faite lors de la conférence Microfluidics 2008 (Bologne, Italie) est intégrée à cette thèse car elle détaille les procédés de fabrication de certains systèmes utilisés dans cette thèse.

DRAFT μ FLU08-201

INSULATED LIQUID ELECTRODES IN A MICROFLUIDIC CHIP FOR THE ELECTROPORATION OF LIVING CELLS

Julien, Villemejeane¹

SATIE - ENS Cachan, 61 av Président Wilson, 94235 Cachan Cedex, France
julien.villemejeane@ens-cachan.fr

Guillaume, Mottet*, Olivier, Français*, Jean-Pierre Lefèvre**, Lluís M., Mir***, Bruno, Le Pioufle*

* SATIE - ENS Cachan, 61 av Président Wilson, 94235 Cachan Cedex, France

** PPSM - ENS Cachan, 61 av Président Wilson, 94235 Cachan Cedex, France

*** UMR 8121 - Institut Gustave Roussy, PR2 - 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

motet@satie.ens-cachan.fr, olivier.francais@cnam.fr, jpl@ppsm.ens-cachan.fr, luis.mir@igr.fr,

bruno.lepioufle@satie.ens-cachan.fr

KEY WORDS

Electropermeabilization, insulated electrodes, liquid electrodes, biochip, electrochemotherapy

ABSTRACT

Electroporation is a well known method used for electrotransfer of genes or drugs in cells or tissues. It requires a train of micropulses (1 kV/cm - 100 μ s) applied with metallic electrodes directly in contact with the medium containing cells or with the targeted tissue. In order to overcome electrochemical reactions or burns at the interface between electrodes and medium or tissues, we propose in this paper to evaluate the feasibility to apply a new kind of pulses to cells using insulated electrodes.

A method to fabricate a miniaturised chip with high aspect ratio insulated electrodes permitting the exposure of cells to homogeneous electroporation field is proposed. This chip uses microchannels as guiding structure for liquid electrodes that fit to the need of high aspect ratio. To cross the dielectric barrier created by the insulating layer, we showed that reducing the duration of the pulsed electric field is necessary, thus going toward nanopulses (nsPEF). Indeed, in the case of micropulses, insulated electrodes are not permitted as shown by our model. The effect of nanopulses on cells is compared to the one of micropulses. We then compared methods of nsPEF-exposure with or without insulated electrodes. Finally, a preliminary characterization and the limitation of the first version of this biochip is given.

1. INTRODUCTION

Application of electric pulses train is a well known method to provoke the permeabilization of the plasma membrane of cells that permits the penetration into the cytosol of genes or drugs. This electropermeabilization requires pulses of about 1kV/cm and duration of 100 μ s. This method can be used for electrochemotherapy [1], to treat cutaneous and subcutaneous tumour nodules to potentiate the cytotoxicity of nonpermeant or poorly permeant anticancer drugs, or in gene electrotransfer to various animal tissues [2].

Commercial electroporation chambers, with aluminium electrodes, are widely used in laboratories to apply that kind of pulses on living cells. But the interface between electrodes and the cells medium is the place of electrochemical reactions that interfere with biological cells by releasing metal ions in the solution [3] and increase the roughness of electrodes [4]. The same phenomena occurs with *in vivo* and in clinical studies where electrochemical burns appear on the tissues in contact with electrodes.

¹ Corresponding author

We propose in this paper to evaluate the feasibility to apply electropermeabilizing pulses to cells using insulated electrodes. For that purpose, comparison of electroporation methods with or without insulated electrodes is provided. A method to fabricate a miniaturised chip with high aspect ratio insulated electrodes permitting the exposure of cells to homogeneous electroporation field is proposed. This chip uses microchannels as guiding structure for liquid electrodes that fit to the need of high aspect ratio. Such insulated electrodes avoid any effect of electrochemical reactive species with electroporated cells.

We investigated in this paper the feasibility to reduce drastically the duration of pulsed electric field in order to render it capable of crossing the dielectric barrier created by the insulating layer, thus going towards nanopulses. Indeed, in the case of micropulses, insulated electrodes are not permitted as shown by our model. The effect of nanopulses on cells is compared to the one of micropulses.

2. THEORY AND MODELISATION

2.1 Use of insulated electrode becomes possible with the use of ultra-short pulsed electric fields

Electrical properties of biological liquid are mostly defined by two variables : the conductance of the medium due to charges moving thanks to the electric field, and its polarisation which opposes to the applied field. The conductance is modelled by an electric resistance of expression: $R_{Bio} = \frac{e}{\sigma \cdot S}$ where σ is the conductivity, e the electrodes gap and S the average section of current flux in the medium. The polarization is described by an electric capacitance: $C_{Bio} = \varepsilon \cdot \frac{S}{e}$ with ε as absolute permittivity of the liquid ($\varepsilon = \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0$ with ε_0 the vacuum permittivity and ε_r the relative permittivity of the material).

The electrical model of a biological fluid is thus described by those two elements R_{Bio} and C_{Bio} in parallel. When applying a voltage pulse to non isolated electrodes surrounding a biological liquid, a current $I = \frac{U}{R_{Bio}}$ appears while a charge $Q = \frac{U}{C_{Bio}}$ is stored in the liquid and discharged at the end of the pulse. This case corresponds to classical electroporation where the electrodes are directly in contact with the fluid (Figure 1.a).

The electric time constant of the biological fluid is: $\tau_{Bio} = R_{Bio} \cdot C_{Bio} = \frac{\varepsilon}{\sigma}$. In our case, the conductivity is equal to 0.1S/m and the relative permittivity is equal to 80 F/m. So $\tau_{Bio} = 7 \text{ ns}$.

When insulators are used to separate the electrodes from the biological liquid, two capacitances $C_{Insulator}$ (one for each insulator) have to be added in serial with the equivalent model (Figure 1.b).

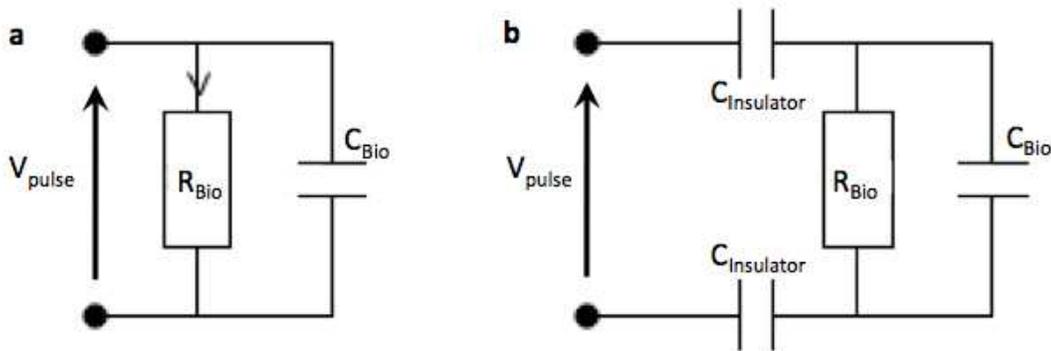


Figure 1: Equivalent electric model of electroporation device: (a) with conventional electrodes in contact with the medium and (b) with insulated electrodes

The presence of these capacitances reduces the voltage applied on the biological liquid (Figure 2), as the pulse amplitude is divided by the capacitor bridge. Moreover the current in the biological medium tends to zero even if the voltage is maintained. Indeed a voltage discharge is induced in the liquid with a time constant τ_{Bio} . Using this configuration with pulses longer than τ_{Bio} , which is the case when microsecond pulses are applied,

is meaningless. In other words the transfer function of the electric field in the biological fluid is a high pass filter which cut off frequency is $\frac{1}{\tau_{Bio}}$.

In our case, where nanopulses (nsPEF) are applied (pulses which duration is less than 10ns), this configuration involving insulated electrodes permits the application of constant electrical field to the biological medium. An electric simulation (obtained with the software Simplorer) presented in figure 2, shows the effect of a voltage pulse of 10ns (rising and falling time of 1ns included). The parameters value, calculated from our device geometry, are: $C_{Insulator} = 9 \text{ nF}$, $C_{Bio} = 14 \text{ nF}$, $R_{Bio} = 500 \Omega$.

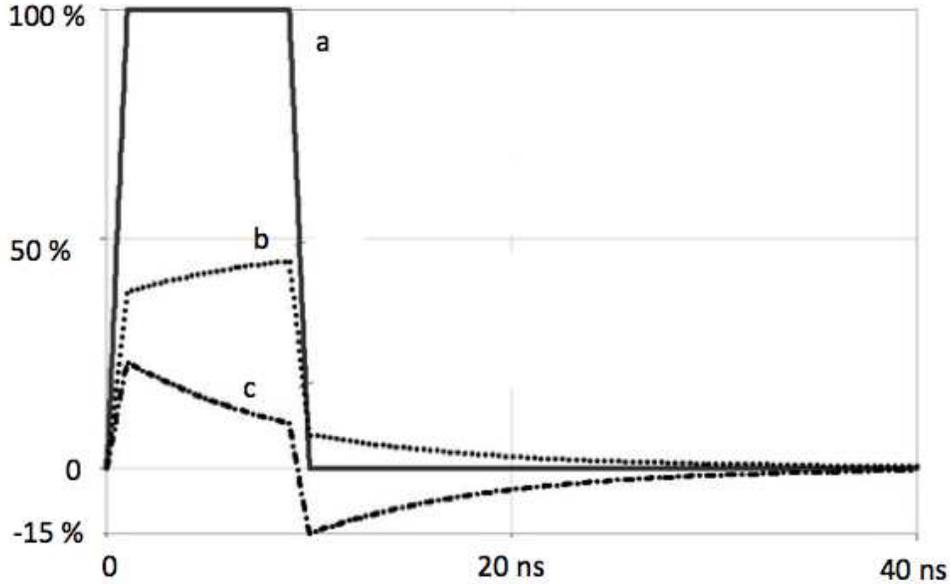


Figure 2: Voltage evolution during a pulse of 10 ns: (a) nsPEF applied on the system (duration of 10 ns, transition time of 2 ns), (b) voltage in the insulator and (c) in the biological medium.

During rising and falling time of the pulse (2 ns each), the voltage on insulator and biological follow the pulse slope. During the pulse (8 ns), the electric discharge of the biologic liquid voltage leads to a decrease of the field. The simulation shows that only nanopulses can be transmitted to the biological liquid, as in the case of micropulses, the voltage will only be transmitted few nanoseconds.

2.2 Quasi-static Finite Element Modelisation

At the interface between insulator and biological medium, we can apply the Maxwell equations :

$$\text{div} \vec{D} = \text{div}(\epsilon \cdot \vec{E}) = 0$$

and thus :

$$\epsilon_{rInsulator} \cdot \epsilon_0 \cdot \vec{E}_{Insulator} \cdot \vec{N} = \epsilon_{rBio} \cdot \epsilon_0 \cdot \vec{E}_{Bio} \cdot \vec{N}$$

As the field is normal to the surface of the insulator, we approximate :

$$\epsilon_{rInsulator} \cdot E_{Insulator} = \epsilon_{rBio} \cdot E_{Bio} \quad (1)$$

So, the two electric fields are inversely proportional to their permittivity. Due to permittivity value ($\epsilon_{rBio} = 80$ and $\epsilon_{rInsulator} = 2.8$), electric field in insulator will be 28 higher than in the biological medium. It's a real limitation for electroporation with nanopulses where extremely high electric field (typically 45 kV/cm) are needed which might induce the PDMS dielectric breakdown. Investigations towards electric field reduction in insulator are underway.

Simulation of the electric field amplitude versus the insulator thickness had been done with the help of Comsol Multiphysics™. Due to high aspect ratio of the electrode, electric field obtained in the liquid is homogenous (Figure 3). It can be seen as a perfect capacitance without board effect.

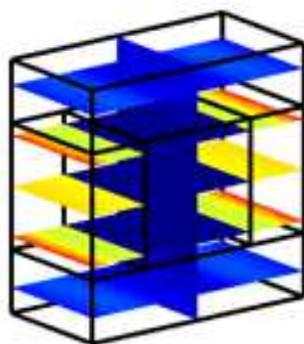


Figure 3: Electric field distribution: high value in PDMS compare to biological liquid

From simulation, the electric field value is extracted and normalized versus its value without insulator versus the insulator width. Here, results are given with PDMS as insulator.

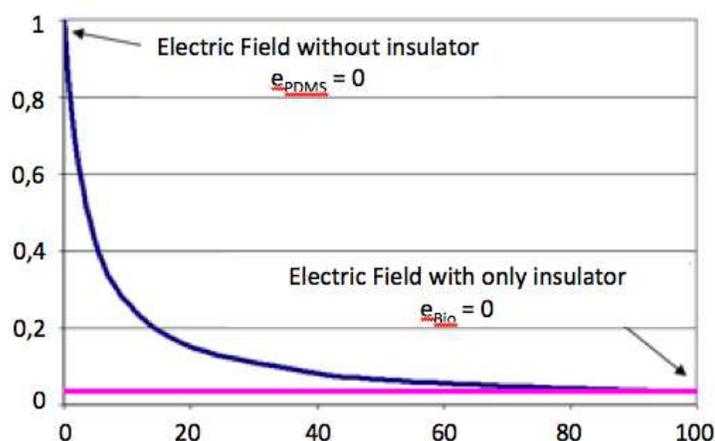


Figure 4: Normalised electric field evolution in biological liquid versus insulator widths percentage

The insulator is rapidly decreasing the electric field value in the liquid. Here, 10% of insulator divides by 4 the field value in liquid. Simulations confirm the dependence of the two fields versus their own permittivity, ratio between the two fields is equal to ratio between permittivity.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 Development of a first PDMS socket with insulated electrodes

We developed in a first instance a biochip with thick electrodes (thick = 300 μm) embedded in PDMS, surrounding a microchannel (width = 900 μm) for the cell flowing (figure 5). In a second step, we reduced the distance between electrodes (down to 100 μm), which permitted to apply an extremely high electric field, while maintaining acceptable voltage in the system (below 1000 V).

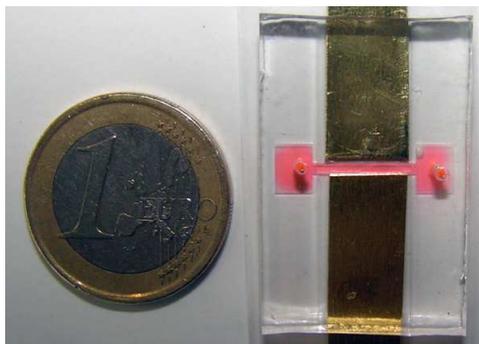


Figure 5: PDMS socket with copper insulated electrode of 300 μm of thickness and a gap between electrodes of 1mm.

3.1.1 SU-8 mould for the PDMS socket

SU-8 2100 was spincoated (20 s at 1500 rpm), then followed by a soft bake at 65 °C during 7 min and at 95 °C during 80 min. The resist was then exposed to UV (365 nm) during 60 s through a mask which defines the geometry of electrodes and channel. This step was followed by two post exposure bake: a first one at 65 °C during 5 min and a second one at 95 °C during 30 min.

The mould was then developed using SU-8 developer during 80 min. In order to completely remove the non-exposed SU-8, we exposed the wafer to sonication in the SU-8 developer during 10 min. This last step finishes by a hard bake at 180 °C during 30 min.

Figure 6 shows the final SU-8 mould obtained with this process.

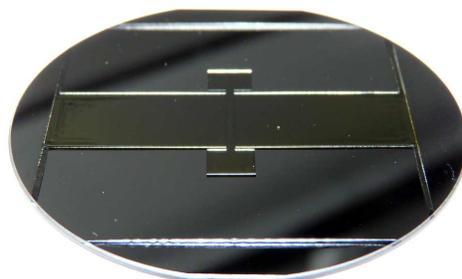


Figure 6: mould in SU-8 resin of the PDMS socket with a thickness of above 300 μm on a 2'' silicium wafer

3.1.2 PDMS socket and electrodes insertion

This mould in SU-8 is then used to shape the PDMS socket in which plain copper electrodes are inserted as shown in figure 5. Plain copper electrodes are 320 μm thick.

3.2 Conception and development of the PDMS socket with insulated and liquid electrodes

In order to respect the aspect ratio of electrodes (which thickness is above 100 μm , while inter-electrode distance is below 100 μm) and to facilitate the positionement of the electrodes in the two dedicated places, we involved liquid electrodes within the chip. The liquid electrode is flowed and shaped thanks to a microchannel (width= 100 μm) moulded in the microstructure. Several conductive electrolytes can be used for this purpose. Figure 7 shows a 3D view of the microchip with two channels dedicated to liquid electrodes and one channel for the flowing of cells medium.

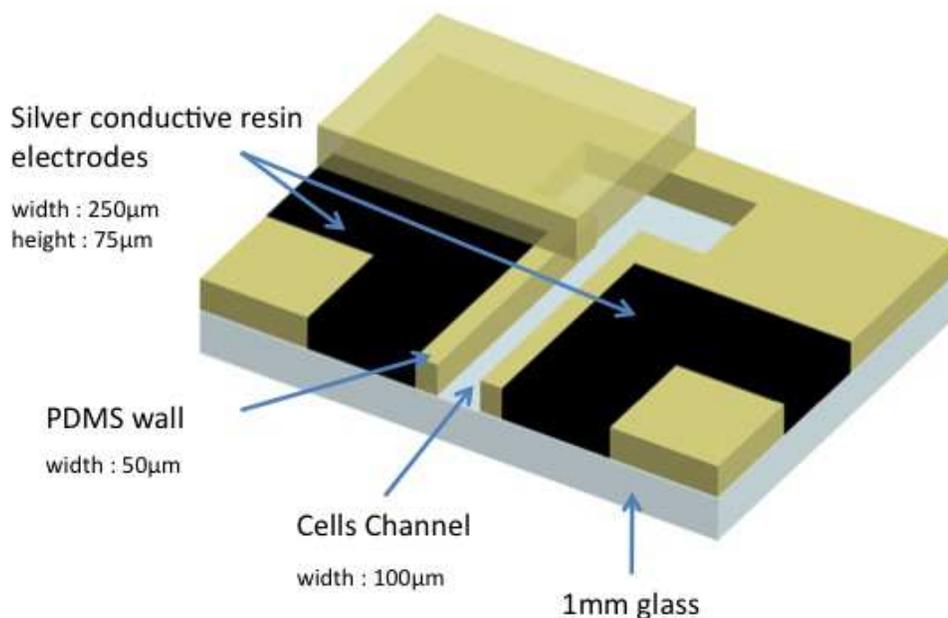


Figure 7: 3D view of the microchip with a cells channel surrounding by two insulated channels for the flowed of liquid electrodes

3.2.1 Mould in SU-8 resin for the forming of the biochip embedding liquid electrodes

This second mould is realized by using SU-8 2075 (25 s at 1000 rpm). This produces a resin film of approximately 75 μm. This step is followed by a soft bake at 65 °C during 1 min and a second soft bake at 95 °C during 8 min. The next step consists in the exposure of the SU-8 resin to UV during 45 s followed by two post exposure bake: 1 min at 65 °C and 12 min at 95 °C. This mould is developed in SU-8 developer during 15 min. This last step finishes by a hard bake at 180 °C during 30 min.

3.2.2 Flowing silver conductive resin as liquid electrodes in the PDMS socket

This mould in SU-8 is then used to shape the PDMS socket in which silver conductive resin electrodes are flowed in dedicated microchannels as shown in figure 8. Electrodes solidified to form thick and flexible electrodes embedded in PDMS.

3.3 Cell culture

DC-3F cells (Chinese hamster fibroblast lung cells) and LPB cells (mouse fibrosarcoma) were grown in Minimum Essential Medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 500 U/ml penicillin, 500 μg/ml streptomycin (Invitrogen) defined as complete medium. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. Cells were routinely passed every two days.

3.4 Plasmid DNA and electrotransfer

Plasmid pCMV-Luc (Clontech, Montigny-les-Brettonneux, France) was prepared using the Endotoxin-free Plasmid DNA (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to manufacturer's protocol.

Cells were harvested by trypsin and cell suspension was placed into electroporation cuvettes in low conductivity medium (250 mM sucrose, 10 mM Tris, 1 mM MgCl₂, pH=7) (10⁶ cells per electroporation cuvette). Cells were exposed to 8 electropermeabilizing pulses (1250 V/cm, 100 μs, 1Hz) delivered by a Cliniporator (IGEA, Carpi, Italy) in the presence of DNA coding for the luciferase. After these pulses, cells were incubated for 45 to 60 min either at 37 °C under 5% CO₂.

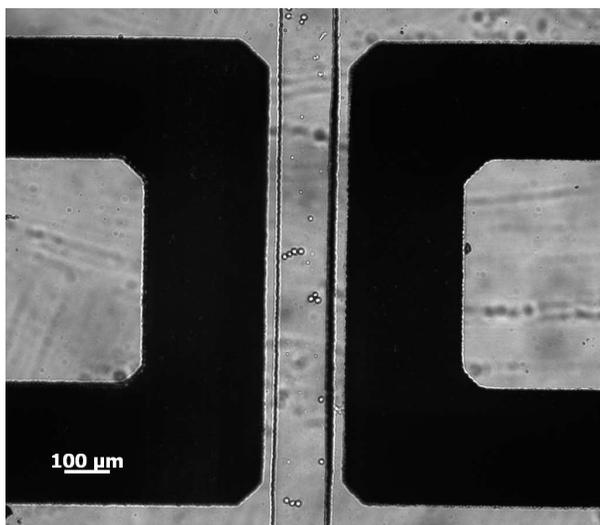


Figure 8: Two silver conductive resin electrodes surrounding a channel containing physiological medium with cells

3.5 Exposure to nsPEF

Nanopulses were delivered by a high voltage generator FPG 10-30MS (FID Technology - Russia). It can deliver electric pulses from 2.5kV to 10kV per output in an impedance of 1 kΩ and it has 4 similar ones. Pulses last 10ns and have transition time of 3ns. An external trigger from TTY is used to set off the nsPEF generator.

Cells were exposed to nsPEF :

- *with contact between electrodes and the medium* : in electroporation cuvettes (Molecular BioProducts, VWR, France) which had a gap between the electrodes of 1 or 2 mm.
- *with insulated electrodes* : in spectroscopy cuvettes (Plastibrand, VWR, France) which had a gap between the electrodes of 6 mm and an insulating layer of 0.5 mm in PVC.

After the nsPEF delivery, cells were removed from the electroporation or spectroscopy cuvette and cultured in the complete medium for 24 hours at 37 ° C under 5% CO₂.

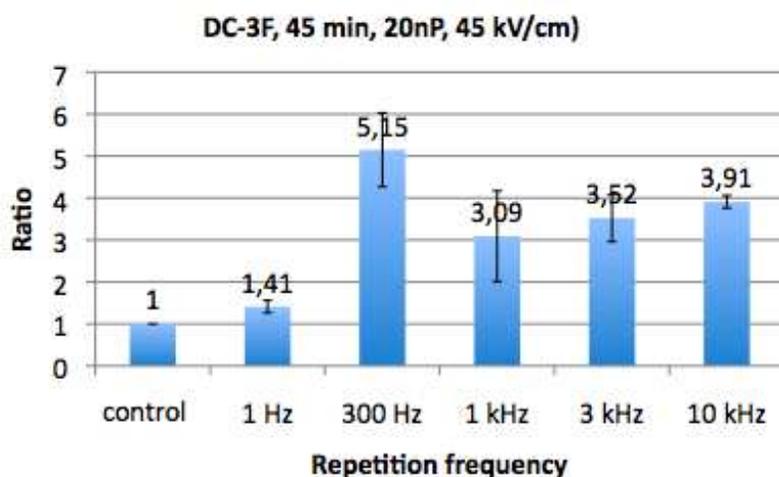
4. PRELIMINARY CHARACTERIZATION AND DISCUSSION

4.1 Comparison between insulated and non-insulated exposure of cells to nanopulses

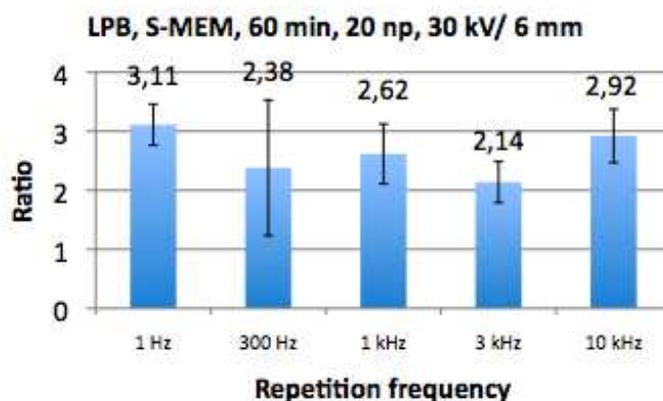
Firstly, we investigated the fact that the use of insulated electrodes gave the same biological results than conventional electrodes on the enhancement of gene expression after an electrotransfer of plasmid DNA by using nanosecond pulsed electric field. It was shown by Beebe *et al.* that the application of only 1 nsPEF (10 ns, 150 kV/cm) 30 min after the GFP gene electrotransfer into cells in suspension allows an increase of 3-fold of the GFP expression compared to electrotransfer only [5].

Here, the experiment consists in the electrotransfer of gene coding for the luciferase followed or not by the exposure to nsPEF (a) with conventional electroporation cuvettes (electrodes in contact with the medium) (20 nsPEF of 45 kV/cm, 45 min after the electrotransfer) and (b) with insulated electrodes (no contact between metal and liquid) (20 nsPEF of 30 kV, corresponding to a static electric field of 9 kV/cm in the medium, 60 min after the electrotransfer).

Figure 9 shows the ratio of the luciferase activity between exposed cells to nsPEF after electrotransfer and electrotransferred cells only (control) depending on the repetition frequency of the pulses. In both cases, with "conventionnal" cuvettes of electroporation (figure 9.a) and with insulated electrodes (figure 9.b), gene expression is enhanced by exposing cells to nsPEF 45 or 60 min after an electrotransfer of gene.



a. With conventional electroporation cuvettes



b. With spectroscopy insulated cuvettes

Figure 9: Comparison of the enhancement of gene expression by applying nsPEF with (a) commercial electroporation cuvettes with aluminium electrodes in contact with the medium and (b) spectroscopy cuvettes allowing the insulation of the medium

In both cases, an increase of 3-fold of the gene expression can be reached, depending on several parameters (field intensity, repetition frequency...). These results show the feasibility to use insulated electrodes to apply nsPEF on cells. The repetition frequency of the nsPEF appears to be less affecting the gene expression by using insulated electrodes.

4.2 PDMS socket does not resist to so high electric field

We applied nsPEF on cells under an inverted microscope (Zeiss) using the biochip we developed. We applied a train of 20 pulses of 10 ns and from 1 kV to 10 kV (corresponding to a static field from 76 kV/cm to 760 kV/cm on the two PDMS insulating walls and from 3 kV/cm to 30 kV/cm on the medium containing cells). Electric field are given for a 1mm width channel.

Under 2 kV applied on the biochip, cells seems to be not affected (data not shown) by the electric field in the medium (< 6kV/cm). But pulses with amplitudes greater than 2 kV (corresponding to electric field greater than 200 kV/cm in PDMS) lead the destruction of the insulating layer by reaching the breakdown field of the insulator. Figure 10 shows holes appeared in the insulating layers (mainly on the positive side) and flows of the silver conductive resin in the main channel.

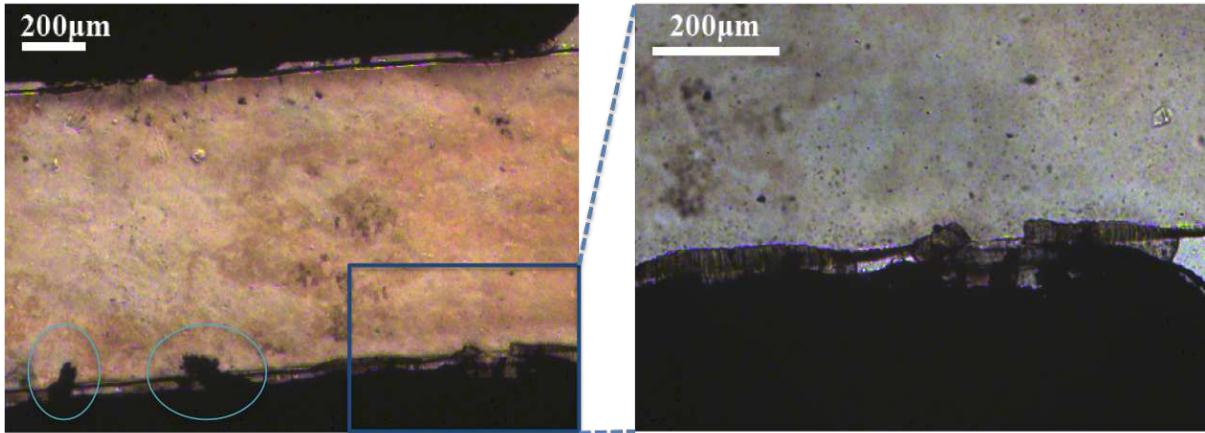


Figure 10: View of the 1 mm width channel and the two liquid-solidified electrodes under a microscope at 5x (on the left) and at 10x (on the right). On the left, circled areas show holes in the PDMS after the application of a high voltage pulse and the flow of the resin in the main channel. On the right, we can see the tearing of the insulating layer.

Our chip structure is compatible to the real time observation under microscope of cells during electroporation: i) transparency and planarity of the support (PDMS sockets including liquid electrodes are bonded on a 1mm microscopy glass slide) ii) biocompatibility of materials in contact with cells (electrodes are insulated by a 50 μm PDMS wall). But PDMS does not have a sufficiently high electric breakdown to obtain electric fields having effects on cells in the medium (210 kV/cm).

The limitation of the electric field strength in the medium is mainly due to this low breakdown field of the PDMS. According to the equation 1, the high ratio between the permittivity of each material (PDMS and medium):

$$\frac{\epsilon_{rBio}}{\epsilon_{rInsulator}} = \frac{80}{2.8} = 28.6$$

imposes a maximum electric field in the medium of

$$E_{Bio} = \frac{\epsilon_{rInsulator}}{\epsilon_{rBio}} \cdot E_{Insulator} = \frac{210 \cdot 10^3}{28.6} = 7.3 \text{ kV/cm}$$

This electric field strength seems to be too low to affect cells. Our results (data not shown) on the enhancement of gene expression show an efficiency of this method for electric field from 30 to 70 kV/cm with conventional technique (electroporation cuvettes) and amplitude of 30 kV on a 6 mm gap insulated chamber (corresponding to a static electric field up to 9 kV/cm). To reach these intensities of field with our biochip, the ratio between the permittivity of materials for the insulator and the medium has to be decreased by modifying the electric properties of the materials.

Complete medium can not be modified to ensure the viability of the cells and the osmolarity of medium. So, only insulating material can be optimized in order to support higher electric field and permit to apply enough electric field on cells to obtain an effect on the permeabilization of the cells or/and the enhancement of gene expression after electrotransfer. Increasing the permittivity of the PDMS by adding ferromagnetic elements for example or replacing it by another material with a permittivity or a breakdown field higher than PDMS are two solutions that we intend to improve our biochip.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Vanessa Joubert (IGR, CNRS UMR8121) and Joseph Lautru (ENS Cachan, CNRS UMR8531) for their assistance. This work was supported by funding under the Sixth Research Framework

Program of the European Union, CNRS, ENS Cachan, Institut Gustave-Roussy and INCA (Institut National of Cancer, France).

REFERENCES

- [1] A. Gothelf, L.M. Mir, and J. Gehl. (2003). Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treatment Review*, 29, 371.
- [2] L.M. Mir, P.H. Moller, F. André, and J. Gehl. (2005). Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv Genet*, 54, 83.
- [3] T. Kotnik, D. Miklavcic, and L.M. Mir. (2001). Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses. Part II. Reduced electrolytic contamination. *Bioelectrochemistry*, 54, 91.
- [4] G. Saulis, R. Radaitė-Riseviciene, and V. Snitka. (2006). Increase of the roughness of the stainless-steel anode surface due to the exposure to high-voltage electric pulses as revealed by atomic force microscopy. *Bioelectrochemistry*, 70, 519.
- [5] S.J. Beebe, J. White, P.F. Blackmore, Y. Deng, K. Somers, and K.H. Schoenbach. (2003). Diverse effects of nanosecond pulsed electric field on cells and tissues. *DNA and Cell Biology*, 22, 785.

5.3.2. Isolation par dépôt de parylène

Une autre possibilité pour l'isolation des électrodes est l'utilisation d'un polymère pouvant être déposé uniformément sur tout type de surface. C'est le cas du parylène, film transparent, semi-cristallin pouvant aller de quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de micromètres.

Il est souvent utilisé comme couche protectrice sur des systèmes devant s'intégrer dans des environnements sensibles, tels que des capteurs ou implants médicaux (Schmidt *et al.*, 1988) ou bien dans des systèmes nécessitant une faible porosité, tels que des micro-PCR par exemple (Shin *et al.*, 2003). Ses propriétés diélectriques, permittivité relative de 3 et tension de claquage de 2,1 MV/cm (contre seulement 210 kV/cm pour le PDMS) en font aussi un très bon isolant (Juneja *et al.*, 2006) et il trouve sa place dans de multiples domaines : de l'électronique au médical, en passant par des applications militaires, et plus récemment en micro- et nano-technologies.

5.3.2.1. Principe de dépôt

Le procédé dépôt du parylène peut être assimilé à de la déposition par évaporation de produits chimiques ou CVD (*Chemical Vapor Deposition*). Dans le cas du parylène, ce procédé est connu sous le nom de procédé de Gorham (1966).

Le dépôt se décompose en trois étapes, toutes réalisées sous vide primaire. Ces étapes sont illustrées dans la figure 5.12.

1. Le paracyclophane, dans sa forme solide, est chauffé à une température supérieure à 100 °C (dans notre procédé, entre 140 et 175 °C). Cette étape entraîne la sublimation de ce dimère.
2. Les vapeurs, ainsi obtenues, passent ensuite par une étape de pyrolyse à une température supérieure à 500 °C (690 °C dans notre procédé), qui a pour but de séparer la molécule en deux monomères par rupture des liaisons C-C.
3. Une fois dans la chambre de déposition à température ambiante, ces molécules (de p-xylylène) se déposent sur les surfaces et polymérisent spontanément formant ainsi un film de parylène.

Afin de protéger l'équipement de pompage, une trappe froide est placée à la suite de la chambre de déposition et permet de capturer tout résidu volatil.

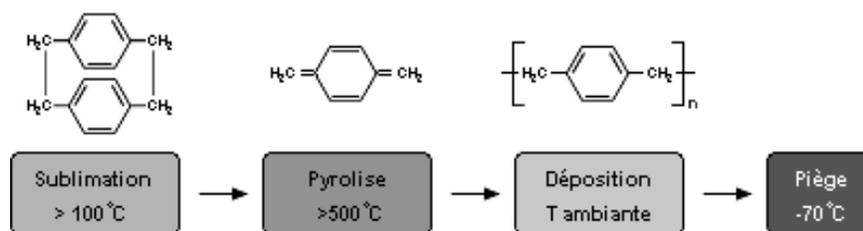


Fig. 5.12 : Principe de dépôt du parylène. Wikipedia - parylène.

L'épaisseur du film déposée dépend alors de la surface totale revêtue et de la quantité de paracyclophane sublimée. Une quantité de 1 g de parylène C permet, dans nos conditions de déposition, d'obtenir une épaisseur de l'ordre de 500 nm en environ 30 min.

5.3.2.2. Cuvettes d'électroporation, microsystèmes isolés et électrodes *in vivo*

Cette technique permet alors de recouvrir de façon homogène toute surface, de quelque nature qu'elle soit. Il est donc ainsi possible d'utiliser le même type de cuvettes d'électroporation pour l'application de champs électriques de manière "conventionnelle" ou "isolée", en les recouvrant d'un film calibré et homogène de parylène. Cette avancée va permettre notamment de limiter la taille de l'isolant, jusqu'alors de quelques centaines de micromètres, et ainsi limiter aussi la perte associée en terme de tension nécessaire à la polarisation de l'isolant.

Il en est de même pour les microsystèmes décrits précédemment dans ce chapitre. Le PDMS qui était utilisé jusqu'à alors sera remplacé par une fine couche de parylène (une dizaine de micromètres déposée en 3 à 4 h de temps) et permettre ainsi d'appliquer des champs plus élevés dans le milieu contenant les cellules.

Mais là où le parylène va permettre la plus grande évolution est dans la réalisation d'électrodes isolées pour les applications *in vivo*. Les premières versions d'électrodes, avant l'utilisation du parylène, sont décrites en section 6.2.3.5 et illustrées à la figure 6.5 et ont été utilisées dans le cadre de l'étude sur l'augmentation de l'efficacité de l'électrotransfert de gènes (chapitre 7).

Les électrodes isolées à l'aide du parylène ont quant à elles étaient utilisées dans des expériences préliminaires d'électrochimiothérapie basée sur l'utilisation de nsPEF (chapitre 9). Elles sont décrites dans la section 6.4.2.

APPLICATION D'IMPULSIONS ULTRA-COURTES *in vitro* ET *in vivo*

L'exposition de cellules ou de tissus à des impulsions électriques peut être utilisée dans diverses applications, qu'elles soient encore au stade de la recherche ou déjà en clinique. C'est le cas de l'électrotransfert de gènes, servant à transférer des informations génétiques dans des cellules, ou encore de l'électrochimiothérapie, permettant l'introduction de molécules thérapeutiques anti-cancéreuses dans certaines tumeurs ou cellules tumorales dans le but de les détruire.

Ce chapitre décrit, d'une part, les dispositifs d'exposition particuliers nécessaires à l'application d'impulsions calibrées de diverses amplitudes et durées sur des cellules ou des tissus, et d'autre part, les protocoles mis en œuvre dans nos expériences *in vitro* puis *in vivo*, que ce soit pour du transfert de gènes ou de la chimiothérapie par champ électrique.

6.1. Systèmes d'exposition et de génération d'impulsions électriques

Les différents champs électriques mis en jeu dans nos expériences sont produits par divers générateurs adaptés aux contraintes de chacune des applications. Les caractéristiques principales, citées ci-dessous, doivent être prises en compte :

- les durées minimale et maximale délivrables,
- la plage d'amplitude,
- la fréquence de répétition maximale,
- l'impédance caractéristique du générateur (en particulier dans le cas d'impulsions ultra-courtes).

6.1.1. Générateurs pour l'électrotransfert de gènes

L'électrotransfert de gènes dit "conventionnel" nécessite l'utilisation d'impulsions de deux types :

- de haute tension (ou *high voltage* - HV) (800 à 1300 V/cm, 100 μ s) : entraînant la déstructuration de la membrane plasmique et sa perméabilisation ;
- de basse tension (ou *low voltage* - LV) (80 à 100 V/cm, 100 à 400 ms) : permettant un déplacement électrophorétique de l'ADN.

Ce deuxième type d'impulsions est surtout nécessaire *in vivo* où l'espace environnant les tissus est très dense et empêche le passage de certaines molécules.

Dans le cadre de l'augmentation de l'efficacité de transfert de gènes par application d'impulsions ultra-courtes, des générateurs spécifiques permettant de délivrer des impulsions de quelques nanosecondes à quelques dizaines de kilovolts par centimètre sont aussi utilisés.

6.1.1.1. Impulsions "longues"

Les impulsions électroperméabilisantes sont appliquées à l'aide d'un générateur Cliniporator™ développé par IGEA (Carpi, Italie) (voir figure 6.1). Ce type de système permet de délivrer des impulsions HV et LV. Les premières peuvent aller de 60 à 1.000 V pour des durées de 1 à 1.000 μ s et les secondes de 12 à ... V pour des durées de 1 à 1.000 ms. La fréquence de répétition peut varier de 1 Hz à 5 kHz.

Ce générateur inclut aussi un système de contrôle et d'acquisition des données. Ainsi tous les paramètres d'exposition peuvent être sauvegardés ainsi que les courbes de tension et de courant.

6.1.1.2. Impulsions "ultra-courtes"

Un générateur commercial FPG 10-30 MS (FID Technology, Russie) est utilisé pour la génération d'impulsions ultra-courtes sur des objets biologiques. Ce générateur a 4 sorties identiques pouvant délivrer entre 2,5 et 10 kV chacune (impédance de sortie de 1 k Ω). Les impulsions ont une durée de 10 ns et des temps de transition de 3 ns. Un générateur de signaux extérieur TTY (Fort Worth, TX, USA) permet



FIG. 6.1 : Générateur Cliniporator™ (IGEA, Carpi, Italie) pour l'électrotransfert. La version présentée ici est la version utilisée en clinique.

de contrôler le nombre et la fréquence de répétition des impulsions. La figure 6.2 montre les différents éléments de la chaîne d'exposition.



FIG. 6.2 : Système d'exposition à des impulsions ultra-courtes regroupant : (1-2) un générateur d'impulsions ultra-courtes (FID Technology FPG 10-30 MS) et sa source de tension continue, (3) 4 câbles coaxiaux 75Ω reliant les sorties au système d'exposition (4) et (5) les deux sondes haute tension (Tektronix P6015A) permettant la visualisation des signaux appliqués à l'aide d'un oscilloscope (LeCroy WavePro 7000).

Le signal est ensuite mesuré à l'aide d'un oscilloscope LeCroy WavePro 7000 (Chestnut Ridge, NY, USA) et de 2 sondes haute tension Tektronix P6015A (atténuation par 1.000, amplitude maximale de 40 kV) (Beaverton, OR, USA).

6.1.2. Générateur pour l'électrochimiothérapie

Un générateur commercial FPG 10-1SM10 (FID Technology, Russie) est utilisé pour la génération d'impulsions ultra-courtes sur des tissus tumoraux *in vivo* dans le cadre de la mise en place d'un nouveau traitement d'électrochimiothérapie. Ce générateur est une version similaire à celui proposé dans le paragraphe précédent, mais possède une sortie d'impédance de 50 Ω pouvant délivrer entre 2,5 et 10 kV. Les impulsions ont une durée de 10 ns et des temps de transition inférieurs à la nanoseconde. Un générateur de signaux extérieur Agilent 33120A (Leasametric, Courtaboeuf, France), piloté par un ordinateur à l'aide d'un script LabView[®], permet de contrôler le nombre et la fréquence de répétition des impulsions.

6.1.3. Générateur pour l'application en microsysteme

Des générateurs développés par le laboratoire XLim (Limoges, France) sont utilisés pour l'application d'impulsions ultra-courtes sur des cellules en microsysteme. Les distances entre les électrodes étant réduites par rapport à l'utilisation de cuvettes commerciales, l'amplitude à appliquer doit elle aussi être réduite pour obtenir des champs utiles équivalents. Ces générateurs sont adaptés pour des applications 50 Ω et permettent de générer des impulsions de 2 à 10 ns avec des amplitudes pouvant atteindre 4 kV. Ces systèmes sont contrôlés par l'application d'impulsions laser provenant de sources différentes.

6.2. Electrotransfert de gènes

Après s'être intéressé aux divers générateurs qu'il est possible d'utiliser, voyons à présent les différentes étapes nécessaires pour l'électrotransfert de gènes *in vitro* puis *in vivo* : depuis les plasmides d'ADN, support de l'information, jusqu'à l'application des divers trains d'impulsions.

6.2.1. Support de l'information

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique visant à faire pénétrer des gènes à l'intérieur des cellules ou des tissus. Plusieurs supports de l'information existent selon le type de méthode utilisée. Dans le cadre de l'électrotransfert de gènes, l'utilisation de plasmides d'ADN est le plus souvent répandue.

6.2.1.1. Plasmides

Un plasmide est une molécule d'ADN double brin capable de répllication autonome. Il possède différents éléments tels que : un gène de résistance à un antibiotique, un gène rapporteur qui code pour une protéine ayant des propriétés facilement détectables (le gène peut aussi coder pour une protéine thérapeutique en vue d'une thérapie génique), et une origine de répllication bactérienne permettant la production massive du plasmide par des bactéries.

Dans l'optique de pouvoir visualiser les effets des traitements appliqués de façon simple, des plasmides contenant le gène de la luciférase, enzyme contrôlant l'oxydation de la luciférine, ont été utilisés comme gène rapporteur. La mesure de l'activité de la luciférase a aussi comme avantage de ne pas être sujet à du bruit, contrairement à l'utilisation de la GFP dont le signal peut être amplifié par l'auto-fluorescence des cellules. Ces plasmides **pCMVLuc** intègrent le promoteur du cytomégalo virus provenant du plasmide pcDNA3 (Invitrogen) inséré en amont de la séquence codant pour la luciférase de luciole du plasmide pGL2-Basic Vector (Promega) (voir Fig. 6.3).

6.2.1.2. Production des plasmides

Les purifications de plasmide à grande échelle pour les administrations, *in vivo* notamment, ont été effectuées à l'aide de kits Qiagen : EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen) pour des quantités allant jusqu'à 10 mg environ. Ces kits Endofree garantissent une quantité d'endotoxine inférieure ou égale à 0,1 U/ μ g d'ADN pour éviter une réaction immunitaire des animaux.

Une fois produits et purifiés, ces plasmides ont aussi été contrôlés par digestion enzymatique et électrophorèse sur gel d'agarose. Par ailleurs pour avoir un meilleur niveau d'expression, il est important de vérifier sur le gel que la solution d'ADN injectée contient majoritairement de l'ADN plasmidique sous forme super-enroulée.

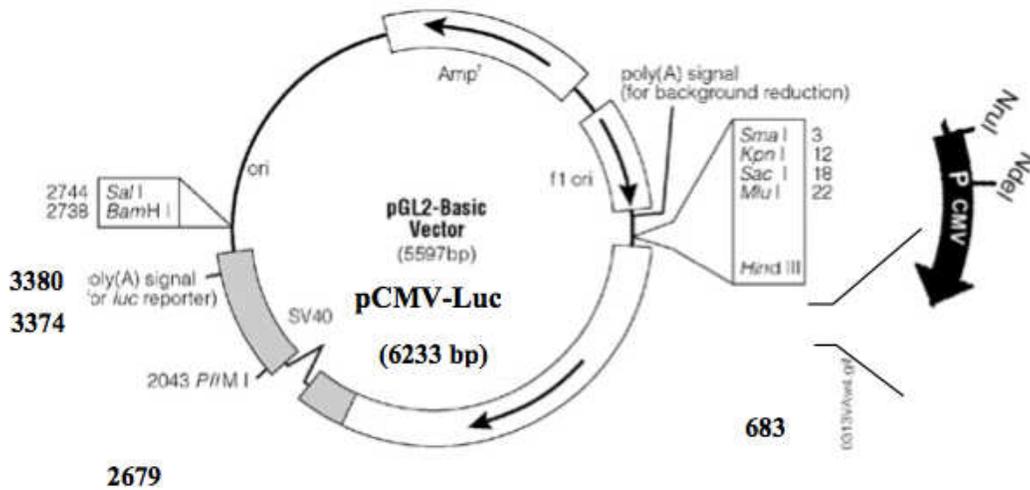


FIG. 6.3 : Carte du plasmide pCMVLuc codant pour la luciférase.

6.2.1.3. Quantification de l'ARN et de l'ADN

La concentration des solutions d'ARN ou d'ADN utilisées est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (A_{260}) à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman, DU 530). Une densité optique de 1 correspond à une concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN simple brin, 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin ou 37 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN simple brin. La concentration en ADN simple brin ($[ADN]$), par exemple, est donc donnée par la formule suivante : $[ADN] = A_{260} \cdot D \cdot 37 \mu\text{g/ml}$, où D est le facteur de dilution de l'échantillon.

6.2.2. Electrotransfert *in vitro*

Les plasmides purifiés et amplifiés sont ensuite vectorisés par électrotransfert dans différentes lignées cellulaires et selon différents paramètres électriques.

6.2.2.1. Lignées cellulaires

Deux types cellulaires ont été utilisées dans les expériences rapportées ici : des DC-3F (fibroblastes de poumon de hamster chinois) et des LPB (fibrosarcome murin de souris). Ces deux lignées cellulaires sont mises en culture dans du Milieu Essentiel Minimum (MEM) (Invitrogen) complété par 10 % de sérum de veau fœtal (Invitrogen), 500 U/ml de pénicilline et 500 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine (Invitrogen). Ceci définit le milieu complet. Les cultures cellulaires sont maintenues en atmosphère humide régulée à 5 % de CO_2 et à 37 °C. Le passage des cellules, procédé de sous-culture de cellules animales, est réalisé tous les deux ou trois jours.

6.2.2.2. Milieu d'exposition et administration de l'EGT

Avant les expériences, les cellules sont décollées en utilisant de la trypsine-EDTA (Invitrogen). La suspension cellulaire est centrifugée à 1.000 tr/min pendant 10 min à température ambiante. Le culot est

ensuite resuspendu dans deux types de milieux d'exposition différents :

- du S-MEM ("Minimum Essential Medium Spinner Modification") (Invitrogen), ayant une conductivité de 1 S/m ;
- un mélange de saccharose (250 mM), de Tris (10 mM) et de $MgCl_2$ (1 mM), ayant une conductivité finale de 0,1 S/m. Ce milieu sera appelé STM (Saccharose, Tris, Magnésium) par la suite.

La suspension cellulaire est ensuite placée, selon l'expérience, dans des cuvettes d'électroporation (avec des distances inter-électrodes de 1 ou 2 mm) ou dans des microsystèmes (présentés dans la partie II). La concentration est de $1 \cdot 10^6$ cellules par cuvette. Les cellules sont ensuite exposées à un train de 2 impulsions électriques perméabilisantes (1.250 V/cm, 100 μ s, 1 Hz), sauf contre-indication, délivré par un CliniporatorTM (IGEA) en présence de plasmide pCMV-Luc, à raison de 2 μ g par cuvette.

6.2.2.3. Exposition aux impulsions ultra-courtes

Dans le cas où l'on souhaite administrer des impulsions ultra-courtes à ces cellules après l'électrotransfert, ces dernières sont incubées pendant 30 à 120 min (selon l'expérience) en atmosphère humide régulée à 5 % de CO_2 et à 37 °C.

Les cellules sont ensuite exposées aux nsPEF dans des cuvettes d'électroporation. Celles-ci peuvent être identiques à celles utilisées pour l'électrotransfert, dans le cas d'une exposition "conventionnelle". Dans le cas d'une exposition aux nsPEF par le biais d'électrodes isolées, les cellules sont transférées dans des cuvettes d'électroporation précédemment isolées à l'aide de parylène (voir section 5.3.2.2). Enfin, des cuves de spectroscopie en plastique ont été utilisées dans certains cas comme système isolé (voir figure 6.4). Ces dernières ont un écartement interne de 5 mm et des couches plastiques de l'ordre de 0,5 mm.

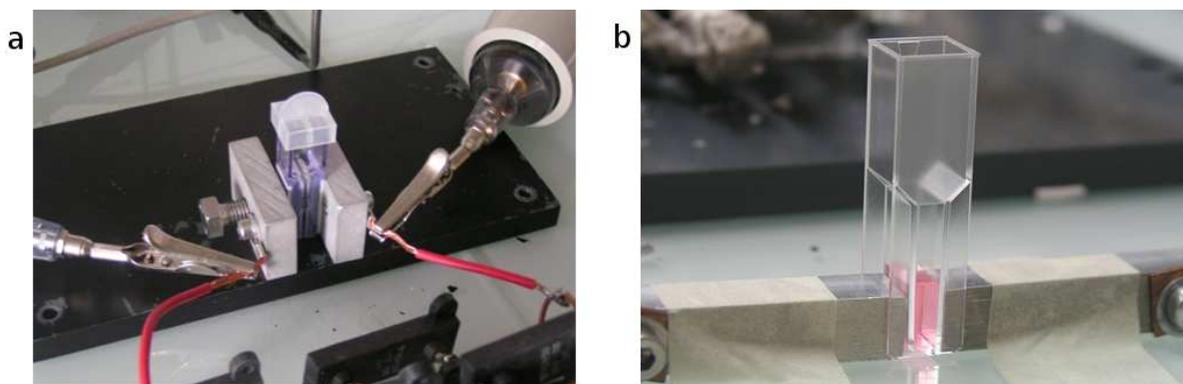


FIG. 6.4 : Systèmes d'exposition de cellules (a) "conventionnels", utilisant des cuvettes d'électroporation, et (b) isolés, utilisant des cuvettes de spectroscopie.

Après application de nsPEF, les cellules sont remises en culture dans du milieu complet pendant 24 h en atmosphère humide régulée à 5 % de CO_2 et à 37 °C.

6.2.3. Electrotransfert *in vivo*

6.2.3.1. Animaux

Toutes les expériences sur animaux ont été réalisées d'après les recommandations pour l'expérimentation animale de l'institut national de la santé (NIH) et du comité national d'éthique.

Les souris utilisées sont des souris femelles C57Bl/6 (Janvier ou Harlan).

6.2.3.2. Anesthésie

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale de 10 $\mu\text{l/g}$ d'un mélange anesthésiant de kétamine (Ketalar, 100 mg/kg ; Panpharma, Fougères, France) et de xylazine (Rompun, 40 mg/kg ; Bayer, Puteaux, France) en solution dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%).

6.2.3.3. Préparation des animaux pour un transfert de gènes dans le muscle squelettique de souris

Après l'anesthésie, les pattes postérieures des souris sont rasées à l'aide d'une tondeuse (Cordless rechargeable animal trimmer, Wahl USA).

Une solution d'ADN (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans un volume final de 20 μl par patte dans du tampon phosphate salin (PBS) ou du sérum physiologique, NaCl 0,9 %) est ensuite injectée dans le muscle *tibialis cranialis* à l'aide d'une seringue Hamilton RN équipée d'une aiguille de type 4, de calibre 26 G et de longueur 16 mm.

Lorsque cela est nécessaire, une solution contenant de la hyaluronidase (Sigma H-3631) à raison de 10 ui pour 20 μl ou de l'héparine (Lab.Leo) à raison de 180 IU/ml est injectée dans le muscle *tibialis cranialis* de la souris anesthésiée.

6.2.3.4. Electrotransfert de gènes

Après l'injection longitudinale d'ADN, le muscle à transfecter est enduit d'un gel conducteur (Eko-Gel, Egna). Les impulsions électriques sont appliquées, à l'aide du générateur Cliniporator™, sur le muscle, environ trente secondes après l'injection d'ADN, à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable, distantes de 5 millimètres et placées de part et d'autre de la patte de la souris. Deux impulsions de 100 μs de durée à 1.250 V/cm et espacée d'une seconde sont délivrées alors dans le muscle.

6.2.3.5. Exposition aux impulsions ultra-courtes

Selon l'expérience, l'exposition aux nsPEF se fait soit immédiatement soit entre 45 et 60 min après l'EGT. La totalité de la patte des souris est placée entre 2 électrodes d'aluminium espacées de 8 mm. L'isolation des électrodes est garantie par une protection en plastique de 0,5 mm (voir figure 6.5). Un train de 20 à 30.000 impulsions de 30 kV d'amplitude et d'une durée de 10 ns est ensuite appliqué sur le muscle à des fréquences de répétition comprises entre 1 Hz et 10 kHz.



FIG. 6.5 : *Système d'exposition isolé pour les applications in vivo, composé de deux électrodes en aluminium espacées de 8 mm et recouvertes d'un isolant plastique de 0,5 mm d'épaisseur.*

6.2.4. Exposition au trans-cyclohexane-1, 2-diol (TCHD)

Les cellules ont été incubées en présence de trans-cyclohexane-1, 2-diol (TCHD) (Sigma-Aldrich, L'Isle-d'Abeau-Chesne, France) à 37 °C, 30 min après un EGT, avant d'être exposées ou non à des nsPEF (20 nsPEF, 100 kV/cm, 10 ns, 300 Hz, cuvettes de 1 mm d'espace inter-électrodes), 1 h après l'EGT. L'incubation en présence de TCHD a été prolongée de 30 min à 37 °C après l'exposition aux nsPEF.

A la fin de l'incubation, le milieu non conducteur a été retiré et remplacé par du milieu complet. Les cellules ont été maintenues en culture pendant 24 h en atmosphère humide régulée à 5 % de CO₂ et à 37 °C. La production de luciférase et la concentration totale de protéines ont ensuite été mesurées (voir paragraphe suivant).

6.2.5. Détermination de l'expression de la luciférase

6.2.5.1. In vitro

L'expression de la luciférase est déterminée en utilisant le kit "Luciferase Assay System" (Promega). Les cellules sont d'abord décollées puis centrifugées à 1.000 tr/min pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse (Promega), centrifugé à 11.000 tr/min pendant 1 min et le surnageant est récupéré.

L'activité de la luciférase est ensuite mesurée à l'aide d'un luminomètre Lumat LB 9507 (Berthold

France SA) en ajoutant 20 μ l du surnageant dans 100 μ l de tampon luciférase. La lumière produite par la réaction des deux substances est acquise pendant 10 sec.

La quantité totale de protéines contenu dans le surnageant est mesurée en utilisant un kit "Micro BCATM Protein Assay" (Pierce, Perbio Science France SAS). Le résultat final est enfin exprimé en picogramme de luciférase par microgramme de protéines totales.

6.2.5.2. *In vivo*

Les souris sont sacrifiées 2 jours après le traitement par EGT. Les muscles sont retirés et plongés dans 1 ml de tampon de lyse dans lequel est rajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche, Mannheim, Allemagne). Puis les muscles sont broyés puis centrifugés à 12.000 tr/min pendant 10 min à 4 °C. L'activité de la luciférase est ensuite mesurée à l'aide d'un luminomètre Lumat LB 9507 en ajoutant 20 μ l du surnageant dans 100 μ l de tampon luciférase. La lumière produite par la réaction des deux substances est acquise pendant 10 sec.

Le résultat final est exprimé en picogrammes de luciférase par milligrammes de muscle.

6.3. Visualisation de la perméabilisation cellulaire *in vitro* par suivi de fluorescence

Afin de pouvoir visualiser les effets de nsPEF sur la perméabilisation cellulaire, nous avons mis au point un système simple d'observation et de suivi de fluorescence sous microscope, dans le but de visualiser la cartographie de champ électrique associée à l'exposition d'impulsions ultra-courtes.

6.3.1. Prototype millimétrique

Ces systèmes sont constitués de deux électrodes plates de cuivre de 1 cm de largeur sur $450\ \mu\text{m}$ de hauteur fixées sur une lame de verre de microscope de $25 \times 75\ \text{mm}^2$ (voir figure 6.6). L'écartement entre les électrodes est de 1 ou 2 mm.



FIG. 6.6 : Système pour la visualisation de la perméabilisation cellulaire. (a) 1 mm et (b) 2 mm d'espace inter-électrodes.

6.3.2. Utilisation d'un marqueur fluorescent

Avant d'être placées dans ce système, les cellules (DC-3F) sont incubées pendant 1 heure en présence de $3\ \mu\text{M}$ de calcéine-AM (Sigma-Aldrich, L'Isles d'Abeau Chenes, France) dans du milieu complet. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis décollées avec de la trypsine-EDTA. Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans un mélange de STM et de 2 % d'agar (basse température de fusion). Cette solution permet de maintenir les cellules en place une fois que le gel d'agar s'est solidifié.

La suspension cellulaire est alors placée entre les électrodes du système puis le tout est recouvert d'une lamelle de microscope pour refermer le canal. Un train de 1.000 impulsions de 10 ns à une fréquence de répétition de 10 Hz est alors appliqué à diverses amplitudes permettant de couvrir des champs électriques de 15 à 100 kV/cm. Ces impulsions ont été générées par un générateur similaire à celui utilisé pour l'optimisation du transfert de gènes.

6.3.3. Suivi de la fluorescence et cartographie de la distribution de champ électrique

Pour suivre l'évolution de la fluorescence de la calcéine dans les cellules, le système contenant les cellules est placé sous un microscope à épifluorescence. Une image est prise avant l'exposition aux impulsions électriques pour connaître le niveau initial de fluorescence. Puis une série d'images prises toutes les minutes est acquise durant 20 min. Les images sont ensuite analysées et traitées à l'aide d'une routine développée sous MatlabTM.

Les images acquises sont sauvegardées en niveau de gris (figure 6.7-a). Sur toutes les images, le côté gauche correspond à l'électrode connectée à la sortie positive du générateur, et le côté droit à la sortie négative du générateur. La largeur de l'image représente la position dans le canal, d'une électrode à l'autre.

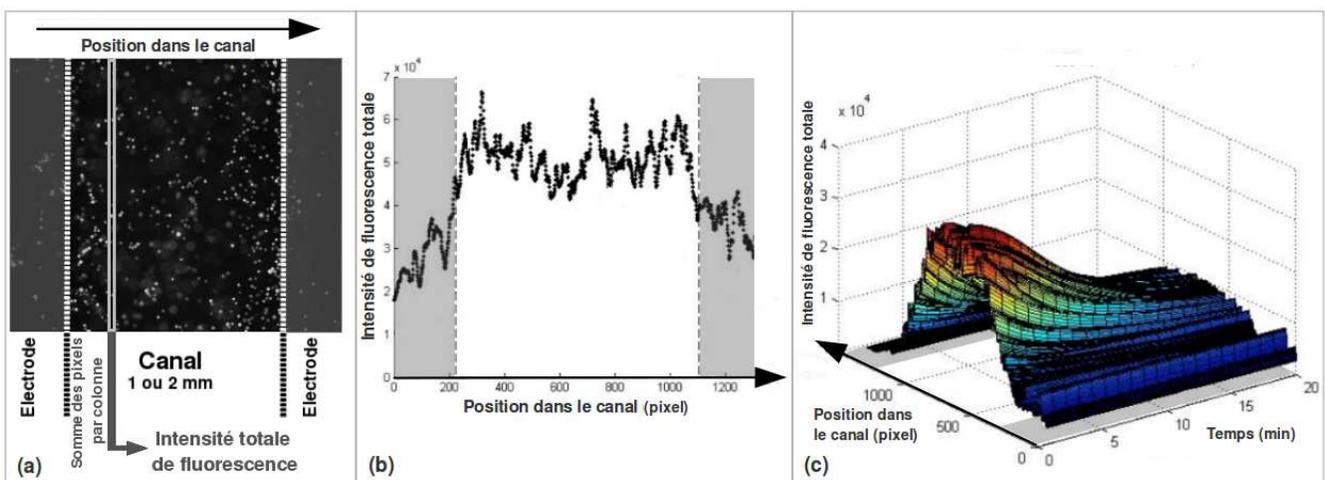


FIG. 6.7 : Suivi de fluorescence - Principe et routine d'analyse. (a) Image-type de cellules chargées en calcéine positionnée dans un canal séparant deux électrodes de 1 ou 2 mm selon l'expérience. Sur toute la largeur du canal, les valeurs de chaque pixel sont sommées sur toutes les colonnes. On obtient alors la courbe de l'intensité totale de fluorescence selon la position dans le canal (b). Lorsque l'on fait l'acquisition au cours du temps de ces images, on peut alors obtenir une surface en 3D représentant l'évolution de la fluorescence dans le canal au cours du temps (c).

Les données graphiques représentées en 2D (figure 6.7-b) sont :

- en X, la position dans le canal ;
- en Y, la somme de chaque niveau de gris de chaque pixel accumulé sur toute la hauteur de l'image, en fonction de la position dans le canal (largeur des images), représentant l'intensité totale de fluorescence récoltée sur une une colonne de l'image.

Les données graphiques représentées en 3D (figure 6.7-c) sont :

- en X, le temps d'acquisition ;
- en Y, la position dans le canal ;

- en Z, la somme de chaque niveau de gris de chaque pixel accumulé sur toute la hauteur de l'image, en fonction de la position dans le canal (largeur des images), représentant l'intensité totale de fluorescence récoltée sur une colonne de l'image.

6.4. Electrochimiothérapie nouvelle *in vivo*

Dans le cadre de l'électrochimiothérapie par de nouvelles méthodes d'exposition, les mêmes souris (C57Bl/6) et lignées cellulaires (LPB) que dans le cas de l'électrotransfert de gènes ont été utilisées.

6.4.1. Modèles de tumeurs murines

Les souris sont inoculées avec 10^6 cellules LPB dans le flanc gauche. Le traitement est appliqué lorsque les tumeurs ont atteintes un diamètre moyen de 3 à 5 mm. Les mesures des tumeurs sont ensuite effectuées régulièrement en mesurant les deux diamètres perpendiculaires les plus grands (notés a et b). Le volume total est ensuite calculé à l'aide de la formule suivante : $V = a \cdot b^2 \cdot \pi/6$.

6.4.2. Traitement par impulsions ultra-courtes

Dix ou cent microgrammes de bléomycine (Roger Bellon, Neuilly, France) sont injectés par voie retro-orbitale dans les souris anesthésiées comme déjà mentionné plus haut. Quatre minutes après l'injection, un train de 1.000 ou 3.000 impulsions ultra-courtes (10 ns) sont appliquées par l'intermédiaire d'électrodes planes isolées par $10 \mu\text{m}$ de parylène et espacées de 6 mm placées autour de la tumeur. L'amplitude des impulsions est comprise entre 6 et 12 kV et la fréquence de répétition comprise entre 1 et 100 Hz. Du gel conducteur est utilisé pour (i) garantir une meilleure transition entre les divers milieux traversés et (ii) éviter les claquages dans l'air entourant la tumeur.

6.4.3. Suivi de croissance tumorale

Les tumeurs sont ensuite mesurées chaque 2 ou 3 jours, comme indiqué précédemment. Le résultat est ensuite exprimé en croissance tumorale représentant le rapport du volume tumoral au jour J sur le volume tumoral initial à J0.

6.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism[®] version 4. Les résultats sont la moyenne de plusieurs points \pm l'écart-type (SD). Pour les variables discontinues, l'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un test de Student (t-test). Concernant les mesures répétées, l'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA).

Notations des statistiques : différence non significative **NS**, différence significative avec $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

PARTIE IV

RÉSULTATS

OPTIMISATION DE L'ÉLECTROTRANSFERT DE GÈNES

RAPPORTEURS *in vitro* ET *in vivo*

Le transfert de gènes par l'intermédiaire d'impulsions électriques est une technique déjà largement répandue en recherche et déjà utilisée dans certains protocoles cliniques. Cependant, cette méthode physique de transfert est souvent malmenée par les défenseurs du viral (insertion du gène thérapeutique à l'aide d'un virus inactivé), pour la simple et bonne raison de sa faible efficacité de transfection comparée aux vecteurs viraux. Pourtant, la méthode électrique a l'avantage de ne pas causer de réactions immunitaires et de ne pas être limitée en termes de taille de l'ADN électrotransféré. Aussi l'un des challenges des équipes travaillant sur des méthodes physiques de transfert de gènes est de pouvoir atteindre cette efficacité.

Dans cette optique et en s'appuyant sur des expériences du groupe américain de K.H. Schoenbach, notre équipe s'est penché sur l'utilisation d'impulsions électriques ultra-courtes, appelées nanopulses (ou nsPEF), ayant la capacité d'affecter essentiellement les vésicules internes des cellules. L'utilisation de ces champs électriques intenses (10 à 150 kV/cm) et de courte durée (1 à 300 ns) a permis d'augmenter d'un facteur 3 l'efficacité de transfection de plasmides.

Nous avons alors exploré les effets potentiels des nsPEF sur l'efficacité de l'EGT. Nous nous sommes penchés plus particulièrement sur la contribution de ces impulsions dans l'entrée de l'ADN à l'intérieur de cellules en culture, à son transport par les pores nucléaires, à son expulsion des endosomes et à l'augmentation de l'efficacité de transfection due à un relargage de calcium intracellulaire depuis les vésicules de stockage (réticulum endoplasmique...). Cette étude aura permis de mettre en avant les paramètres essentiels pour obtenir une augmentation d'un facteur 3 *in vitro* et pouvoir par la suite débiter des expériences *in vivo*. Nous avons étudié, dans un second test, l'effet de ces nouvelles impulsions appliquées par l'intermédiaire d'électrodes isolées sur l'augmentation de la production de luciférase dans des muscles de souris, avant ou après un électrotransfert "conventionnel".

7.1. Résultats *in vitro*

L'expérience consiste à transférer un plasmide codant pour la luciférase (pCMV-Luc) dans des cellules, en utilisant un protocole classique basé sur l'application d'impulsions permettant l'électroporation des membranes (2 HV de 1,25 kV/cm et de 100 μ s). Jusqu'à 20 impulsions ultra-courtes (nsPEF) de 10 ns à 60 kV/cm sont alors appliquées sur ces cellules plongées dans du milieu faiblement conducteur, 45 min à 60 min après l'EGT et à une fréquence de répétition pouvant aller de 1 à 300 Hz. Dans ces conditions, aucune perte cellulaire n'est à noter.

L'ensemble des données rapportées ici ont été produites à l'aide du même générateur de nsPEF et dans des cuvettes d'électroporation commerciales de 2 mm d'espace inter-électrodes (excepté lorsque cela est mentionné). Des solutions faiblement conductrices ont été utilisées à cause des limitations des générateurs.

7.1.1. Influence du nombre d'impulsions

Le premier point que nous avons étudié est l'influence du nombre de nsPEF appliqué sur la production de luciférase par les cellules. La figure 7.1 montre que l'application d'un train de 20 nsPEF à 60 kV/cm et à 1 Hz permet d'obtenir une augmentation significative d'un facteur 3 de l'activité de la luciférase, mesurée 24 h après le traitement, par rapport à l'EGT seul ($p < 0,05$), alors que 1 à 5 impulsions ne semblent pas suffisantes pour obtenir un quelconque effet.

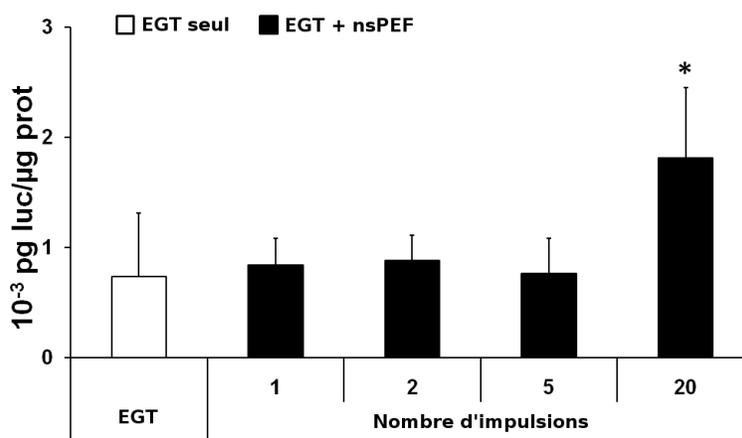


FIG. 7.1 : Influence du nombre d'impulsions sur la production de luciférase, mesurée 24 h après l'exposition de cellules DC-3F à un train de nsPEF (1 à 20) de 60 kV/cm, 45 minutes après l'EGT. Une augmentation d'un facteur 3 est à noter dans le cas de l'exposition à 20 nsPEF. Les barres sont la moyenne de 9 points et les barres d'erreur sont les déviations standards (SD).

7.1.2. Influence de la quantité d'ADN par cuvette

Nous avons ensuite voulu savoir si la quantité d'ADN présente dans la cuvette au moment du traitement influençait le résultat. Pour cela, les cellules ont été exposées à un train de 20 nsPEF de 10 ns à 45 kV/cm et à 1 Hz de fréquence de répétition, 60 min après l'EGT et en présence de différentes doses d'ADN. Dans tous les cas (0,5, 1, 2, 3 ou 4 μg d'ADN par cuvette), une augmentation de la production de luciférase a été notée par rapport au contrôle n'ayant subi qu'un EGT "conventionnel" pour les mêmes concentrations d'ADN (figure 7.2).

Alors que l'efficacité de l'EGT augmente continuellement avec la concentration d'ADN dans les cuvettes, l'addition de nsPEF cause une augmentation de l'efficacité seulement entre 0,5 et 2 μg d'ADN et semble arriver à un plateau à partir de 2 μg (pas de différence significative entre 2, 3 et 4 μg).

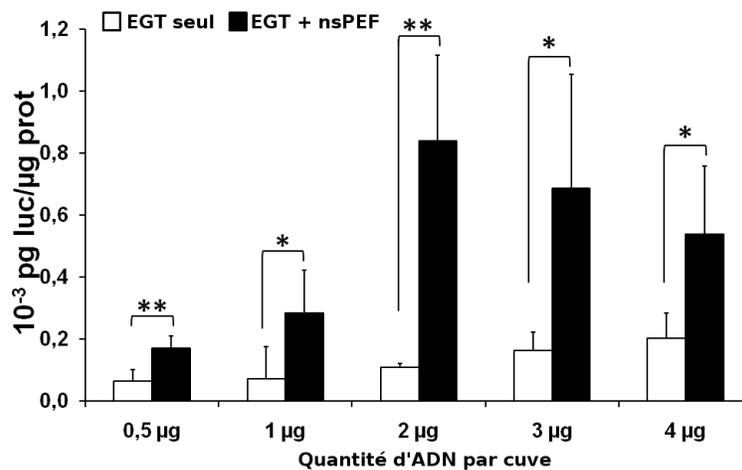


Fig. 7.2 : Influence de la quantité d'ADN sur la production de luciférase après application de 20 nsPEF de 45 kV/cm, 60 min après l'EGT. Dans tous les cas (0,5, 1, 2, 3 or 4 μg par cuvette), une augmentation de la production de luciférase est visible par rapport aux contrôles (EGT seul avec les mêmes concentrations d'ADN). Les barres sont la moyenne de 6 points et les barres d'erreur sont les déviations standards (SD).

7.1.3. Influence de la fréquence de répétition des impulsions

Il a été décrit précédemment que la fréquence de répétition des impulsions électriques pouvait avoir un impact sur certains événements cellulaires. Nous avons alors soumis des cellules à une série de 20 nsPEF de 45 kV/cm à différentes fréquences de répétition, 45 min après l'EGT. La figure 7.3 illustre les résultats obtenus. Une différence statistiquement significative ($p < 0,01$) a été notée entre 1 et 100 Hz. Au delà de cette fréquence et jusqu'à 10 kHz, les effets des nsPEF sur la production de luciférase sont indépendants de leur fréquence de répétition

Les résultats présentés en figures 7.1 (60 kV/cm) et 7.3 (45 kV/cm) montrent aussi que l'intensité

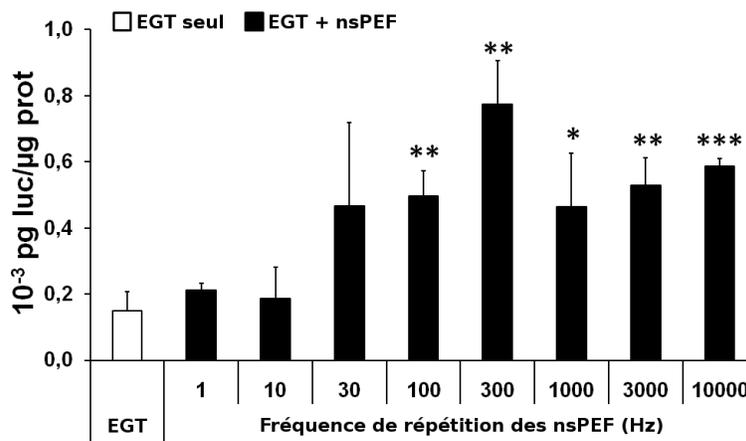


Fig. 7.3 : Influence de la fréquence de répétition d'impulsions ultracourtes sur la production de luciférase. Les cellules DC-3F sont exposées à 20 nsPEF de 45 kV/cm, 45 min après l'EGT. Les effets sont dépendants de la fréquence de répétition des impulsions (entre 100 Hz et 10 kHz). L'augmentation maximale est atteinte pour une fréquence de répétition de 300 Hz. Les barres sont la moyenne de 6 points et les barres d'erreur sont les déviations standards (SD).

des champs électriques utilisés est importante. Dans des conditions identiques (20 nsPEF, 1 Hz, 45 min après l'EGT) la production de luciférase est augmentée d'un facteur 3 avec une intensité de 60 kV/cm et seulement d'un facteur 1,5 avec une intensité de 45 kV/cm.

Une étude plus approfondie de l'effet de l'amplitude sur la production de luciférase n'a pu être réalisée, en raison de la limitation de l'amplitude pouvant être délivrée par les générateurs.

7.1.4. Influence du délai entre l'électrotransfert et l'application d'impulsions ultracourtes

Le rôle du délai laissé entre l'électrotransfert et l'application des nsPEF a aussi été étudié. Un train de 20 nsPEF à 60 kV/cm et à 1 hz de fréquence de répétition a été appliqué entre 30 et 120 min après l'EGT. Les contrôles ont aussi été incubés durant la même période pour être remis en culture en même temps que les cellules traitées. La figure 7.4 montre que ce délai, lorsqu'il est inférieur à 60 min, permet une augmentation significative ($p < 0,05$) d'un rapport entre 2,2 et 2,9 par rapport à l'EGT. Cependant, la quantité totale de luciférase produite n'est pas significativement différente selon le délai utilisé.

Ce résultat suggère que l'entrée d'ADN dans les cellules n'est pas augmentée par l'application de ce type d'impulsions. Cette conclusion est renforcée par des expériences complémentaires de cellules exposées uniquement à des nsPEF en présence de plasmides qui n'ont montré aucune production de luciférase après 24 h de remise en culture. Les mêmes effets ont aussi été notés *in vivo* (voir figure 7.6).

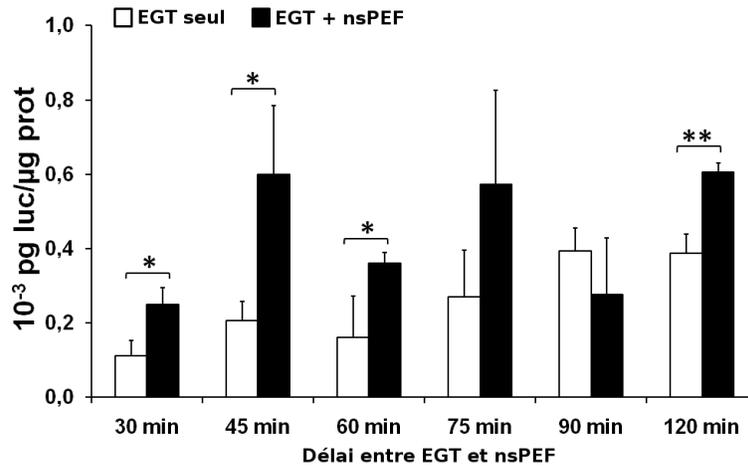


FIG. 7.4 : Influence du délai entre l'EGT et l'application d'impulsions ultra-courtes sur la production de luciférase. Un train de 20 nsPEF de 60 kV/cm est appliqué à une fréquence de répétition de 1 Hz sur des cellules après l'EGT. Quelque soit le délai entre l'EGT et l'exposition aux nsPEF, une augmentation de la quantité de luciférase produite est observée entre l'EGT seul ou suivi de nsPEF. Les barres sont la moyenne de 6 points et les barres d'erreur sont les déviations standards (SD).

7.2. Validation de l'utilisation d'électrodes isolées

L'utilisation d'électrodes isolées a d'abord été étudiée *in vitro* afin de savoir si les mêmes types d'effets étaient observables sur les cellules après l'application d'impulsions ultra-courtes à travers une couche isolante. L'expérience consistait en un électrotransfert de gènes codant pour la luciférase suivi ou non d'une exposition à un train de 20 nsPEF à l'aide (a) de cuvettes d'électroporation commerciales, où les électrodes étaient en contact avec le milieu de culture (45 kV/cm, 45 min après l'EGT) et (b) d'électrodes isolées avec du plastique, ne laissant ainsi aucun contact entre le métal et le milieu (30 kV appliqué sur 6 mm, correspondant à un maximum de 9 kV/cm dans le milieu - simulation FEM - 60 min après l'EGT).

La figure 7.5, qui montre les effets de la fréquence de répétition de 20 impulsions appliquées par l'intermédiaire d'électrodes isolées, est à comparer avec la figure 7.3, qui montre la même expérience mais réalisée dans des cuvettes commerciales (contact entre électrodes et milieu). Dans les deux cas, on note une augmentation de la quantité de luciférase produite par l'exposition à des nsPEF après un EGT. Un facteur d'augmentation d'environ 3 est atteint quelque soit la fréquence de répétition des impulsions. Dans ce cas en effet, on ne retrouve pas la dépendance de la fréquence et l'augmentation la plus importante se fait même à la plus faible des fréquences utilisées (1 Hz) alors qu'il fallait être au-dessus de 100 Hz dans le cas précédent.

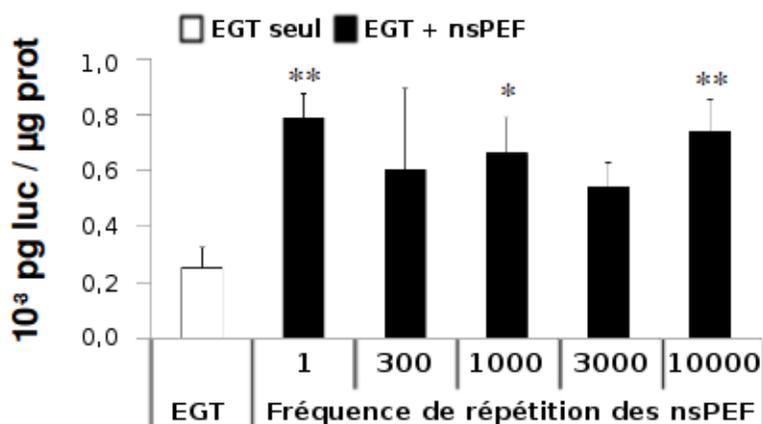


Fig. 7.5 : Validation de l'utilisation d'électrodes isolées *in vitro* pour l'exposition à des impulsions ultra-courtes. Les cellules ont été exposées dans des cuves de spectroscopie en plastique (espace inter-électrodes de 6 mm, épaisseur d'isolant de 0,5 mm) à 20 nsPEF de 30 kV, 45 min après l'EGT (correspondant à 9 kV/cm dans le milieu). Les effets obtenus sont dépendants de la fréquence de répétition et montrent une augmentation significative de la production de luciférase par rapport à l'EGT seul à partir d'une fréquence de 100 Hz. L'augmentation maximale est obtenue pour une fréquence de 300 Hz. Dans ces conditions, aucune perte cellulaire n'a été notée. Les barres sont la moyenne de 6 points et la barre d'erreur est la déviation standard (SD).

7.3. Augmentation de l'efficacité de l'électrotransfert de gènes *in vivo*

Après avoir montré que l'exposition de cellules *in vitro* par le biais d'électrodes isolées était possible et rendait encore plus sûre l'application de ces champs intenses en limitant d'une part les effets électrochimiques et d'autre part ceux de l'effet Joule, nous nous sommes intéressés à l'exposition de tissus *in vivo*.

Dix microgrammes de plasmide codant pour la luciférase ont été injectés dans le *tibialis cranialis* de souris C57Bl/6. L'injection a été soit "rapide" (de 1 ou 2 secondes), soit "lente" (plus de 30 secondes) pour injecter 20 µl de solution d'ADN par patte de souris. Les muscles ont été retirés 2 jours après le traitement qui consistait en l'application d'un train de nsPEF (30.000 impulsions, 10 ns, 300 Hz, 30kV, 8 mm, 36 kV/cm) seul, avant ou après un EGT "conventionnel" (1 impulsion "haute tension" de 800 V/cm et 100 µs de durée suivi 1 s plus tard de 1 impulsion "basse tension" de 80 V/cm et de 100 ms ou 400 ms de durée selon que l'injection soit lente ou rapide). Dans tous les cas d'exposition, aucun effet néfaste n'a pu être observé sur les muscles par analyse histologique. Aucune contraction des muscles lors de l'application des impulsions électriques n'a été observée.

La figure 7.6 montre la comparaison entre une injection "rapide" seule et l'ajout de différents trains d'impulsions "longues" ou/et "ultra-courtes". Dans les muscles exposés seulement aux nsPEF (INJ+NP), il n'y a pas de différence significative par rapport à l'injection seule (INJ). Ce premier résultat concorde

avec les résultats *in vitro* obtenus lorsque l'on applique uniquement des impulsions ultra-courtes sur des cellules en présence de plasmides. Ce type d'impulsions ne permet pas de déstabiliser suffisamment la membrane plasmique pour laisser entrer de l'ADN à l'intérieur.

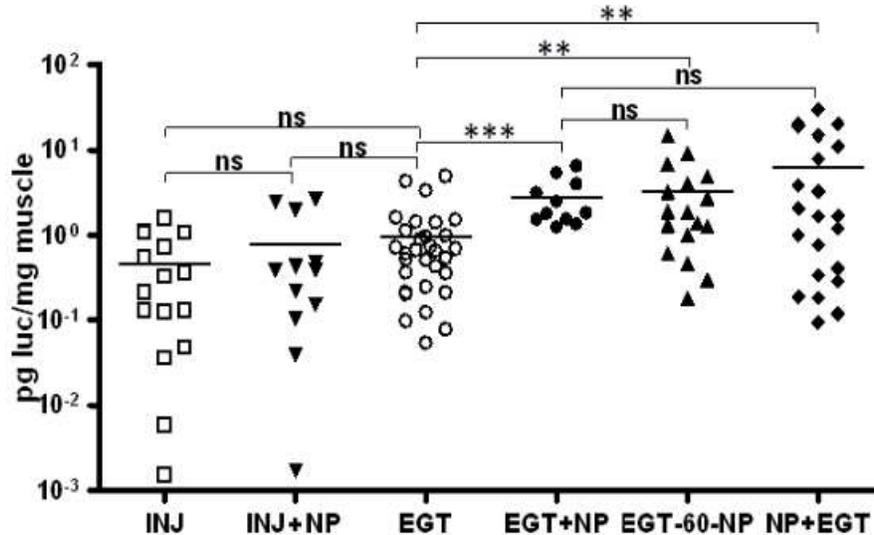


FIG. 7.6 : Augmentation de la production de luciférase *in vivo* après exposition à des impulsions ultra-courtes. Cas d'une injection rapide (entre 1 et 2 s pour injecter 100 μ l de solution contenant 10 μ g d'ADN. Un train de 30.000 nsPEF de 10 ns à 36 kV/cm (30kV, 8 mm) et à une fréquence de 300 Hz est appliqué juste avant, juste après ou 60 min après un EGT.

Quand les nsPEF sont appliquées juste après l'EGT, une augmentation significative d'un facteur 3 est observée (EGT+NP). De même lorsque ces impulsions sont appliquées juste avant l'EGT, une augmentation d'un facteur 6 de la production de luciférase est obtenue (NP+EGT). Une augmentation non significative d'un facteur 2 est aussi observée lorsque les nsPEF sont appliquées 60 min après l'EGT (EGT-60-NP). Concernant l'EGT, dans ces conditions non optimales d'exposition, pas d'augmentation de la production de luciférase n'est observée, comme attendu après une injection rapide.

Dans le cas d'une injection "lente" (voir figure 7.7), l'augmentation de la quantité de luciférase produite n'atteint qu'un facteur 2 après exposition à des nsPEF (EGT+NP) par rapport à l'EGT seul.

Les conditions décrites ici pour obtenir des effets *in vivo* sont très différentes de celles permettant d'obtenir les mêmes ordres de grandeur d'augmentation de la production de luciférase *in vitro*. En effet, alors que 20 nsPEF suffisent *in vitro* pour obtenir un facteur 3 d'augmentation, il est nécessaire d'appliquer ici des milliers d'impulsions du même type. Cette différence notable peut être due au couplage différent entre le milieu biologique (ici du tissu) et l'isolation (ou non, dans le cas *in vitro*) des électrodes. Cependant, le même type d'effet a été relevé lors de l'application d'un train de 20 impulsions à différentes fréquences de répétition sur des cellules exposées à travers un isolant.

Il est toutefois à noter que malgré cette différence, qui peut être due tout simplement à la complexité d'un tissu par rapport à un groupe de cellules en solution (en terme d'agencement des cellules, de possi-

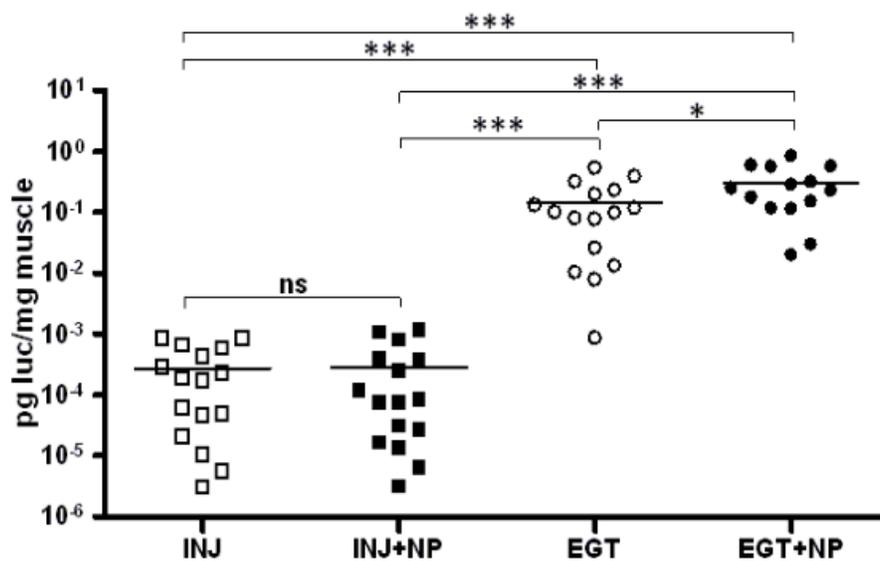


FIG. 7.7 : Augmentation de la production de luciférase *in vivo* après exposition à des impulsions ultra-courtes. Cas d'une injection lente (plus de 30 s pour injecter 100 μ l de solution contenant 10 μ g d'ADN. Un train de 30.000 nsPEF de 10 ns à 36 kV/cm (30kV, 8 mm) et à une fréquence de 300 Hz est appliqué juste après un EGT.

bilité de passage d'un courant à l'intérieur d'un muscle par exemple), une augmentation non négligeable de la production de luciférase par un facteur 3 à 6 (selon les conditions) a pu être produit et reproduit par le biais d'électrodes isolées.

7.4. Données complémentaires

Deux types de données complémentaires sont rapportées ici :

- des expériences préliminaires qui n'ont pas été validées comme celles qui ont déjà été présentées dans ce chapitre ;
- des expériences effectuées par ou en collaboration avec d'autres membres de l'équipe de recherche.

7.4.1. Influence de la distance inter-électrodes sur la production de luciférase

Plusieurs types de cuvettes commerciales d'électroporation existent, ayant des espaces inter-électrodes différents (généralement 1, 2 ou 4 mm). Afin de pouvoir balayer une plus grande plage d'intensité de champ électrique à l'aide des générateurs à notre disposition (ayant une amplitude limitée en fonction de la charge appliquée), nous avons réalisé des expériences en utilisant des cuvettes de 1 et de 2 mm d'espace inter-électrodes.

La figure 7.8 montre la production de luciférase après exposition de cellules à des trains de 1 à 20 nsPEF dans des cuvettes de 1 mm ou de 2 mm d'espace inter-électrodes. Les cuvettes de 1 mm sont remplies de 50 μ l de solution contenant des cellules et les cuvettes de 2 mm de 100 μ l de cette même solution. Une augmentation significative de la production de luciférase a pu être observée lors de l'exposition à une seule impulsion dans le cas de cuvette de 1 mm, alors qu'il faut 20 impulsions pour obtenir un effet significatif dans des cuvettes de 2 mm.

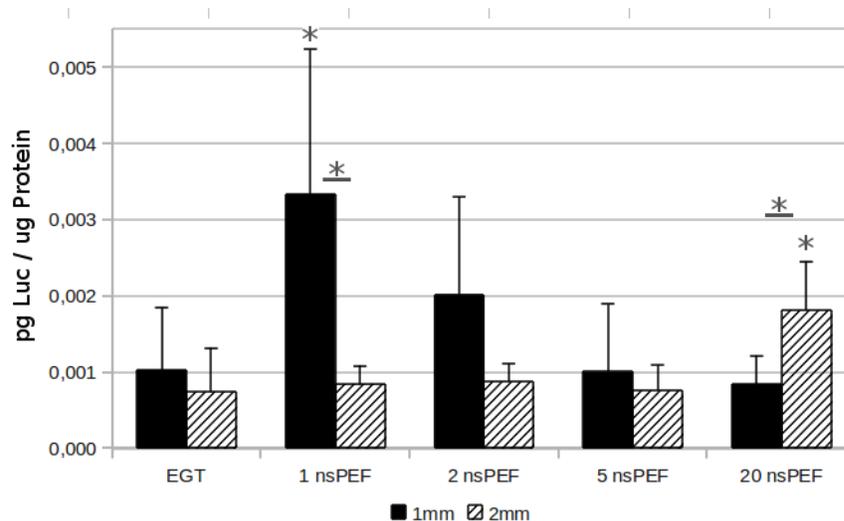


FIG. 7.8 : Influence de la distance inter-électrodes sur la production de luciférase. Une seule impulsion permet d'obtenir une augmentation significative dans le cas de cuvettes de 1 mm, alors qu'il est nécessaire d'appliquer 20 impulsions dans le cas de cuvettes de 2 mm. Les barres sont la moyenne de 4 points et la barre d'erreur est la déviation standard (SD).

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, nous nous sommes penchés sur les caractéristiques électriques

de ces deux types de cuvettes. Dans un premier temps, nous avons procédé à un relevé d'impédance de ces deux types de cuvettes remplies respectivement par 50 et 100 μl de la même solution. Aucune différence ne pouvant entraîner une telle variation n'a été relevée dans la gamme de fréquence 100 Hz à 100 MHz. A partir du contenu spectral des impulsions et l'impédance des cuvettes, l'énergie délivrée par les impulsions dans les cuvettes a été calculée. Mais là encore aucune différence n'a pu être observée.

Dans un second temps, nous avons modélisé ces cuvettes par la méthode des éléments finis, afin de vérifier si la différence observée dans la production de luciférase selon la distance inter-électrodes pouvait provenir d'une différence dans la distribution du champ électrique à l'intérieur du milieu contenant les cellules. Dans les deux cas, la distribution était homogène dans l'ensemble du volume de la cuvette, n'expliquant encore pas les résultats biologiques obtenus. Cependant, le modèle utilisé pour analyser la distribution du champ électrique est un modèle statique (ou quasi-statique) ne prenant pas en compte la propagation du signal dans le milieu, par exemple.

Par manque d'outils adaptés, cette analyse a été mis en suspens pendant un temps. Les expériences biologiques qui ont suivi ont toutes été effectuées dans le même type de cuvette (2 mm) en tenant compte du fait que 20 nsPEF étaient nécessaires pour obtenir un effet sur la production de luciférase.

7.4.2. Rôle des nsPEF dans l'ouverture des pores nucléaires

Nous avons débuté l'exploration des différentes cibles intracellulaires possibles que pouvaient affecter les nsPEF, en commençant par le noyau cellulaire. Les cellules ont été exposées 30 min après un EGT à du trans-cyclohexane-1,2-diol (TCHD) (40 mM) et/ou à un train de 20 nsPEF (100 kV/cm, 10 ns, 300 Hz). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 7.9. Dans le cas d'une exposition au TCHD seul (EGT+TCHD), une augmentation d'un facteur 1,6 dans la production de luciférase a pu être observée par rapport à l'EGT seul (EGT). Les cellules exposées seulement à des nsPEF (EGT+nsPEF) montrent une augmentation d'un facteur 2,5 dans la production de luciférase par rapport à l'EGT seul, ce qui est similaire à l'augmentation dans le cas de l'exposition à du TCHD seul. Quand les cellules sont successivement exposées au TCHD puis aux nsPEF, la production de luciférase est statistiquement augmenté d'un rapport 2 par rapport à l'exposition au TCHD seul et d'un rapport 1,3 par rapport à l'exposition aux nsPEF seuls. Lorsque les cellules sont exposées au TCHD puis aux nsPEF, une synergie de ces deux méthodes apparaît et une augmentation d'un rapport 2 par rapport à l'exposition au TCHD seul a pu être observée.

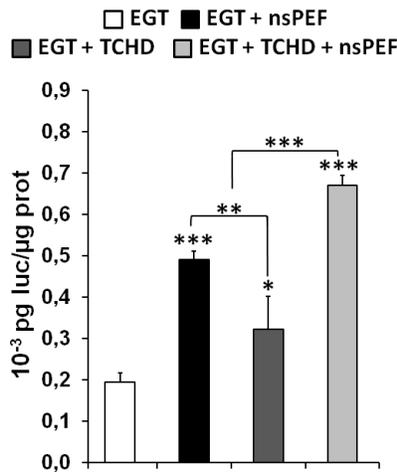


FIG. 7.9 : Exposition de cellules à du trans-cyclohexane-1,2-diol (TCHD) (40 mM) 30 min après un EGT avec (EGT+TCHD+nsPEF) ou sans (EGT+TCHD) exposition à des nsPEF (20 nsPEF, 100 kV/cm, 10 ns, 300 Hz). L'exposition à du TCHD seul a permis d'obtenir une augmentation d'un facteur 1,6 de la production de luciférase par rapport à l'EGT et l'exposition à des nsPEF une augmentation d'un facteur 2,5. Lorsque les cellules sont exposées au TCHD puis aux nsPEF, une synergie de ces deux méthodes apparaît et une augmentation d'un rapport 2 par rapport à l'exposition au TCHD seul a pu être observée. Les barres sont la moyenne de 4 points et la barre d'erreur est la déviation standard (SD).

7.5. Discussion

A travers les résultats décrits dans ce chapitre, nous avons montré qu'il était possible d'augmenter de façon significative la production de luciférase en appliquant un nouveau type d'impulsions ultra-courtes avant ou après un électrotransfert de plasmides. Cette approche permet ainsi d'augmenter l'efficacité de cette méthode physique de transfert de gènes. Que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, l'exposition à des impulsions ultra-courtes de cellules ou de tissus a montré qu'il était possible d'augmenter d'un facteur 3 à 6 et de façon significative la quantité de luciférase produite par rapport à un EGT standard.

En considérant les cibles potentielles des nsPEF (Schoenbach *et al.*, 2001; Beebe *et al.*, 2003b; Tekle *et al.*, 2005; Vernier *et al.*, 2008; Scarlett *et al.*, 2009), nos résultats suggèrent que ces impulsions n'ont pas d'effet sur l'entrée de l'ADN dans les cellules, par exemple en modifiant fortement la perméabilité de la membrane. Cette hypothèse se vérifie par le fait que le délai entre l'EGT et l'exposition aux nsPEF ne semble pas crucial d'une part, alors que l'entrée d'ADN dans les cellules en culture se fait en 1 min l'application des impulsions électriques (Rols et Teissié, 1990), et que d'autre part l'entrée de plasmides dans les cellules ne se fait pas en ne les exposant qu'à des nsPEF. Des résultats complémentaires, faisant intervenir une molécule connue pour augmenter l'efficacité de transfection en rendant l'enveloppe nucléaire plus perméable (Vandenbroucke *et al.*, 2007), ont aussi permis d'écarter le fait que le noyau pourrait laisser entrer une plus grande quantité d'ADN par application de nsPEF. Des études plus poussées sont

tout de même nécessaires pour rejeter complètement cette hypothèse. Les résultats *in vivo* semblent aussi suggérer que les nsPEF ne favorisent pas l'accumulation de plasmides par le biais d'endosomes (comme cela sera discuté par la suite). Des impulsions nsPEF délivrées avant l'EGT donnent de meilleurs résultats que des impulsions nsPEF délivrées après.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer les effets que nous avons pu observer pourrait être une modification transitoire de la concentration calcique à l'intérieur de la cellule, conséquence directe d'une déstabilisation des membranes internes, en particulier celles des réservoirs à calcium du réticulum endoplasmique. Cette voie, déjà largement évoquée et étudiée (Vernier *et al.*, 2003; Beebe *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2007; Vernier *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008), pourrait en effet être envisagée comme médiatrice des effets observés sur l'augmentation de la production de luciférase après application d'impulsions ultra-courtes, bien que la relation qu'il peut exister entre ces deux phénomènes ne soit pas encore claire. Mais certains de nos résultats vont dans ce sens et montrent une augmentation transitoire de la concentration de calcium intracellulaire lors de l'exposition de cellules à des nsPEF.

Il peut aussi être intéressant de comparer les expériences *in vivo* précédées d'une injection rapide ou lente d'ADN. Une injection rapide d'ADN dans le muscle (entre 1 et 2 s) permet d'obtenir de bons niveaux de transfection, comme précédemment montré par André *et al.* (2006). Des quantités similaires de luciférase ont été mesurées avec ou sans l'EGT, lorsqu'une injection rapide a été réalisée et que les paramètres électriques de l'EGT sont suboptimaux (1 LV de 100 ms seulement, voir Satkauskas *et al.* (2005)).

Mais pour obtenir un effet sur le transfert de gènes par application de nsPEF, il est nécessaire dans tous les cas que ces impulsions soient accompagnées d'une exposition des cellules ou des tissus à des impulsions perméabilisantes, permettant ainsi l'entrée d'ADN dans le cytoplasme et non pas seulement son accumulation dans des endosomes. Les impulsions ultra-courtes semblent en effet insuffisantes pour perméabiliser la membrane à des objets aussi volumineux que de l'ADN (Beebe et Schoenbach, 2005; Vernier *et al.*, 2006a), de même que l'injection rapide, qui permet pourtant d'obtenir seule une bonne transfection d'ADN. Cependant, ce type de transfert par l'injection seule se fait principalement par endocytose par l'intermédiaire de récepteurs (André *et al.*, 2006). Avec une simple injection, il semblerait donc que l'ADN ne soit pas présent dans le cytoplasme lors de l'exposition aux nsPEF (ou dans un instant proche) contrairement à l'entrée de plasmides par le biais d'impulsions électriques perméabilisantes.

De cette analyse, on peut donc conclure que :

1. l'ADN doit être dans le cytoplasme au moment de l'application de nsPEF (ou peu après, comme le suggèrent nos résultats *in vivo*) ;
2. les nsPEF ne semblent pas affecter les endosomes ni le relargage de l'ADN qu'ils pourraient contenir.

Cette hypothèse implique aussi que lorsque l'on voudra utiliser d'autres méthodes de transfert de

gènes, qu'elles soient virales, biochimiques ou physiques, à la place de l'électrotransfert, le délai d'application des nsPEF par rapport à la transfection devra être ajusté, ceci afin que les cellules soient exposées lorsque l'ADN est dans le cytoplasme ou dans son trajet vers le noyau. Les mêmes phénomènes ont déjà été observés et discutés par [Orlowski *et al.* \(1988\)](#) dans le cas de molécules activement transportées à travers la membrane de cellules exposées ou non à des impulsions électroperméabilisantes.

Un autre résultat important est la démonstration par l'expérience que les électrodes isolées permettent l'exposition à des impulsions ultra-courtes, comme annoncé par la théorie (chapitre 3). Cette nouvelle méthode d'exposition n'est pas uniquement importante *in vivo*, en garantissant une application sûre d'impulsions électriques. Elle permet aussi de s'affranchir des effets électrochimiques pouvant intervenir lors de l'application d'une tension sur une solution électrolytique par le biais d'électrodes métalliques et ainsi :

- (i) de limiter la toxicité d'espèces réactives, en éliminant la possibilité de production de radicaux libres ou de relargage d'ions métalliques dans la solution contenant les cellules ([Friedrich *et al.*, 1998](#); [Kotnik *et al.*, 2001a](#));
- (ii) de garantir une bonne homogénéité du champ électrique sur toute la surface des électrodes, en empêchant la création d'irrégularités au niveau de cette surface par arrachage d'ions métalliques ([Saulis *et al.*, 2007](#)).

Cette remarque est d'autant plus importante dans le cas des microsystèmes (chapitre 8), le rapport de la surface de contact sur le volume à traiter devenant bien plus important. Ainsi, [Shafiee *et al.* \(2009\)](#) ont proposé l'utilisation d'électrodes sans contact direct avec le milieu biologique pour déplacer et trier des cellules par DEP.

D'autres effets concernant la fréquence de répétition des nsPEF ont été observés. Encore peu d'études se sont penchées sur le lien qu'il pouvait exister entre l'efficacité de transfection par EGT et la fréquence de répétition des impulsions ([Rols *et al.*, 1998](#); [Pucihar *et al.*, 2002](#)). Et les effets sembleraient différents entre des petites molécules (marqueur fluorescent ou bléomycine) et de l'ADN. Plus la fréquence de répétition augmente, moins la transfection d'ADN est efficace ([Faurie *et al.*, 2010](#)). Dans le cas de l'application de nsPEF, ce phénomène semblerait inversé et des fréquences supérieures à 100 Hz permettraient une meilleure augmentation de la production de la luciférase *in vitro*. Mais les mécanismes associés à cet effet restent encore à approfondir.

Le nombre d'impulsions ainsi que leur amplitude semblent aussi avoir de l'importance. De nombreuses expériences ont été réalisées en ce sens sans toutefois permettre de trouver une corrélation entre ces paramètres et l'efficacité du traitement. Toutefois, les effets observés ne sont pas associés à un quelconque phénomène thermique ni même à l'accumulation d'énergie déposée dans le milieu d'exposition. En effet, l'énergie délivrée par une impulsion idéale (temps de transition nuls) de 10 ns et d'amplitude de 10 kV sur une solution biologique présentant une impédance de 50 Ω est de 20 mJ. Si l'on considère que toute cette énergie est dissipée dans le milieu (capacité calorifique et masse volumique de l'eau et

conductivité de 1 S/m) dans un volume (20 μL) permettant d'obtenir une impédance de 50 Ω dans une cuvette de 1 mm d'espace inter-électrodes, l'élévation de température est de $2 \cdot 10^{-7}$ K.

Il est aussi à noter que les effets décrits dans cette thèse sont sensibles aux conditions d'exposition ainsi qu'aux générateurs d'impulsions utilisés. Diverses explications peuvent être avancées : des impédances de sortie différentes d'un générateur à l'autre (entraînant ainsi une différence de courant et de tension appliqués sur les cellules), la forme des impulsions qui peut elle aussi différer (en particulier les fronts de montée et de descente, porteurs de l'information haute fréquence qui peut transiter vers l'intérieur de la cellule).

Les réels mécanismes liés aux effets décrits dans ce chapitre sont donc encore loin d'être totalement élucidés, même si de plus en plus d'études expérimentales (Scarlett *et al.*, 2009) et *in silico* (Vernier et Ziegler, 2007; Hu et Joshi, 2009) voient le jour. Bien que nos résultats semblent promouvoir le fait que les nsPEF n'augmentent pas la perméabilité de la membrane plasmique à de l'ADN, la technique présentée ici permet d'augmenter encore l'efficacité de l'électrotransfert de gènes *in vitro* et *in vivo* et de rendre cette méthode de transfection physique toujours plus compétitive face aux vecteurs viraux. En rajoutant à cela la possibilité d'appliquer de façon sûre ce nouveau type d'impulsions, par l'intermédiaire d'électrodes isolées, il est alors possible d'envisager de nouvelles applications cliniques.

EXPOSITION DE CELLULES DANS DES MICROSYSTÈMES

Nous avons étudié l'effet des nsPEF sur la perméabilisation cellulaire dans les systèmes microfluidiques élaborés au cours de cette thèse. Pour cela, nous avons utilisé la calcéine comme marqueur de perméabilisation et nous avons mis en place une technique de suivi de fluorescence par relargage de ce marqueur après exposition à des impulsions électriques.

Nous avons alors comparé plusieurs configurations géométriques et différents paramètres électriques, à l'aide dans un premier temps de systèmes proches des cuvettes utilisées dans les expériences macroscopiques décrites dans le chapitre précédent. Une étude préliminaire a été lancée à partir de systèmes miniatures calqués sur les cuvettes d'électroporation commerciales utilisées jusqu'alors. Cette approche avait pour but de réaliser la cartographie du champ électrique appliqué sur la solution contenant des cellules et valider la possibilité d'appliquer des nsPEF à l'aide de microsystèmes. Pour cela, des cellules ont été chargées avec un marqueur fluorescent comme indicateur de perméabilisation et exposées à des nsPEF dans ces systèmes constitués de deux électrodes de cuivre fixées sur une lame de microscope et espacées de 1 ou 2 mm l'une de l'autre. Nous avons réalisé et testé, dans un second temps, les biopuces pour la visualisation en temps réel de l'effet des nsPEF sous microscope intégrant des électrodes épaisses isolées ou non.

8.1. Microsystèmes équipés d'électrodes non isolées

Des systèmes comprenant des électrodes en contact direct avec le milieu d'exposition contenant les cellules sont les plus couramment utilisés. Deux configurations ont été testées : la première basée sur les cuvettes d'électroporation commerciales, avec des espaces inter-électrodes de 1 ou 2 mm, et la seconde faisant appel aux biopuces présentées dans le chapitre 4.

Dans la première configuration, nous avons délibérément choisi d'utiliser des électrodes en cuivre afin d'anticiper la mise au point de microsystèmes intégrant des électrodes épaisses de cuivre (seule technologie disponible lors de la conception de ces biopuces). Les risques électrochimiques liés à l'utilisation de ce type d'électrodes sont connus et identifiables (comme le montre nos résultats, à proximité des électrodes).

8.1.1. Visualisation de la perméabilisation par suivi de fluorescence

Afin de comprendre les phénomènes impliqués et de visualiser l'effet du champ électrique apparaissant dans les cuvettes d'électroporation que nous utilisons dans les expériences d'électrotransfert de gènes, nous avons mis au point des systèmes élémentaires pour visualiser sous microscope l'effet d'impulsions électriques. Ces dispositifs sont présentés dans le paragraphe 6.3.1. Nous proposons par ailleurs une méthode de suivi de la perméabilisation cellulaire par fluorescence.

Les cellules ont été exposées à un train de 1.000 impulsions de 10 ns à une fréquence de répétition de 10 Hz dans des systèmes ayant un écartement inter-électrodes de 1 ou 2 mm. Les caractéristiques de sortie du générateur de nsPEF utilisé permettent d'appliquer des amplitudes de champs électriques :

- entre 45 et 130 kV/cm dans le cas d'une distance inter-électrodes de 1 mm ;
- entre 15 et 45 kV/cm dans le cas d'une distance inter-électrodes de 2 mm.

La figure 8.1 montre le niveau de fluorescence le long du canal avant (ligne discontinue) et 2 min après (ligne continue) l'exposition de cellules DC-3F dans 4 conditions différentes : 45 kV/cm (a), 80 kV/cm (b), 100 kV/cm (c) and 130 kV/cm (d). La perte de fluorescence n'est pas régulière le long du canal et semble dépendre du niveau de champ appliqué. De plus, elle est plus prononcée près des électrodes que dans le milieu du canal. Cet effet, attendu, est essentiellement dû aux réactions électrochimiques à l'interface entre le milieu et les électrodes. Il apparaît aussi qu'elle est un peu plus marquée du côté de l'électrode négative (côté droit), en particulier pour de hautes intensités de champ (figure 8.1-d). Là encore, ce résultat asymétrique peut être expliqué par une différence d'espèces chimiques présentes à l'anode et à la cathode, ainsi qu'à une différence de pH entre les deux pôles.

La figure 8.2 montre l'évolution de la fluorescence pendant 20 min, dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. On peut d'ailleurs remarquer le même phénomène qu'auparavant : la perte de fluorescence n'est pas homogène sur toute la largeur du canal. De plus, la diminution du niveau de fluorescence au cours du temps est bien plus rapide près des électrodes que dans le milieu du canal.

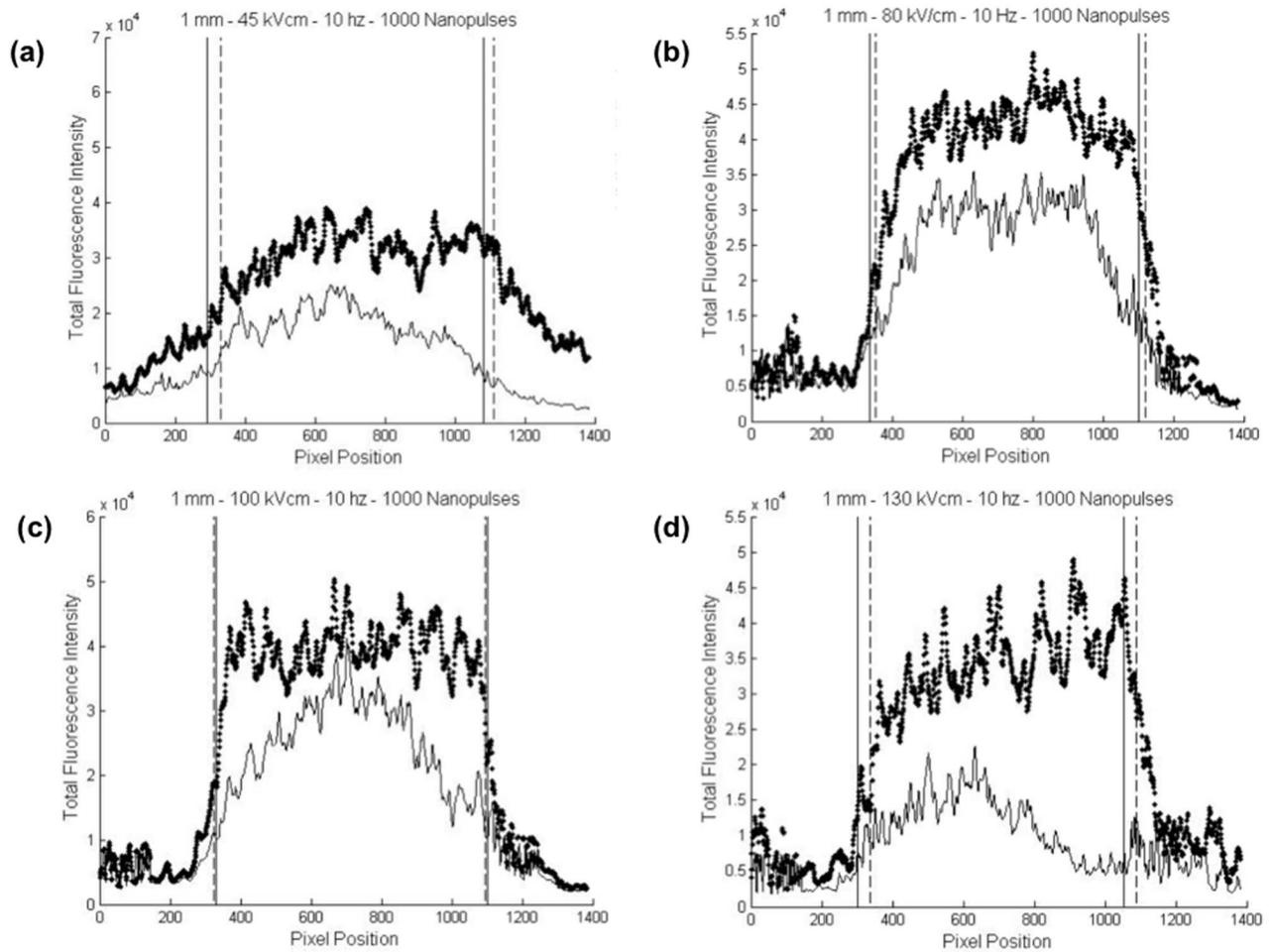


FIG. 8.1 : Niveau de fluorescence avant (ligne discontinue) et 2 min après (ligne continue) l'exposition de cellules marqués à la calcéïne à un train de 1.000 nsPEF de 10 ns à une fréquence de répétition de 10 Hz, dans un microsystème ayant une distance inter-électrodes de 1 mm. Quatre intensités de champ électrique ont été testées : 45 kV/cm (a), 80 kV/cm (b), 100 kV/cm (c) et 130 kV/cm (d).

Dans une seconde série d'expériences, nous nous sommes aussi intéressés à l'influence de la distance inter-électrodes. Des cellules DC-3F ont alors été exposées dans les mêmes conditions que précédemment mais dans un système dont l'écartement inter-électrodes était de 2 mm au lieu de 1.

La figure 8.3 montre le niveau de fluorescence avant (ligne discontinue) et 2 min après (ligne continue) l'exposition des cellules à des trains d'impulsions d'une intensité de : 15 kV/cm (a), 22 kV/cm (b), 30 kV/cm (c) et 45 kV/cm (d). L'évolution de la fluorescence durant 20 min est aussi représentée pour une intensité de 22 kV/cm (e).

Dans tous les cas, on retrouve l'effet de bord observé dans la configuration précédente ainsi qu'une perte plus prononcée du côté droit (électrode reliée à la sortie négative du générateur). Cependant, l'inhomogénéité de la perte de fluorescence le long du canal n'est pas identique dans certaines conditions (22 kV/cm essentiellement - b) à celle relevée dans le cas d'une distance inter-électrodes de 1 mm. Alors

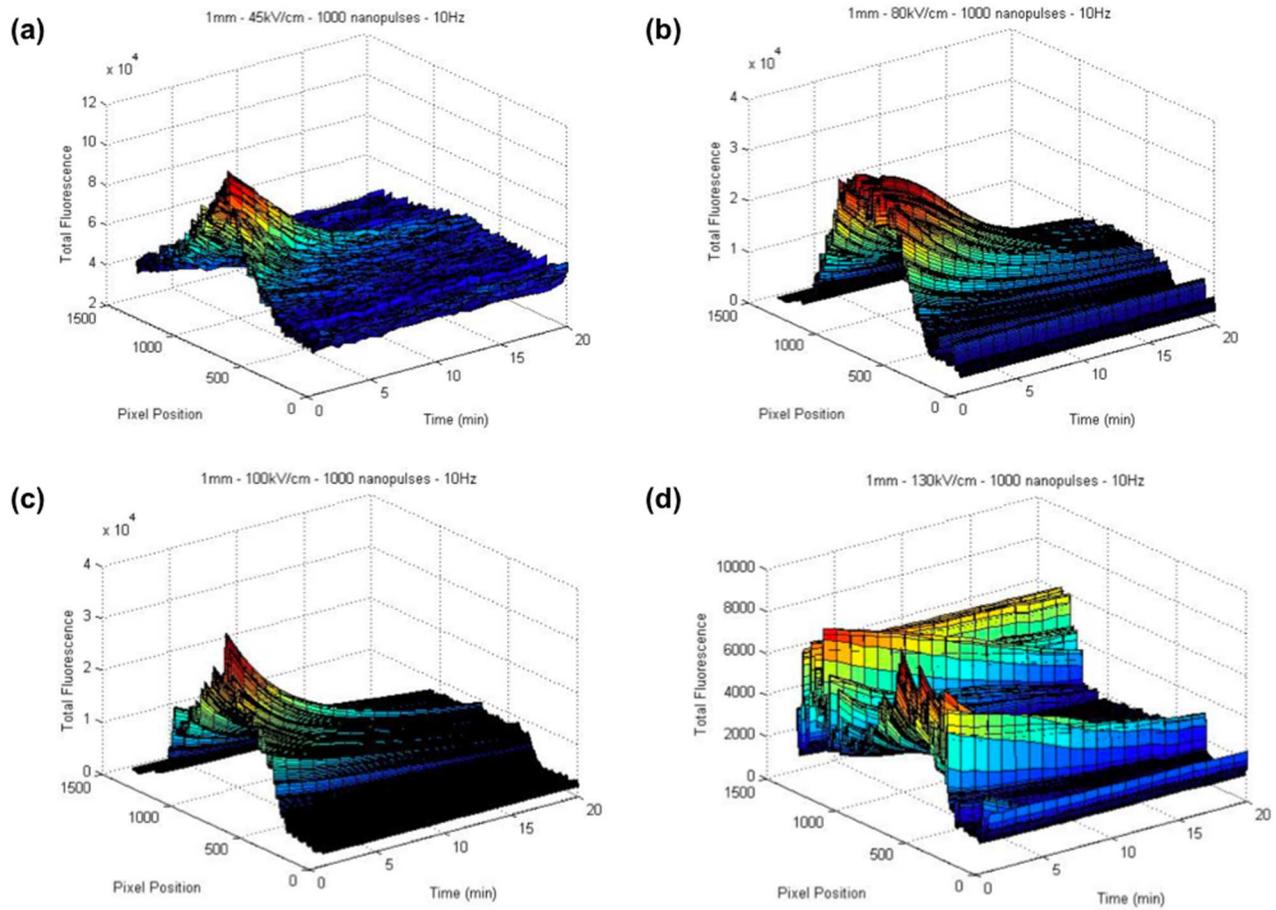


FIG. 8.2 : Evolution de la fluorescence pendant 20 min après l'exposition de cellules marqués à la calcéine à un train de 1.000 nsPEF de 10 ns à une fréquence de répétition de 10 Hz, dans un microsystème ayant une distance inter-électrodes de 1 mm. Des intensités de champ électrique identiques à celles de la figure précédente ont été testées : 45 kV/cm (a), 80 kV/cm (b), 100 kV/cm (c) et 130 kV/cm (d).

qu'un pic au centre du canal était observé auparavant, ici les maximaux d'intensité mesurés le long du canal ne se trouvent pas au centre. Cette observation est encore plus marquée sur la figure 8.3-e. La perte de fluorescence est quasi-instantanée (3 à 4 min) sur les bords ainsi qu'au centre du canal, alors que l'intensité de fluorescence n'a diminué que de moitié sur une zone latérale.

La perte de fluorescence est dans tous les cas à mettre en lien avec la perméabilisation de la membrane plasmique. Un train de 1.000 nsPEF de 10 ns entre 15 et 130 kV/cm appliquées à une fréquence de répétition de 10 Hz suffit à déstabiliser la membrane plasmique laissant ainsi fuir la calcéine emmagasinée par les cellules.

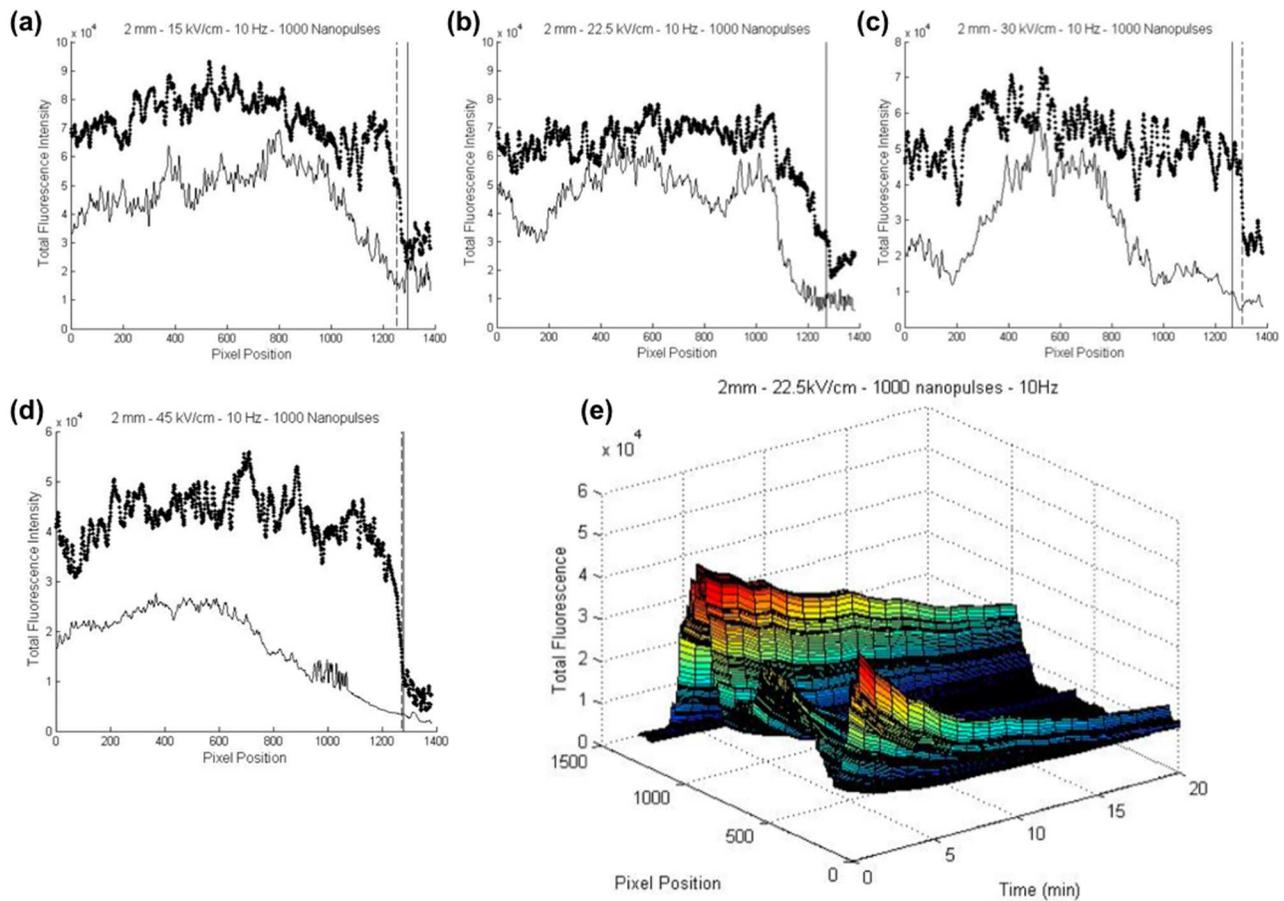


FIG. 8.3 : Niveau de fluorescence avant (ligne pointillée) et 2 min après (ligne continue) l'exposition de cellules marquées à la calcéine à un train de 1.000 nsPEF de 10 ns à une fréquence de répétition de 10 Hz, dans un microsystème ayant une distance inter-électrodes de 2 mm. Quatre intensités de champ électrique ont été testées : 15 kV/cm (a), 22 kV/cm (b), 30 kV/cm (c) et 45 kV/cm (d). Évolution de la fluorescence durant 20 min après l'exposition à une intensité de 22 kV/cm (e).

8.1.2. Article : Nanomanipulation de cellules vivantes par champs électriques en microsystème

J. VILLEMEJANE, G. MOTTET, O. FRANCAIS, B. LE PIOUFLE, J.P. LEFEVRE, M. WOYTA-SIK, E. DUFOUR-GERGAM et L.M. MIR

FIFTH IEEE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ELECTRONIC DESIGN, TEST & APPLICATIONS

Delta 2010, 229-232, 2010

Comme nous l'avons vu dans les chapitres 1 et 2, il existe une grande variété de conditions d'application d'un champ électrique permettant à ce dernier d'interagir avec les objets vivants. Qu'ils soient continus, pulsés ou alternatifs, chacun de ces champs induit un effet spécifique sur des cellules ou des molécules et sont couramment utilisés en biologie cellulaire ou moléculaire, et plus récemment dans des

traitements cliniques.

Dans cet article, sont présentés deux systèmes différents : le premier pour la capture de cellules par champ électrique (DEP) dans des microcanaux, dans l'optique de les faire fusionner, et le second pour l'électroperméabilisation de cellules en microsystèmes. Ces derniers résultats valident d'un point de vue électrique et biologique le biomicrosystème développé et présenté dans le chapitre 4.

Le procédé de fabrication détaillé du premier système, dédié à la fusion cellulaire, est présenté dans l'article en annexe 9.8 en page xxxvii.

Nanomanipulation of living cells on a chip using electric field

General concepts and microdevices

Julien Villemejeane, Guillaume Mottet, Olivier Français, Bruno Le Pioufle
CNRS SATIE
IFR d'Alembert, ENS Cachan
Cachan, France
julien.villemejeane@ens-cachan.fr,
guillaume.mottet@satie.ens-cachan.fr,
olivier.francais@satie.ens-cachan.fr,
bruno.lepioufle@satie.ens-cachan.fr

Jean-Pierre Lefèvre
CNRS PPSM
IFR d'Alembert, ENS Cachan
Cachan, France
jpl@ppsm.ens-cachan.fr

Marion Woytasik, Elisabeth Dufour-Gergam
CNRS UMR 8622
Institut d'Electronique Fondamentale
Orsay, France
Marion.woytasik@ief.u-psud.fr, elisabeth.dufour-gergam@ief.u-psud.fr

Lluis M. Mir
CNRS UMR 8121
Institut Gustave Roussy
Villejuif, France
luis.mir@igr.fr

Abstract— Direct continuous (DC), pulsed (PEF) or alternative (AC) electric fields are well-known to induce specific effects on living cells or on molecules (including DNA and proteins) and are commonly used in molecular or cellular biology, and more recently for clinical treatment. Pharmacological industries and medical research are interesting in the development of new tools permitting to understand biophysical or biochemical phenomena involved in some diseases. They will permit to analyze more precisely protein pathways, to treat a large number of cells or to perform a complete reaction or process with the same device. Miniaturization is the best way to achieve these goals by integrating a lot of functions on the same substrate and by using the capabilities to parallelize some process [1].

Here are presented recent results on active handling and treatment of cells in a microfluidic device. In particular we present recent achievements concerning cell fusion and electronanomanipulation.

Keywords: *electric field, electropermeabilization, dielectrophoresis, cell therapy, biochip*

I. ELECTRIC FIELDS AND BIOLOGY

A. From the positioning...

Cell handling on a biochip can be achieved by different methods: (a) passive positioning using different chemical surface treatment of the substrate or by adding some obstacle in order to create place with a high affinity for cell growing and (b) active technique such as optical trapping, magnetic or electric field-mediated trapping [2,3].

The active trapping using alternative electric fields is based on the capabilities of cells to be polarized at a microscopic scale (due to the dielectric behaviour of the plasma membrane that separates two conductive media – the extra-cellular medium and the cytosol). The phenomenon is described by the Clausius-Mossotti factor that links the different dielectric permittivity of the medium and of the polarizable particle and their conductivity. Depending on the frequency of the alternative electric field applied on a cell, a dielectrophoresis (DEP) force is achieved and the cell migrates to the maxima (positive DEP) or to the minima (negative DEP) of the electric field [4]. This technique can be useful for cell positioning in microfluidic devices in order to treat or analyze the cells with the same experimental conditions each time [5].

B. ...Through the treatment by membrane permeabilization...

Pulsed electric fields (PEF) are commonly used in molecular and cellular biology as a physical method of nucleic acids or drugs transfer in bacteria and cells [6].

Electric fields have also applications in clinical treatment such as electrochemotherapy [7], to treat cutaneous and subcutaneous tumour nodules by potentiating the cytotoxicity of nonpermeant or poorly permeant anticancer drugs, or gene electrotransfer to various animal tissues [8] and more recently in clinical trials [9]. Another possible treatment is the electrofusion of two different cells [10]. Electroporation is also used for cell lysis by increasing the electric field applied up to a critical value where plasma membrane cannot recover its initial structure. This phenomenon is called irreversible electroporation.

C. ...To the electronanomanipulation

As mentioned in the previous paragraph, electroporation is one of the electric field mediated effect on cells and lead to the destruction of the plasma membrane allowing the penetration of drugs or genes in the cytosol. A new complementary technique, based on the exposure of cells to ultra short and very intense pulsed electric fields (in the range from 10 to 300 ns with intensity between 20 to 150 kV/cm) termed nanosecond pulsed electric fields (nsPEF), has been recently developed. Depending on the pulse duration and intensity, some recent studies showed different effects linked to intracellular targets under conditions maintaining plasma membrane integrity [11-14] and membrane permeabilization [15,16]. nsPEF have already been tested on cancerous cells to treat tumors, for example, *in vitro* and *in vivo* [17]. But their effects are still not well defined, especially concerning electroporation for small molecules. The reduction of the size of the exposure chamber can be a good solution to visualize the effect of nsPEF on cells in real time observation. The diminution of the gap between the electrodes also permits to investigate more intense electric fields.

II. MATERIALS, METHODS AND PROCESSES

A. Bio-LOC for the cell electrofusion

Cells were resuspended in an aqueous solution containing sorbitol. The cell suspension was flowed in the microdevice through the fluidic system included in the device. An alternative electric field of 50 to 100 V/cm was applied on the cells by electrodes separated by a 200 μm -gap. The frequency was changed from 10 kHz to 10 MHz in order to obtain respectively negative and positive DEP.

After the handling of the cells by dielectrophoresis, a train of 2 DC pulses of 80 μs and of 500 V/cm was applied with the same electrodes as the DEP force.

B. Bio-microdevice for the cell electromanipulation

The presented process is adapted from Woytasik *et al.* [18]. A cleaning of the surface of the substrate is realized using solvent baths: acetone and ethanol, and an acidic solution of H_2SO_4 and H_2O_2 .

Next steps are linked to the micromoulding process for copper electrodeposition. (1) Sputtering of a metallic seed-layer: 5 nm Ti/10 nm Cu. The thin layer of titanium is deposited to improve the adhesion and prevent copper cluster formation and copper diffusion in the glass. (2) UV photolithography of 18 μm thick photoresist (AZ 4562, Hoechst) to realize copper deposition moulds. (3) Electrodeposition of thick copper tracks (15 μm) at room temperature using a commercial Shipley sulphate bath. (4) Removal of photoresist moulds. (5) Etching of the seed-layer between the copper tracks in order to insulate the different parts of the devices by wet etching.

C. Cell culture

B16F10 cells (Mouse melanoma lung cells) were grown in Minimum Essential Medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% foetal bovine serum (Invitrogen), 500 U/ml penicillin, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Invitrogen) defined as complete medium. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37° C. Cells were routinely passed every two days.

D. Exposure to electric fields

1) Dielectrophoresis and electrofusion

Cells were resuspended in an aqueous solution containing sorbitol. The cell suspension was flowed in the microdevice through the fluidic system included in the device. An alternative electric field of 50 to 100 V/cm was applied on the cells by electrodes separated by a 200 μm -gap. The frequency was changed from 10 kHz to 10 MHz in order to obtain respectively negative and positive DEP.

After the handling of the cells by dielectrophoresis, a train of 2 DC pulses of 80 μs and of 500 V/cm was applied with the same electrodes as the DEP force.

2) nsPEF

Cells were resuspended in S-MEM (Invitrogen). The cell suspension was poured between electrodes separated by a 100 μm gap (microdevice described in the section 2.2, and covered by a microscope slide in order to close the channel. Cells were exposed to 100 nsPEF of 4 ns and applied voltage of 400 V.

3) Visualization under a microscope

To visualize the handling and the fusion of cells, an inverted microscope (Zeiss) was used.

To follow the evolution of the fluorescence of the calcein in the cells, the microsystem containing the cells was placed under an epifluorescence microscope (Zeiss). Before the exposure, one image was acquired in order to know the initial fluorescence level. After the exposure, two images are

acquired: one just after the exposure and the other after 20 min.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Integrated LOC for cell fusion, including active positioning

The biochip presented here is devoted to the cell placement thanks to electrical fields and their treatment by electroporation in order to fuse them. This treatment requires the trapping of two different kinds of cells flowing in the channels and then the exposure to electroporation pulses. These channels surrounded by thick electrodes of 15 μm and separated by insulating and discontinued walls were integrated to the device to focus the electric fields and to create areas with maxima and minima of electric fields (see fig 1).

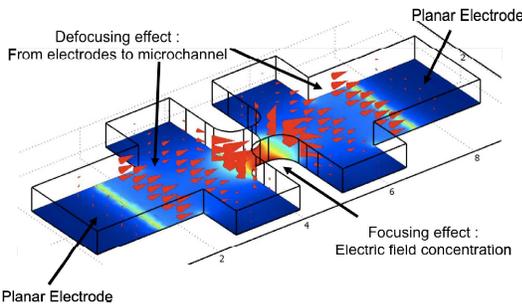


Figure 1: FEM simulation of the electric field: concentration of the field by using insulating material in a particular geometry

The second objective of this biochip is to electroporate the membrane of the cells that have been previously arrayed thanks to DEP [18]. Figure 2a shows the effect of the exposure of B16F10 cells to an alternative electric field, with a frequency and an amplitude permitting to obtain a positive DEP (i.e. cells migrate to the maxima of electric field). Figure 2b shows the effect of a train of 2 pulses of 80 μs of duration and of 500V/cm of strength applied on a couple of cells previously handled by positive DEP. The two cells are fusionned.

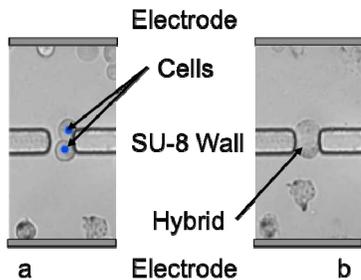


Figure 2: Effect of (a) positive DEP on cells and (b) electroporation pulses exposure (cells have an average diameter of 10 μm)

B. Electroporation of cells using nsPEF

In order to visualize the effect of nsPEF exposure on cells (especially on the plasma membrane) during their application, a first prototype of a biochip was realized and

tested. The two main constraints for its development were (i) the perfect matching of the biochip with the pulse generating system in order to catch the maximum of energy and to prevent any damages by reflexion and (ii) the planarity and parallelism of the different layers constituting the device in order to facilitate the analysis by microscopy. Each of these constraints respectively impact on the design of the electric part of the device (i.e. the electrodes) and on the choice of the fabrication technology, including the choice of the substrates.

The microdevice was realized using copper electrodeposition in order to obtain thick electrodes of 15 μm . The geometry of the channel is designed (i) to obtain a total impedance of 50 Ω at low frequency for a specific medium (physiological medium with a conductivity of 1 S/m) and (ii) to be connected to a coplanar transmission line coming from the pulse generator (see fig 3).

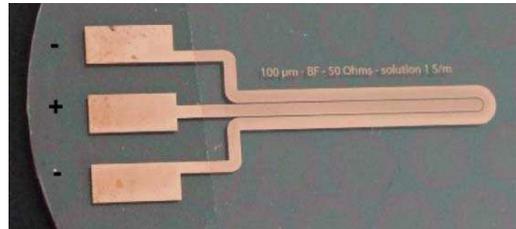


Figure 3: First prototype of the device with thick copper electrodes (15 μm by electrodeposition) separated by a channel of 100 μm

To validate the design of the electrodes, a biological experiment was performed using cells charged with a fluorescent dye and by exposing them to electroporation ultra-short pulses in a microdevice. The result of this comparison is shown in the figure 4. The exposed cells (row 2) show a decrease in the fluorescence compared to the non-exposed control cells (row 1) 20 min after the exposure to a train of 100 pulses of 4 ns and 400 V (column C) compared to just after the exposure (column B), meaning that nsPEF can affect the plasma membrane in these exposure conditions.

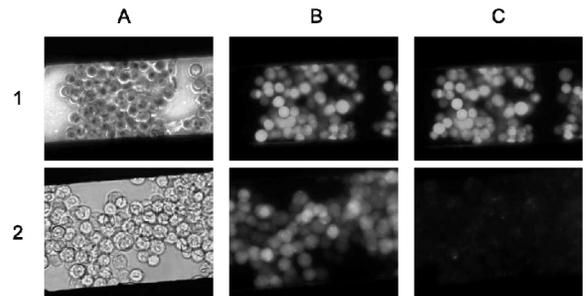


Figure 4: Evolution of the fluorescence loss of cells previously charged in calcein-AM. A loss of the fluorescence is visible after 20 min in the case of exposed cells (74% of loss).

IV. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Vanessa Joubert (CNRS, UMR 8121, France) and Joseph Lautru (CNRS, PPSM,

France) for their assistance in the different steps of the fabrication or experiments.

This work was supported by grants from CNRS, Institut Gustave Roussy, University Paris-Sud, INCA (07/3D1616/Doc-54/NG-NC), DGA/D4S/MRIS (contract numbers 06 34.017 and 06 34.024), French National Agency through Nanoscience and Nanotechnology Program (Nanopulsebiochip n°ANR-08-NANO-024-01) and CliniGene (FP6 – LSHB-CT-2006-018933).

The authors also thank for their financial support the Conseil Général de l'Essonne through the use of the equipments of the Centrale de Technologie Universitaire IEF-NIMERVE.

V. REFERENCES

- [1] H. Andersson and A. Van den Berg, "Microfluidic devices for cellomics: a review" *Sensors and Actuators: B. Chemica*, XX(XX), pp XX-XX (2003).
- [2] O. Français, G. Mottet, A. Ayina and B. Le Pioufle, "3D field focusing and defocusing geometries for cell trapping on a chip" *DTIP09*, Rome, Italie (2009).
- [3] O. Français, A. Ayina, J. Villemejeane, L. Rousseau, L.M. Mir and B. Le Pioufle, "High Density Cell Microarray Based on Dielectrophoresis Traps Induced by a Matrix of Singularities" *MicroTas09*, Jeju, Korea (2009).
- [4] P. Ha, "The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields" *J. Appl. Phys.*, 22(7), pp 869-71 (1951).
- [5] T. Muller, A. Pfenning, P. Klein, G. Gradl, M. Jager and T. Schnelle, "The potential of dielectrophoresis for single-cell experiments" *IEEE Eng Med Biol Magazine*, 22(6), pp 51-61 (2003).
- [6] J. Villemejeane and L.M. Mir, "Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications" *Br. J. Pharmacol.*, 157(2), pp 207-219 (2009).
- [7] M. Marty, G. Sersa, J.R. Garbay, J. Gehl, C.G. Collins, M. Snoj, V. Billard, P.F. Geersten, J.O. Larkin, D. Miklavcic, I. Pavlovic, S.M. Paulin-Kosir, M. Cemazar, N. Morsli, D.M. Soden, Z. Rudolf, C. Robert, G.C. O'Sullivan and L.M. Mir, "Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study", *Eur. J. Cancer. Suppl.*, 4(11), pp 3-13 (2006).
- [8] F. André, J. Gehl, G. Sersa, V. Preat, P. Hojman, J. Eriksen, M. Golzio, M. Cemazar, N. Pavselj, M.P. Rols, D. Miklavcic, E. Neumann, J. Teissie and L.M. Mir, "Efficiency of high and low voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor and skin" *Hum. Gene Ther.*, 19(11), pp 1261-1271 (2008).
- [9] L.C. Heller and R. Heller, "In vivo electroporation for gene therapy" *Hum. Gene Ther.*, 17(9), pp 890-897 (2006).
- [10] T.H. Scott-Taylor, R. Pettengell, I. Clarke, G. Stuhler, M.C. La Barthe, P. Walden and A.G. Dalgleish, "Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines" *Biochem. Biophys. Acta.* 1500(3), pp 265-279 (2000).
- [11] M. Stacey, J. Stickley, P. Fox, V. Statler, K.H. Schoenbach, S.J. Beebe and S. Buescher, "Differential effects in cells exposed to ultrashort, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis" *Mutat. Res.*, 542 (1-2), pp 65-75 (2003).
- [12] N. Chen, K.H. Schoenbach, J.F. Kolb, R. James Swanson, A.L. Garner, J. Yang, R.P. Joshi and S.J. Beebe, "Leukemic cell intracellular responses to nanosecond electric fields" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317(2), pp 421-427 (2004).
- [13] P.T. Vernier, Y. Sun, L. Marcu, C.M. Craft and M.A. Gundersen, "Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310(2), pp 286-295 (2003).
- [14] P.T. Vernier, Y. Sun, M.T. Chen, M.A. Gundersen and G.L. Craviso, "Nanosecond electric pulse-induced calcium entry into chromaffin cells" *Bioelectrochemistry*, 73(1), pp 1-4 (2008).
- [15] B.L. Ibey, S. Xiao, K.H. Schoenbach, M.R. Murphy and A.G. Pakhomov, "Plasma membrane permeabilization by 60- and 60-ns electric pulses is determined by the absorbed dose" *Bioelectromagnetics*, 30(2), pp 92-99 (2009).
- [16] P.T. Vernier, Y. Sun and M.A. Gundersen, "Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization" *BMC Cell Biol.*, 7, pp 37-53 (2006).
- [17] R. Nuccitelli, U. Pliquett, X. Chen, W. Ford, R. James Swanson, S.J. Beebe, J.F. Kolb and K.H. Schoenbach, "Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 343(2), pp 351-360 (2006).
- [18] M. Woytasik, J.P. Grandchamp, E. Dufour-Gergam, E. Martincic, J.P. Gilles, S. Megherbi, V. Lavalley and V. Mathet, "Fabrication of planar and three-dimensional microcoils on flexible substrates" *Microsyst. Technol.*, 12(10-11), pp 973-978 (2006).
- [19] G. Mottet, J. Villemejeane, L.M. Mir and B. Le Pioufle, "A new technique to design complex 3D polymer lab on chip, involving multilayer fluidics, embedded thick or thin electric layer, and hard packaging- Application to the conception of a cell electroporation biochip" *J. Micromech. Microeng.*, submitted (2009).

8.2. Microsystèmes à électrodes isolées

Nous nous sommes enfin intéressés à l'isolation des électrodes de tels systèmes afin de savoir s'il était possible d'obtenir le même type de résultat sur des cellules. Pour cela, nous avons comparé, dans des conditions expérimentales identiques (100 impulsions de 4 ns à 400 V), la perméabilisation des membranes plasmiques par application de nsPEF par l'intermédiaire d'électrodes classiques et isolées par un film de parylène de 1 μm . Dans les deux cas, des cellules DC-3F ont été resuspendues dans du S-MEM, après avoir été incubées pendant 1 h en présence de calcéine-AM. Elles ont ensuite été placées dans un microsystème identique à celui présenté dans l'article précédent, ayant un espace inter-électrodes de 100 μm .

Le résultat de cette comparaison est représenté en figure 8.4. Dans les deux cas, isolé ou non, les cellules exposées à un train de 100 nsPEF de 4 ns à 400 V (lignes 2 et 3) (correspondant à un champ de 40 kV/cm dans le cas classique et à un champ maximal de 20 kV/cm dans le cas isolé, d'après les simulations FEM décrites dans la figure 3.6) montrent une diminution de la fluorescence comparées à des cellules non exposées (ligne 1) 20 min après l'exposition. Cela signifie que ces impulsions, délivrées dans de telles conditions, affectent la membrane plasmique des cellules et permettent à la calcéine de s'échapper de l'intérieur des cellules. La perte de fluorescence observée est plus importante dans le cas d'électrodes en contact avec le milieu de culture (74 % de perte par rapport au niveau de base avant exposition) que dans le cas d'électrodes isolées du milieu contenant les cellules (36 % de perte par rapport au niveau de base avant exposition). Ces valeurs sont la moyenne de 3 expériences.

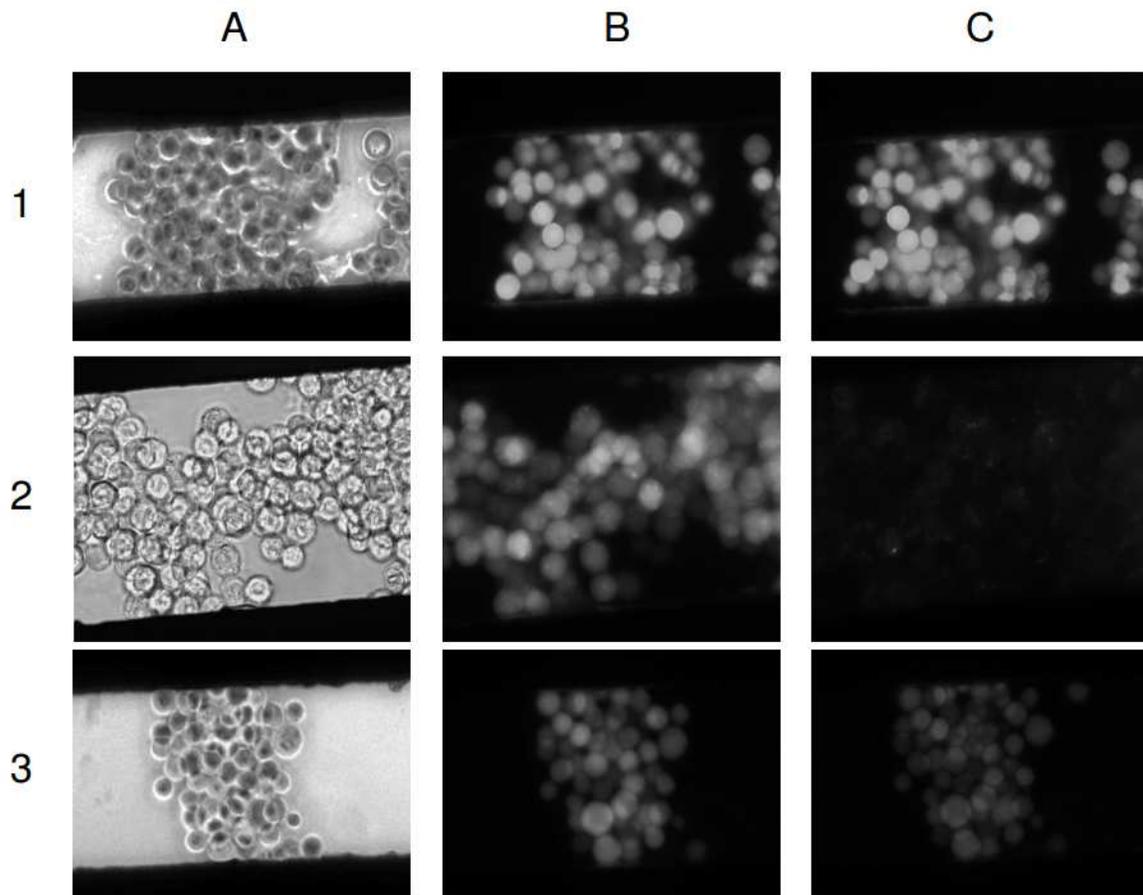


FIG. 8.4 : Comparaison électrodes classiques et isolées en microsystème. La ligne 1 correspond aux contrôles (cellules non exposées), la ligne 2 à l'exposition en système "classique" (contact entre le milieu de culture et les électrodes) et la ligne 3 à l'exposition en système isolé (pas de contact entre le milieu et les électrodes). La colonne A correspond à des images en champ clair prises avant l'exposition à des nsPEF (sauf dans le cas des contrôles), la colonne B à des images en fluorescence prises juste avant l'exposition à des nsPEF et la colonne C à des images en fluorescence prises 20 min après l'exposition.

8.3. Discussion

Une première analyse a pu être faite sur les systèmes élémentaires à deux lames de cuivre collées sur une lame de verre. L'expérience, basée sur l'électroperméabilisation, a montré un lien entre l'intensité du champ électrique appliqué et la perméabilisation de cellules par un train de 1.000 nsPEF de 10 ns. Plus le champ était intense, plus la perte de fluorescence était marquée, signifiant que les cellules en étaient d'autant plus atteintes. Ce premier résultat vient se rajouter à ceux de [Muller et al. \(2001\)](#) et de [Vernier et al. \(2006a\)](#), qui par application d'un train d'impulsions intenses mais brèves permettait l'entrée de petites molécules fluorescentes. Il est aussi intéressant de noter que la perte de fluorescence, c'est-à-dire la perméabilisation membranaire, est progressive et est encore visible 20 min après le traitement. Une observation similaire a été faite concernant des impulsions perméabilisantes, utilisées en transfert

de gènes ou de molécules (Rols et Teissié, 1990; Puc *et al.*, 2003) : une impulsion d'une centaine de microsecondes déstabilise la membrane pendant une dizaine de minutes. Dans notre cas, on peut estimer que, 20 min après le traitement, la membrane n'a toujours pas retrouvé sa fonction de barrière sélective.

Il a aussi été observé qu'un champ très intense (130 kV/cm dans nos conditions d'exposition) entraîne une perte quasi-immédiate de la fluorescence, pouvant signifier qu'un niveau léthal pour les cellules peut être atteint. Là encore, le lien peut être fait avec l'électroperméabilisation irréversible qui mène à une perturbation si intense de la membrane que la cellule ne puisse plus par la suite réparer (Gabriel et Teissié, 1999; Gehl et Mir, 1999).

Dans tous les cas, les cellules proches des électrodes semblent être plus affectées que celles se trouvant au centre du canal. La théorie voulant que les lignes de champs dans un canal supposé de longueur infinie soient homogènes sur toute la largeur de celui-ci, une telle différence ne peut pas être due qu'à la mauvaise répartition du champ électrique dans le canal, bien que Saulis *et al.* (2007) ait montré que l'application de champs électriques intenses sur des électrodes plongées dans une solution pouvait entraîner des irrégularités dans la surface des électrodes et ainsi perturber localement la distribution de champ électrique. Aucune étude similaire n'a cependant été réalisée avec des nsPEF. La proximité d'électrodes en cuivre est plus probablement la cause de ce phénomène, un possible effet thermique ayant été rejeté d'une part par le fait que la décroissance de fluorescence est plus marquée là où la dissipation de chaleur est la plus forte (le cuivre étant un bon conducteur électrique et thermique) et d'autre part à l'aide d'une modélisation FEM. Des réactions électrochimiques entre la solution biologique et les électrodes peuvent induire un relargage d'ions métalliques toxiques pour les cellules (Martin, 1988; Loste *et al.*, 1998; Kotnik *et al.*, 2001a) et peuvent être responsables des effets accrus au niveau des zones proches des électrodes.

Dans une seconde série d'expériences, mettant en œuvre des systèmes ayant une distance inter-électrodes de 2 mm, il a été montré les mêmes effets pour des intensités de champ plus faibles (15 kV/cm au lieu de 45 kV/cm) : une baisse de la fluorescence dans tout le canal mais nettement plus marquée le long des électrodes. Mais en utilisant un champ de 22 kV/cm, l'intensité maximale de fluorescence se retrouve en deux endroits dans le canal mais plus en son centre. La fluorescence au centre disparaît plus rapidement qu'aux points d'intensité de fluorescence maximale. Les effets de bord sont quant à eux toujours présents. Alors que cette perte rapide proche des électrodes peut s'expliquer de la même façon que précédemment, celle observée au centre du canal ne peut être simplement expliquée par une diffusion d'ions toxiques produits par des réactions électrochimiques, car toutes les cellules n'ont pas été touchées. Le contenu spectral des impulsions ne permet pas non plus d'obtenir des longueurs d'ondes de l'ordre du millimètre et un calcul approché ne donne qu'une faible élévation de température au centre du canal, en permettant pas non plus de conclure à un effet thermique.

Bien que ces phénomènes ne soient pas totalement maîtrisés ni compris, il semblerait qu'ils soient principalement liés à l'utilisation d'électrodes en cuivre, matériau pouvant se révéler toxique pour les

cellules (Benders *et al.*, 1994; Kawakami *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). La méthode de cartographie de champ, faisant appel à la possibilité des cellules à répondre à un champ électrique extérieur, permet de visualiser des inhomogénéités induites par des nsPEF. Elle a l'avantage d'analyser non pas l'entrée mais la sortie d'un marqueur fluorescent depuis l'intérieur des cellules vers le milieu extérieur. La différence de concentration en calcéine qu'il existe entre ces deux domaines entraîne un intense gradient qui permet un relargage efficace de ces petites molécules malgré le faible niveau de perméabilisation des cellules. De plus, la détection d'un faible nombre de molécules fluorescentes rentrant dans une cellule nécessite un traitement des images important. Le faible niveau de fluorescence des marqueurs entrant dans les cellules est difficilement séparable de l'auto-fluorescence naturelle des cellules. Cette méthode évite aussi le lavage des cellules lors de l'utilisation de certains marqueurs et permet ainsi un suivi en continu.

Cette technique, bien plus sensible que celle consistant à suivre l'entrée d'un marqueur fluorescent, a déjà été utilisée par l'équipe de Vernier (Vernier *et al.*, 2009) afin de visualiser les effets d'impulsions "longues" (100 μ s - 50 kV/m) et ultra-courtes (10 ns - 2,5 MV/m) sur des membranes de cellules peroxydées. Une technique similaire mais basée sur l'entrée d'un marqueur fluorescent a aussi été testée par Chen *et al.* (2009) pour visualiser l'effet de nsPEF sur des cellules en culture dans différentes configurations d'électrodes.

La méthode de cartographie biologique de l'effet du champ électrique a ensuite été mise au point grâce aux biopuces développées dans le cadre de cette thèse. En effet, en plus d'apporter une information sur la distribution du champ, l'utilisation de marqueurs fluorescents comme indicateur de perméabilisation cellulaire permet de savoir si les cellules sont affectées par le champ appliqué à l'aide de ces nouvelles chambres d'exposition. Un train de 100 nsPEF de 4 ns à 1 Hz et à 400 V d'amplitude (correspondant à un champ de 40 kV/cm dans un canal de 100 μ m de largeur) a été appliqué sur des cellules placées dans les microdispositifs.

Une chute de l'intensité de fluorescence 20 min après l'exposition à ces impulsions a pu être relevée, signifiant que les membranes des cellules ont subi une perturbation. A cette échelle de canal, il est impossible de distinguer une quelconque inhomogénéité d'intensité, due par exemple à des effets de bord. En effet, ici encore des électrodes de cuivre ont été utilisées malgré les premières observations réalisées auparavant. L'électrodéposition de cuivre est la seule méthode technologique disponible dans la Centrale Technologique Universitaire d'Orsay pour obtenir des épaisseurs d'électrodes de l'ordre de la cinquantaine de micromètres. Depuis peu, notre groupe a le savoir-faire pour déposer des électrodes épaisses en or.

Pour supprimer ce contact entre le milieu et le cuivre, plusieurs techniques sont envisagées. La première consiste en une auto-catalyse du cuivre par une solution contenant de l'or, permettant ainsi de déposer une fine couche d'un matériau biologiquement inerte sur les électrodes. Cette solution n'a cependant pas encore été testée et le résultat n'est pas garanti. Une seconde approche, plus coûteuse, consiste à remplacer complètement le cuivre par de l'or. Des premiers essais concluants, mais non présentés ici,

ont été réalisés récemment au sein de notre groupe.

Une dernière alternative, qui s'est déjà révélée prometteuse dans le cadre de cuvette d'électroporation macroscopique (voir le chapitre précédent) est l'isolation par une fine couche d'un matériau diélectrique des électrodes. Aussi, ces mêmes microdispositifs ont été recouverts d'un film de parylène de 1 μm , puis testés à nouveau dans les mêmes conditions expérimentales (cellules DC-3F chargées en calcéine, 100 nsPEF de 4 ns à 400 V, correspondant à un champ maximal de 20 kV/cm dans le milieu, acquisition d'images pendant 20 min après l'exposition). Une diminution de la fluorescence dans le canal 20 min après l'exposition par rapport au niveau initial montre là encore que le champ électrique arrive à interagir avec les cellules. Le même type de cinétique qu'auparavant, au centre d'un canal de 1 mm de largeur, a été observée et l'intensité de fluorescence est plus importante dans ce cas-là qu'après 20 min dans un canal isolé.

Cette différence en terme de perte de fluorescence entre les cas isolé ou non peut provenir des paramètres électriques choisis. En effet, pour une même tension appliquée aux bornes d'un canal isolé, la tension à laquelle le milieu sera soumis ne sera pas la même que celle aux bornes d'un canal sans cette isolation, l'isolant utilisé ayant pour effet d'absorber une partie de cette tension. D'autre part, nous avons vu dans un des chapitre précédents que la forme de l'impulsion était modifiée par le passage à travers cette fine couche de diélectrique, autre source possible de différence en terme de résultats biologiques (Vernier *et al.*, 2003; Schoenbach, 2007; Pakhomov *et al.*, 2007a). Dans cette configuration "isolée", il semblerait donc que les membranes plasmiques aient été suffisamment déstabilisées pour permettre le relargage du marqueur fluorescent sans toutefois entraîner une perte instantanée, pouvant signifier alors que la cellule a encore les capacités de restaurer la fonction première de sa membrane extérieure.

Afin de comprendre les phénomènes liés à l'application d'impulsions ultra-courtes sur des cellules ou des tissus et d'analyser les paramètres influant sur nos résultats, nous développons un microsystème permettant l'observation en temps réel de cellules sous microscope DRASC pendant leur exposition à des nsPEF.

Ce chapitre présentant les résultats expérimentaux obtenus grâce à des microsystèmes conçus pour la nanoporation montre donc une nouvelle fois de façon expérimentale que les électrodes isolées peuvent être utilisées pour appliquer des nsPEF à des cellules. Ces microsystèmes peuvent apporter de nouvelles informations sur la compréhension des phénomènes liés à ces impulsions. Ils ont pour intérêt de permettre la visualisation en temps réel des effets des impulsions sur les cellules, en particulier sur les membranes, contrairement à l'exposition en cuvette, qui nécessite le transfert de son contenu avant observation. Ainsi une nouvelle technique sensible de cartographie de champ a aussi été mise au point en se basant sur le phénomène d'électroperméabilisation des cellules.

ELECTROCHIMIOTHÉRAPIE PAR APPLICATIONS D'IMPULSIONS ULTRA-COURTES EN PRÉSENCE DE BLÉOMYCINE

L'électrochimiothérapie est une technique combinant des agents thérapeutiques de chimiothérapie (la bléomycine - BLM - par exemple) et des champs électriques perméabilisants. Un train de 8 impulsions d'environ 1 kV/cm et de 100 μ s de durée appliqué autour d'une tumeur cutanée ou sous-cutanée permet de déstabiliser suffisamment les membranes de ses cellules pour permettre l'entrée des molécules de bléomycine injectées par voie intraveineuse ou intratumorale. Déjà largement utilisée en clinique, cette méthode a permis de traiter un grand nombre de ce type de tumeurs en rendant leur pouvoir cytotoxique à ces molécules actives uniquement à l'intérieur des cellules.

En vue des résultats obtenus en perméabilisation cellulaire à de petites molécules par application de nsPEF (chapitre précédent), nous avons voulu tester l'exposition de tumeurs en présence de BLM à l'aide de ce type d'impulsions. L'idée est de pouvoir proposer une méthode encore plus sûre en évitant le contact direct des électrodes avec les tissus à traiter et ainsi prévenir tout risque de brûlure électrochimique ou d'échauffement dans les tissus traités.

Pour cela, des expériences préliminaires *in vivo* visant à explorer les effets que pouvaient avoir la combinaison de BLM et de nsPEF sur des tumeurs murines sont présentées ici. Nous avons exploré différentes conditions d'exposition en faisant varier l'amplitude, le nombre d'impulsions et la fréquence de répétition des impulsions, afin d'une part de définir les paramètres influençant l'efficacité du traitement et d'autre part de déterminer des paramètres optimaux d'électrotransfert dans le cadre de cette application.

9.1. Combinaison bléomycine et impulsions ultra-courtes

Dans un premier temps, nous avons voulu voir si l'application seule d'impulsions ultra-courtes avait un effet sur la croissance tumorale de tumeurs murines de souris. Une première série de souris a été exposée à un train de 3.000 nsPEF de 10 ns à 12 kV appliqué à une fréquence de 25 Hz (CTRL-NSPEF - $n = 6$) et comparée à deux autres groupes n'ayant soit rien subi (CTRL Absolu - $n = 6$) soit ayant subi une injection intraveineuse de 100 μg ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) de BLM (CTRL BLM - $n = 12$). La figure 9.1 montre que quelques soient les conditions, aucune différence significative n'existe entre ces groupes, suivis pendant 28 jours (excepté le groupe ayant été exposé à des nsPEF, suivi uniquement pendant 23 jours).

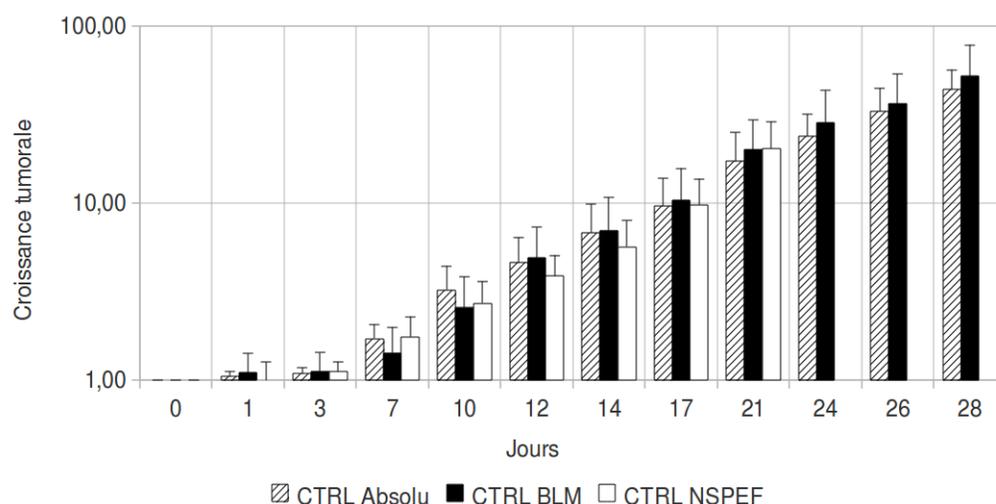


Fig. 9.1 : Suivi de croissance tumorale (V_j/V_0) pendant 28 jours après injection de bléomycine seule (CTRL BLM - $n = 12$) ou exposition à un train de 3.000 nsPEF de 10 ns à 12 kV (20 kV/cm) appliqué à une fréquence de répétition de 25 Hz (CTRL NSPEF - $n = 6$), comparé à une croissance normale de tumeur murine chez la souris (CTRL Absolu - $n = 6$). Les électrodes sont isolées par 10 μm de parylène et espacées de 6 mm. La croissance tumorale est représentée selon une échelle logarithmique.

Par la suite, nous avons combiné l'injection intraorbitale de 100 μg de BLM et l'application d'un train de 3.000 nsPEF à 12 kV à travers des électrodes isolées par 10 μm de parylène et espacées de 6 mm, 4 min après l'injection. La figure 9.2 montre un retard significatif de croissance tumorale à partir du 7^e jour, après le traitement, du groupe traité (3000np-25Hz-12kV - $n = 7$) par rapport aux deux autres contrôles (Absolu et BLM). Ce retard reste significatifs jusqu'au 28^e jour.

Cependant, l'effet obtenu n'est pas une régression complète de la tumeur, mais seulement un retard dans l'évolution normale de croissance des tumeurs.

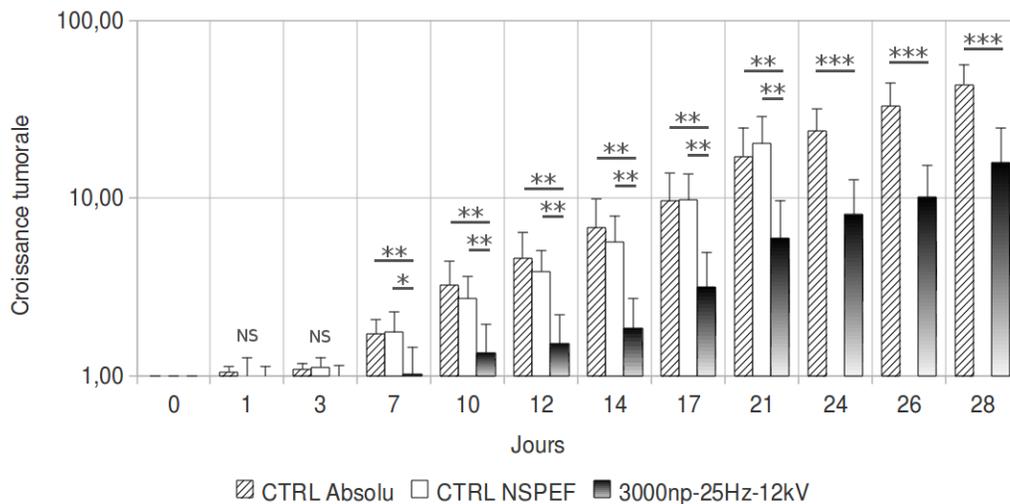


FIG. 9.2 : Suivi de croissance tumorale pendant 28 jours après injection de bléomycine suivie d'une exposition à un train de 3.000 nsPEF de 10 ns à 12 kV (20 kV/cm) appliqué à une fréquence de répétition de 25 Hz (3000np-25Hz-12kV - n = 7), comparé à une croissance normale de tumeur murine chez la souris (CTRL Absolu - n = 6) et à une exposition dans les mêmes conditions mais sans injection de bléomycine (CTRL NSPEF - n = 6). Les électrodes sont isolées par 10 μ m de parylène et espacées de 6 mm. La croissance tumorale est représentée selon une échelle logarithmique.

9.2. Influence des paramètres électriques

Dans un second temps, nous avons donc voulu savoir quels étaient les paramètres influençant ces résultats, en s'intéressant d'une part à l'amplitude des impulsions et d'autre part à la fréquence de répétition et au nombre d'impulsions délivrées.

9.2.1. Amplitude des impulsions

L'exposition de tumeurs à un train de 3.000 nsPEF (10 ns - 25 Hz) 4 min après injection de BLM a été reproduite à 8 kV (13 kV/cm) (n = 6) et 12 kV (20 kV/cm) (n = 7) (espace inter-électrodes de 6 mm) et comparée aux contrôles sans BLM et sans impulsions. La figure 9.3 montre qu'à partir du 3^e jour post-traitement l'exposition à 8 kV retarde significativement la croissance tumorale par rapport aux contrôles et qu'il faut attendre le 7^e jour après le traitement pour obtenir le même résultat à 12 kV. Mais ce retard est perdu rapidement dans le premier cas (14^e jour après traitement) alors qu'il semble se poursuivre jusqu'au 28^e jour dans le cas de l'exposition à 12 kV.

Une expérience similaire a été réalisée avec un train de 1.000 nsPEF au lieu de 3.000 nsPEF (10 ns - 25 Hz) à trois amplitudes différentes : 6 kV (n = 4), 8 kV (n = 13) et 12 kV (n = 11). Dans les deux cas les plus intenses (8 et 12 kV), on observe le même type de réponse qu'à 3.000 nsPEF (dans les mêmes conditions d'exposition) : au 7^e jour, la différence de croissance devient significative. Mais cette fois-ci, l'exposition à 8 kV semble vouloir rester significative jusqu'à la fin des 28 jours, alors que celle à 12 kV

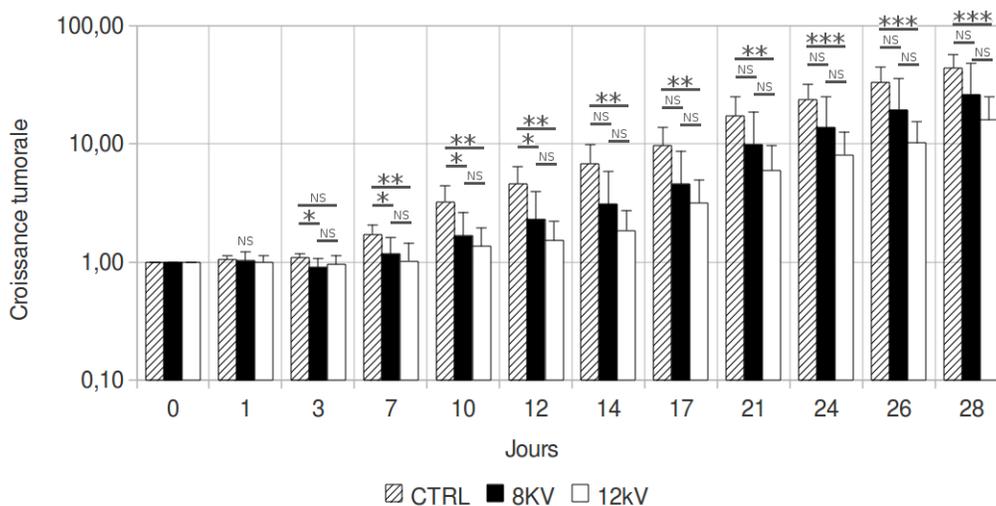


FIG. 9.3 : Suivi de croissance tumorale pendant 28 jours après injection de bléomycine suivie d'une exposition à un train de 3.000 nsPEF de 10 ns appliqué à une fréquence de répétition de 25 Hz à différentes amplitudes : 8 kV (13 kV/cm) ($n = 6$) et 12 kV (20 kV/cm) ($n = 7$), comparé à une croissance normale de tumeur murine chez la souris (CTRL Absolu - $n = 6$). Les électrodes sont isolées par 10 μm de parylène et espacées de 6 mm. La croissance tumorale est représentée selon une échelle logarithmique.

perd son caractère significatif au 21^e jour, comme le montre la figure 9.4. 2 animaux sur 13 montrent aussi une régression complète de leur tumeur à J10 et J14 et sans reprise de croissance dans les deux dernières semaines de suivi (1.000 nsPEF, 25 Hz, 8 kV) (voir tableau 9.1).

L'exposition à 6 kV (10 kV/cm) met, quant à elle, en évidence un possible effet seuil du traitement. En effet, aucune différence significative par rapport au groupe contrôle n'est à noter sur les 18 jours de suivi de ce groupe, pouvant signifier qu'il faille atteindre une certaine intensité de champ électrique pour obtenir des effets (entre 6 et 8 kV).

Enfin, une différence entre le groupe de souris exposées à 12 kV et les groupes contrôle et 8 kV peut être observée dans les trois premiers jours de suivi. Une augmentation rapide du volume tumoral le premier jour après traitement puis une baisse de ce volume suivi enfin par un retard significatif dans la croissance tumorale par rapport aux contrôles est dû à l'apparition d'un œdème. Cette observation va dans le même sens que la précédente à savoir que les effets observés sont dépendants de l'intensité du champ appliqué. Dans d'autres groupes de souris, certains animaux présentent eux aussi le même type de réaction mais l'augmentation du volume tumoral est masquée par l'évolution différente du reste de la cohorte.

9.2.2. Nombre d'impulsions et fréquence de répétition

Le nombre d'impulsions appliquées influence aussi les résultats. Un effet cumulatif du nombre d'impulsions pourrait rendre plus efficace le traitement en permettant une meilleure perméabilisation soit des cellules ou soit d'un nombre plus grand d'entre elles. Cependant, dans les mêmes conditions d'exposi-

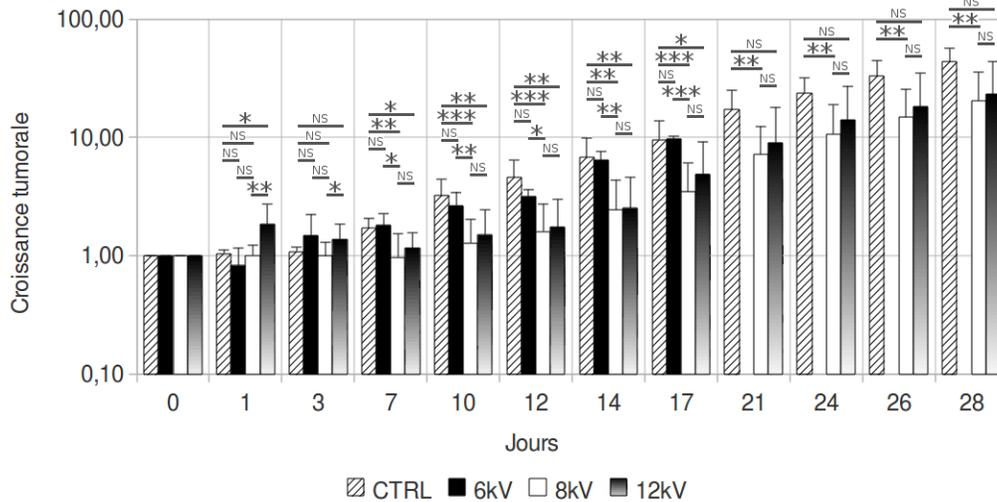


FIG. 9.4 : Suivi de croissance tumorale pendant 28 jours après injection de bléomycine suivie d'une exposition à un train de 1.000 nsPEF de 10 ns appliqué à une fréquence de répétition de 25 Hz à différentes amplitudes : 6 kV (10 kV/cm) ($n = 4$), 8 kV (13 kV/cm) ($n = 13$) et 12 kV (20 kV/cm) ($n = 11$), comparé à une croissance normale de tumeurs chez la souris (CTRL Absolu - $n = 6$). Les électrodes sont isolées par 10 μm de parylène et espacées de 6 mm. La croissance tumorale est représentée selon une échelle logarithmique.

tions (25 Hz - 8 kV), 1.000 nsPEF (figure 9.4-8kV) semblent plus efficaces à long terme que 3.000 nsPEF (figure 9.3-8kV).

Le même phénomène est aussi observé à 300 Hz où 1.000 nsPEF sont significativement plus efficaces pour retarder la croissance tumorale par rapport aux contrôles sans impulsions que l'exposition à 3.000 nsPEF (données de croissance tumorale non représentées). Il est cependant à noter que l'exposition à un train de 3.000 nsPEF de 8 kV à 300 Hz a permis la régression complète d'une tumeur sur six souris traitées (voir tableau 9.1).

Nous avons enfin voulu étudier l'effet de la fréquence sur la perméabilisation cellulaire *in vivo* par le biais d'électrodes isolées et en présence de bléomycine. Trois fréquences différentes ont été testées pour des trains d'impulsions de 1.000 nsPEF de 8 kV : 25 Hz ($n = 13$), 100 Hz ($n = 13$) et 300 Hz ($n = 6$), et comparées au groupe de souris non traitées. Alors que nos résultats confirment un effet significatif sur la croissance tumorale à 25 et 300 Hz, la figure 9.5 ne montre aucune différence significative entre le groupe ayant subi des impulsions à 100 Hz et le groupe contrôle. Des fréquences particulières semblent donc apparaître, comme c'était déjà le cas pour l'électrotransfert de gènes. Mais bien que globalement non efficace, l'exposition de tumeurs à 1.000 nsPEF de 8 kV à 100 Hz a permis une régression complète sur un groupe de 13 animaux (voir tableau 9.1).

Le tableau 9.1 rapporte le nombre de régression complète temporaire (le nombre de jours est indiqué entre parenthèse) et de régression complète définitive dans les groupes dans lesquelles elles ont été observées. Les groupes n'ayant pas montré de régressions ne sont pas reportés ici.

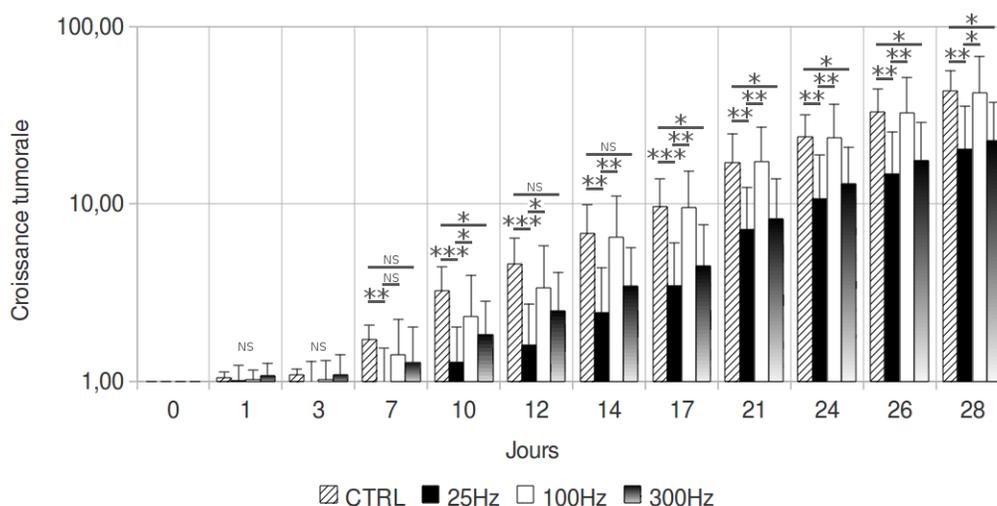


FIG. 9.5 : Suivi de croissance tumorale pendant 28 jours après injection de bléomycine suivie d'une exposition à un train de 1.000 nsPEF de 10 ns et de 8 kV (13 kV/cm) appliqué à des fréquences de répétition différentes : 25 Hz ($n = 13$), 100 Hz ($n = 13$) et 300 Hz ($n = 6$), comparé à une croissance normale de tumeurs chez la souris (CTRL Absolu - $n = 6$). Les électrodes sont isolées par 10 μm de parylène et espacées de 6 mm. La croissance tumorale est représentée selon une échelle logarithmique. Les analyses statistiques non mentionnées ici ont données des différences non significatives entre les groupes.

TAB. 9.1 : Synthèse des régressions complètes définitives et temporaires.

Groupe	Nombre	Régression complète	
		temporaire	définitive
1.000 nsPEF - 25 Hz - 8 kV	13	0	2
1.000 nsPEF - 100 Hz - 8 kV	13	0	1
1.000 nsPEF - 25 Hz - 8 kV	6	1 (5 jours)	1

9.3. Discussion

L'électrochimiothérapie est une thérapie anticancéreuse appliquée au traitement de tumeurs cutanées et sous-cutanées (Mir *et al.*, 2003) chez l'homme et chez l'animal. Elle induit de façon significative l'augmentation de la concentration de drogues antitumorales, telles que la bléomycine, à l'intérieur des cellules permettant ainsi d'accroître leur toxicité (Mir et Orłowski, 2000). Elle est souvent utilisée en complément à une autre thérapie anticancéreuse ou comme traitement alternatif (dans le cas de lésions non traitables par des méthodes "conventionnelles") (Moller *et al.*, 2009).

Mais bien qu'elle soit déjà largement utilisée en clinique (Marty *et al.*, 2006; Mir *et al.*, 2006) et qu'elle permette d'améliorer la qualité de vie des patients traités (Campana *et al.*, 2009), elle connaît encore quelques limites. En terme d'effets secondaires par exemple, les contractions associées à l'application de ces impulsions peuvent être une gêne pour les patients (Mir *et al.*, 1998b). Pour cela des

premières solutions sont proposées comme l'augmentation de la fréquence de répétition des impulsions (jusqu'à alors de 1 Hz) (Pucihar *et al.*, 2002; Zupanic *et al.*, 2007).

L'autre limitation provient de l'utilisation d'électrodes métalliques sur des tissus humains pouvant entraîner des brûlures électrochimiques (Stecker *et al.*, 2006; Patterson *et al.*, 2007; Netherton *et al.*, 2007), par électrolyse par exemple (Etchin et Mamet, 1982; Grossi *et al.*, 1993). Avec l'augmentation de l'amplitude des impulsions nécessaire pour obtenir les champs électriques intenses des nsPEF, ces réactions auront pour tendance de s'amplifier encore, même si aucune étude pour le moment ne relate de tels faits. Ainsi il est difficile d'imaginer un jour la possibilité d'appliquer des impulsions de ce type directement dans le cerveau par exemple dans le but de soigner certaines tumeurs plus profondes (Linnert et Gehl, 2009).

Aussi, une autre solution est de proposer l'utilisation d'électrodes isolées afin de s'affranchir de ces problèmes électrochimiques tout en garantissant un traitement efficace et sans danger.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les nsPEF pouvaient perméabiliser la membrane et laisser sortir de la calcéine (poids moléculaire de 622 g/mol) précédemment chargée dans les cellules. Nous avons voulu essayer cette méthode avec un autre molécule pouvant servir de marqueur de perméabilisation, la BLM (poids moléculaire de 1415 à 1425 g/mol).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de chacun de ces deux traitements (injection de BLM seule et exposition à des nsPEF sans injection au préalable de bléomycine) réalisés séparément sur des groupes de souris précédemment inoculées avec des cellules de tumeurs murines et nous les avons comparés à un groupe contrôle n'ayant subi ni injection de BLM ni exposition à des nsPEF. Aucun effet sur la croissance tumorale n'a été observé pendant les 28 jours de suivi post-traitement.

Contrairement à Nuccitelli *et al.* qui traitent des mélanomes sur des souris en appliquant uniquement des nsPEF (10 ou 100 impulsions de 10 à 20 kV/cm et d'une durée de 300 ns chacune) (Nuccitelli *et al.*, 2006, 2009), il semblerait que nos conditions d'exposition n'affectent pas de la même manière les tumeurs, bien que le temps total cumulé d'exposition soit identique et les intensités des champs mis en jeu proches.

Pour obtenir un effet significatif sur la croissance tumorale, nous avons montré que dans nos conditions d'exposition l'association BLM et nsPEF était indispensable. L'injection de bléomycine par voie intraorbitale chez un groupe de souris porteuses de tumeurs murines suivie 4 min après par une exposition à un train de 3.000 nsPEF de 10 ns de 12 kV (20 kV/cm) à travers des électrodes isolées espacées a montré un retard dans la croissance tumorale à partir du 7^e jour de suivi par rapport aux groupes contrôles de souris n'ayant rien subi comme traitement ou uniquement exposées à un train de nsPEF. Ces paramètres semblent permettre une déstructuration suffisante de la membrane pour laisser entrer des molécules de bléomycine et ainsi affecter les cellules tumorales. Cet effet n'est cependant pas assez efficace pour faire diminuer voire même disparaître les masses tumorales (voir tableau 9.1).

Pour essayer de comprendre les phénomènes et mécanismes sous-jacents à ces observations, nous avons commencé à étudier les effets de différents paramètres électriques sur la croissance tumorale de ces tumeurs chez de nouveaux groupes de souris.

En appliquant différents trains d'impulsions de 1.000 ou 3.000 nsPEF à 25 Hz et de 6 (10 kV/cm), 8 (13 kV/cm) ou 12 kV (20 kV/cm), il a été observé des différences dans la croissance tumorale de ces groupes de souris comparés aux groupes contrôles. Un seuil de tension minimal à dépasser pour obtenir un effet est apparu, un peu semblable à celui observé en électroperméabilisation plus "conventionnelle" (Teissié et Rols, 1993). En fonction du nombre d'impulsions appliquées, ce seuil semblerait aussi différé, rappelant là encore des résultats similaires sur la fréquence en utilisation des impulsions plus longues (Pucihar *et al.*, 2002). En augmentant le nombre d'impulsions délivrées, on augmente aussi le "seuil de perméabilisation" à la bléomycine (8 kV suffisent pour un train de 1.000 nsPEF alors que 12 kV sont nécessaires pour 3.000 nsPEF afin d'obtenir un profil de croissance similaire).

Concernant la fréquence, le constat est encore plus étonnant. Alors qu'une exposition à 25 et 300 Hz semble donner le même type de réponse, une fréquence de 100 Hz ne favorise pas l'entrée de bléomycine dans les tumeurs et ne retarde pas leur croissance. Des fréquences particulières avaient déjà été retenues lors de l'optimisation de l'électrotransfert de gènes *in vitro* par applications de nsPEF, en système non isolé.

Seul un retard de croissance est observé et non une éradication totale des tumeurs, pour le moment. Une hypothèse possible viendrait du fait que l'ensemble de la masse tumorale ne soit pas totalement couverte par le champ électrique ou par un champ électrique suffisamment élevé. En effet, l'application de nsPEF ne montre aucun effet comparé à un groupe n'ayant subi aucun traitement alors qu'en présence de bléomycine, il est noté une stagnation du volume tumoral pendant quelques jours puis une reprise de la croissance au même rythme que les contrôles. Cet arrêt de progression peut être dû à la destruction partielle de la tumeur par la bléomycine. Mais certaines cellules cancéreuses, encore présentes et non affectées, ont permis par la suite un regain de ce volume tumoral. Nuccitelli *et al.* (2009), dans son étude *in vivo*, n'a pas non plus obtenu une efficacité totale sur les tumeurs traitées par application d'un seul traitement. Une seconde, voire même une troisième série d'impulsions, appliquées à la reprise de la croissance (10 à 15 jours après le premier traitement) auront été nécessaires pour éradiquer l'ensemble des tumeurs.

Mais ces premiers essais *in vivo* combinant BLM et nsPEF ont toutefois permis d'obtenir des régressions complètes (suivi sur 28 jours) et partielles de tumeurs par application d'un seul traitement. 5 souris parmi les 82 traitées ont montré une disparition totale de la tumeur après seulement une dizaine de jours en moyenne et dans des groupes ayant été exposés dans des conditions différentes (voir tableau 9.1). De plus, dans tous les cas présentés (en dehors des contrôles) des différences significatives avec ces derniers ont pu être observées, indiquant que l'exposition de tumeurs à des nsPEF, à travers des électrodes isolées et en présence de bléomycine, peut être envisagée, après optimisation des paramètres, comme une

technique nouvelle d'électrochimiothérapie.

SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

Synthèse

L'utilisation d'impulsions électriques dans un but thérapeutique est une méthode qui, au cours des dernières années, s'est révélée sûre et efficace pour transférer des gènes ou des molécules d'intérêt dans des cellules isolées ou dans différents tissus. La découverte d'effets complémentaires à l'échelle sub-cellulaire par application d'un nouveau type d'impulsions - les nanopulses - donne un nouvel élan à ces techniques, manquant encore un peu de compétitivité face aux méthodes virales.

Cette thèse, partant d'une analyse des travaux réalisés jusqu'à présent dans le domaine de l'électroperméabilisation, a montré quelques unes des possibilités offertes par ces nouvelles impulsions pour améliorer encore l'efficacité des traitements actuels, que ce soit dans le domaine du transfert de gènes ou du traitement de cancers par utilisation de l'électroperméabilisation. Ainsi, nous avons montré que l'exposition de cellules ou de tissus à ces impulsions combinée à un électrotransfert de gènes "conventionnel" permettait d'augmenter d'un facteur 3 à 6 la quantité de luciférase produite par rapport à des contrôles ayant été uniquement traités par électrotransfert. En parallèle, nous avons aussi vérifié que la combinaison entre une molécule anti-cancéreuse (la bléomycine) et l'exposition de tumeurs à ces impulsions pouvait être envisagée comme une nouvelle technique de traitement. Des expériences *in vivo* préliminaires remplaçant les impulsions classiquement utilisées en électrochimiothérapie par ces impulsions ultra-courtes ont montré un retard de croissance tumorale et parfois même une régression totale des tumeurs.

L'accumulation de résultats expérimentaux *in vitro* et *in vivo* a aussi permis de lister les points essentiels à leur bonne reproductibilité, tant en terme de paramètres électriques que dans la conception des systèmes d'exposition et de contrôle de l'application des impulsions. Le système d'application en lui-même, généralement constitué d'électrodes en métal, est parmi les points les plus critiques de la chaîne d'exposition. L'utilisation de cuvettes commerciales, par exemple, composées d'électrodes en aluminium dont l'état de surface n'avait pas été retravaillé, a conduit à une disparité dans nos résultats. Partant de ce constat et en y ajoutant le fait que les impulsions nanosecondes arrivent à affecter les vésicules internes sans perturber la membrane plasmique et isolante, il a été imaginé une nouvelle façon de délivrer ces impulsions, adaptable aussi bien dans des expériences *in vitro* que *in vivo*, à l'aide d'électrodes recouvertes d'une protection isolante électriquement et mécaniquement. Après s'être penché sur la théorie, nous avons montré expérimentalement que cette méthode permettait d'obtenir des augmentations de production de la luciférase identiques à celles obtenues dans le cas d'électrodes non isolées. En plus d'éliminer toute réaction chimique à l'interface des électrodes et du milieu contenant les cellules, cette technique a permis de franchir plus facilement le pas entre l'*in vitro* et l'*in vivo* en garantissant une protection électrique à basse fréquence des tissus traités.

Ces approches macroscopiques et *in vivo*, accompagnées d'une étape d'optimisation des différents paramètres, permettent d'envisager de nouvelles applications thérapeutiques. Cependant, une étape cruciale pour aboutir à des conditions optimales de traitement réside dans la compréhension des phénomènes

et des mécanismes associés à l'exposition de cellules ou de tissus à ces impulsions. Dans cette optique, nous avons fait appel aux techniques de la microtechnologie pour développer une biopuce permettant l'analyse en temps réel de ces effets à l'échelle cellulaire, à l'aide d'un microscope spécifique permettant de saisir des informations sur des temps aussi courts que les durées des impulsions étudiées. En s'appuyant sur des procédés de développement de laboratoires-sur-puce, des premiers prototypes conçus pour les générateurs nanoseconde et adaptés à l'environnement particulier d'un microscope DRASC ont été réalisés et testés.

En résumé, quatre voies ont été abordées au cours de cette thèse :

- la possibilité d'augmenter de manière significative l'efficacité de l'électrotransfert de gènes *in vitro* et *in vivo* ;
- la mise au point d'une nouvelle technique d'exposition à travers l'utilisation d'électrodes isolées ;
- la combinaison d'un agent anti-cancéreux (la bléomycine) avec des impulsions nanoseconde, dans le but de traiter des masses tumorales ;
- la réalisation d'un microdispositif pour analyser les effets de ces impulsions sur la cellule.

Perspectives

Les différents résultats présentés dans cette thèse restent une première approche exploratoire des possibilités offertes par ces nouvelles impulsions ultra-courtes. Des travaux futurs, à court terme tout d'abord, devront permettre d'une part la finalisation de la biopuce promise dans le cadre du projet ANR Nanopulsebiochip afin de permettre par la suite de récolter de nouvelles données sur les effets de ces impulsions sur les cellules et d'autre part la poursuite des premiers essais *in vivo* réalisés dans le cadre de l'électrotransfert de gènes et de molécules d'intérêt dans des tissus (muscles et tumeurs).

Le traitement proposé ici doit, en effet, encore être optimisé et les mécanismes associés mieux maîtrisés avant de pouvoir l'adapter à l'homme. Cette meilleure connaissance des phénomènes pourra par exemple passer par l'expérimentation *in vitro*, que ce soit en système macroscopique (cuvettes d'électroporation par exemple) ou en système microscopique (biopuce) en parallèle d'expériences *in vivo*. L'utilisation d'électrodes isolées reste tout autant intéressante que ce soit pour l'électrotransfert de gènes que de molécules thérapeutiques *in vitro* mais surtout *in vivo*. A plus long terme, il est possible d'envisager l'application d'impulsions électriques sur des tissus internes, sensibles tels que le cerveau par exemple, sans risque de lésions liées à des effets électrochimiques, qui étaient jusqu'alors un frein à l'expansion de cette technique vers de nouveaux organes.



RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Sakere, B., André, F., Bernat, C., Connault, E., Opolon, P., Davalos, R.V., Rubinsky, B., and Mir, L.M. (2007). Tumor ablation with irreversible electroporation. *PLoS ONE*, 2(11) :e1135.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J. Jr., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O., and Staudt, L.M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403 :503–511.
- André, F., Cournil-Henrionnet, C., Vernerey, D., Opolon, P., and Mir, L.M. (2006). Variability of naked DNA expression after direct local : the influence of the injection speed. *Gene Ther.*, 13(23) :1619–1627.
- André, F.M., Gehl, J., Sersa, G., Prémat, V., Hojman, P., Eriksen, J., Golzio, M., Cemazar, M., Pavselj, N., Rols, M.P., Miklavcic, D., Neumann, E., Teissié, J., and Mir, L.M. (2008). Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum. Gene Ther.*, 19(11) :1261–1271.
- Andreason, G.L. (1993). Electroporation as a technique for the transfer of macromolecules into mammalian cell lines. *J. Tissue Cult. Meth.*, 15(2) :56–62.
- Archer, S., Li, T.T., Evans, A.T., Britland, S.T., and Morgan, H. (1999). Cell reactions to dielectrophoretic manipulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 257 :687–698.
- Arnaud, M.C., Gazarian, T., Palacios-Rodriguez, Y., Gazarian, K., and Sakanyan, V. (2004). Array assessment of phage displayed peptide mimics of Human Immunodeficiency Virus type 1 gp41 immunodominant epitope : binding to antibodies of infected individuals. *Proteomics*, 4 :1959–1964.
- Azioune, A., Storch, M., Bornens, M., Théry, M., and Piel, M. (2009). Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab Chip*, 9 :1640–1642.
- Balagadde, F.K., You, L.C., Hansen, C.L., Arnold, F.H., and Quake, S.R. (2005). Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 309 :137–140.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. (1983). *Electrochimie, Principes, Méthodes et Applications*. Masson, France.
- Beebe, S.J., Blackmore, P.F., White, J., Joshi, R.P., and Schoenbach, K.H. (2004). Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms. *Physiol. Meas.*, 25 :1077–1093.

- Beebe, S.J., Fox, P.M., Rec, L.J., Somers, K., Stark, R.H., and Schoenbach, K.H. (2002). Nanosecond pulsed electric field (nspef) effects on cells and tissues : apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 30 :286–292.
- Beebe, S.J., Fox, P.M., Rec, L.J., Willis, L.K., and Schoenbach, K.H. (2003a). Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB J.*, 17 :1493–1495.
- Beebe, S.J. and Schoenbach, K.H. (2005). Nanosecond pulsed electric fields : a new stimulus to activate intracellular signaling. *J. Biomed. Biotech.*, 4 :297–300.
- Beebe, S.J., White, J., Blackmore, P.F., Deng, Y., Somers, K., and Schoenbach, K.H. (2003b). Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues. *DNA and Cell Biol.*, 22 :785–796.
- Benders, A.A.G.M., Li, J., Lock, R.A.C., Bindels, R.J.M., Bonga, S.E. W., and Veerkamp, J.H. (1994). Copper toxicity in cultured human skeletal muscle cells : the involvement of Na⁺/K⁺-ATPase and the Na⁺/Ca²⁺-exchanger. *Pflugers Archiv. European J. Physiology*, 428(5-6) :461–467.
- Bertucci, F., Houlgatte, R., Benziene, A., Granjeaud, S., Adélaïde, J., Tagett, R., Loriod, B., Jacquemier, J., Viens, P., Jordan, B., Birnbaum, D., and Nguyen, C. (2000). Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum. Mol. Genet.*, 9 :2981–2991.
- Biran, I. and Walt, D.R. (2002). Optical imaging fiber-based single live cell arrays : A high-density cell assay platform. *Anal. Chem.*, 74 :3046–3054.
- Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Sampas, N., Dougherty, E., Wang, E., Marincola, F., Gooden, C., Lueders, J., Glatfelter, A., Pollock, P., Carpten, J., Gillanders, E., Leja, D., Dietrich, K., Beaudry, C., Berens, M., Alberts, D., and Sondak, V. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, 406 :536–540.
- Braschler, T., Demierre, N., Nascimento, E., Silva, T., Oliva, A.G., and Renaud, P. (2008). Continuous separation of cells by balanced dielectrophoretic forces at multiple frequencies. *Lab Chip*, 8 :280–286.
- Buehner, W., Hill, J., Williams, T., and Woods, J. (1977). Application of ink jet technology to a word processing output printer. *IBM J. Res. Development*, 21 :2–9.
- Bureau, M.F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L.M., and Scherman, D. (2000). Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1474 :353–359.
- Burg, T.P. and Manalis, S.R. (2003). Suspended microchannel resonators for biomolecular detection. *Appl. Phys. Lett.*, 83 :2698–2700.
- Burns, M.A., Johnson, B.N., Brahmasandra, S.N., Handique, K., Webster, J.R., Krishnan, M., Sammarco, T.S., Man, P.M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C.H., and Burke, D.T. (1998). An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science*, 282 :484–487.
- Campana, L.G., Mocellin, S., Basso, M., Puccetti, O., Chiarion-Sileni, G.L. De Salvo, V., Vecchiato, A., Corti, L., Rossi, C.R., and Nitti, D. (2009). Bleomycin-based electrochemotherapy : clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients. *Ann. Surg. Oncol.*, 16 :191–199.

- Cemazar, M., Tamzali, Y., Sersa, G., Tozon, N., Mir, L.M., Miklavcic, D., Lowe, R., and Teissié, J. (2008). Electrochemotherapy in veterinary oncology. *J. Vet. Inter. Med.*, 22 :826–831.
- Chen, M.T., Jiang, C., Vernier, P.T., Wu, Y.H., and Gundersen, M.A. (2009). Two-dimensional nanosecond electric field mapping based on cell electropermeabilization. *PMC Biophys.*, 2(1) :9.
- Chen, N., Garner, A.L., Chen, G., Jing, Y., Deng, Y., Swanson, R.J., Kolb, J.F., Beebe, S.J., Joshi, R.P., and Schoenbach, K.H. (2007). Nanosecond electric pulses penetrate the nucleus and enhance speckle formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364 :220–225.
- Chen, Y.T. and Lee, D. (2007). A bonding technique using hydrophilic SU-8. *J. Micromech. Microeng.*, 17 :1978–1984.
- Chiou, C.H. and Lee, G.B. (2004). Minimal dead-volume connectors for microfluidics using PDMS casting techniques. *J. Micromech. Microeng.*, 14 :1484.
- Cho, Y.H., Lee, B.S., Le Pioufle, B., Takeuchi, S., and Kim, B.J. (2007). High-throughput single cell electroporation microchip with three dimensional SI microelectrodes for gene transfection. *Transducers, 2007-Lyon* :939–942.
- Cho, Y.K., Kim, J., Lee, Y., Kim, Y.A., Namkoong, K., Lim, H., Oh, K.W., Kim, S., Han, K., Park, C., Pal, Y.E., Ki, C.S., Choi, J.R., Myeong, H.K., and Ko, C. (2006). Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis b virus. *Biosens. Bioelectron.*, 21 :2161–2169.
- Choi, Y.S., Kim, H.B., Kwon, G.S., and Park, J.K. (2009). On-chip testing device for electrochemotherapeutic effects on human breast cells. *Biomed. Microdevices*, 11 :151–159.
- Chou, C.K. (1995). Radiofrequency hyperthermia in cancer therapy. In Bronzino, J., editor, *The biomedical engineering handbook*, volume 1, pages 1424–1430. CRC Press, Inc.
- Chu, G., Hayakawa, H., and Berg, P. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.*, 15 :1311–1326.
- Collombet, J.M., Wheeler, V.C., Vogel, F., and Coutelle, C. (1997). Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. a novel approach toward gene correction for mitochondrial disorders. *J. Biol. Chem.*, 272 :5342–5347.
- Corovic, S., Al-Sakere, B., Haddad, V., Miklavcic, D., and Mir, L.M. (2008). Importance of contact surface between electrodes and treated tissue in electrochemotherapy. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 7 :393–400.
- Coster, H.G. (1965). A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through". *Biophys. J.*, 5 :669–686.
- Crane, J.S. and Pohl, H.A. (1968). A study of living and dead yeast cells using dielectrophoresis. *J. Electrochem. Soc.*, 115 :584.
- Crowley, J.M. (1973). Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys. J.*, 13 :711–724.

- Cukjati, D., Batiuskaite, D., Andre, F., Miklavcic, D., and Mir, L.M. (2007). Real time electroporation control for accurate and safe in vivo non-viral gene therapy. *Bioelectrochemistry*, 70 :501–507.
- Curatolo, P., Mancini, M., Clerico, R., Ruggiero, A., Frascione, P., Di Marco, P., Frasca, M., and Calvieri, S. (2009). Remission of extensive merkel cell carcinoma after electrochemotherapy. *Arch. Dermatol.*, 145 :494–495.
- Daud, A.I., DeConti, R.C., Andrews, S., Urbas, P., Riker, A.I., Sondak, V.K., Munster, P.N., Sullivan, D.M., Ugen, K.E., Messina, J.L., and Heller, R. (2008). Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 26 :5896–5903.
- Davalos, R.V., Mir, L.M., and Rubinsky, B. (2005). Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann. Biomed. Eng.*, 33 :223–231.
- Davalos, R.V., Rubinsky, B., and Mir, L.M. (2003). Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation. *Bioelectrochemistry*, 61 :99–107.
- Debuisson, D., Treizebré, A., Houssin, T., Leclerc, E., Bartès-Biesel, D., Legrand, D., Mazurier, J., Arscott, S., Bocquet, B., and Senez, V. (2008). Nanoscale devices for online dielectric spectroscopy of biological cells. *Physiol. Meas.*, 29 :S213–S225.
- DeMello, A.J. (2006). Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 442 :394–402.
- Deng, J., Schoenbach, K., Buescher, E.S., Hair, P.S., Fox, P.M., and Beebe, S.J. (2003). The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells. *Biophys. J.*, 84 :2709–2714.
- Denoual, M., Macé, Y., Le Pioufle, B., Mognol, P., Castel, D., and Gidrol, X. (2006). Vacuum casting to manufacture a plastic biochip for highly parallel cell transfection. *Mater. Sci. Tech.*, 17 :3134–3140.
- Dittmar, A., Delhomme, G., and Gehin, C. (2008). Les systèmes vivants : une source d’inspiration pour les microsystèmes et les capteurs biomédicaux. *IRBM*, 29 :208–220.
- Djuzenova, C.S., Zimmermann, U., Frank, H., Sukhorukov, V.L., Richter, E., and Fuhr, G. (1996). Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporated myeloma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1284 :143–152.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, 16 :6127–6145.
- Duffy, D.C., McDonald, J.C., Schueller, O.J.A., and Whitesides, G.M. (1998). Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.*, 70 :4974–4984.
- El-Ali, J., Sorger, P.K., and Jensen, K.F. (2006). Cells on chips. *Nature*, 442 :403–411.
- Escoffre, J.M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., and Rols, M.P. (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol. Biotechnol.*, 41 :286–295.

- Esser, A., Smith, K.C., Gowrishankar, T.R., and Weaver, J.C. (2009). Towards solid tumor treatment by nanosecond pulsed electric fields. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 8(4) :289–306.
- Etchin, A. and Mamet, Y. (1982). Electrochemical skin burn after transcutaneous electronerve analgesia. *Anesth. Analg.*, 61 :801–802.
- Fair, R.B. (2007). Digital microfluidics : is a true lab-on-a-chip possible ? *Microfluid Nanofluid*, 3 :245–281.
- Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., El-Sayed, Y.Y., Chueh, J., and Quake, S.R. (2009). Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 200 :543.e1–543.e7.
- Fan, L.S., Tai, Y.C., and Muller, R.S. (1989). Ic-processed electrostatic micromotors. *Sensors and Actuators*, 20 :41–47.
- Fantini, F., Gualdi, G., Cimitan, A., and Giannetti, A. (2008). Metastatic basal cell carcinoma with squamous differentiation : report of a case with response of cutaneous metastases to electrochemotherapy. *Arch. Dermatol.*, 144 :1186–1188.
- Faurie, C., Rebersek, M., Golzio, M., Kanduser, M., Escoffre, J.M., Pavlin, M., Teissié, J., Miklavcic, D., and Rols, M.P. (2010). Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. *J. Gene Med.*, 12 :117–125.
- Filler, A.G. (2009). The history, development and impact of computed imaging in neurological diagnosis and neurosurgery : CT, MRI and DTI. *Nature Precedings*. doi :10.1038/npre.2009.3267.5.
- Francais, O., Ayina, A., Villemejeane, J., Rousseau, L., Mir, L.M., and Le Pioufle, B. (2009a). High density cell microarray based on dielectrophoresis traps induced by a matrix of singularities. *MicroTAS*, Jeju, Corée.
- Francais, O., Mahe, B., Dimitracopoulos, A., Julien, M.C., Lefevre, J.P., and Le Pioufle, B. (2009b). Digital concentration gradient generators on a microfluidic chip. *Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS*, MEMS/MOEMS '09.
- Frey, W., White, J.A., Price, R.O., Blackmore, P.F., Joshi, R.P., Nuccitelli, R., Beebe, S.J., Schoenbach, K.H., and Kolb, J.F. (2006). Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure. *Biophys. J.*, 90 :3608–3615.
- Friedrich, U., Stachowicz, N., Simm, A., Fuhr, G., Lucas, K., and Zimmermann, U. (1998). High efficiency electrotransfection with aluminum electrodes using microsecond controlled pulses. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 47 :103–111.
- Frénéa, M., Chiral, M., Le Pioufle, B., Melaine, N., Pineau, C., and Jegou, B. (2004). On-chip spermatozoa trapping by dielectrophoresis. *MicroTAS*, 2004-1 :111–113.
- Frénéa, M., Faure, S.P., Le Pioufle, B., Coquet, P., and Fujita, H. (2003). Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.*, 23 :597–603.

- Frénéa-Robin, M., Laforet, J., Robin, G., Le Pioufle, B., and Nicolas, L. (2007). Selecting an electrode structure for cell sorting by differential dielectric affinity. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2007 :6311–6314.
- Gabriel, B. and Teissié, J. (1995). Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroporation of chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1266 :171–178.
- Gabriel, B. and Teissié, J. (1999). Time courses of mammalian cell electroporation observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse. *Biophys. J.*, 76 :2158–2165.
- Gabrielli, C. (1994). Méthodes électrochimiques - mesures d'impédances. *Techniques de l'Ingénieur*, P2210.
- Garcia, P.A., Rossmeisl, J.H., Robertson, J., Ellis, T.L., and Davalos, R.V. (2009). Pilot study of irreversible electroporation for intracranial surgery. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 1 :6513–6516.
- Garner, A.L., Chen, G., Sridhara, V., Kolb, J.F., Swanson, R.J., Beebe, S.J., Joshi, R.P., and Schoenbach, K.H. (2007). Ultrashort electric pulse induced changes in cellular dielectric properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362 :139–144.
- Garon, E.B., Sawcer, D., Vernier, P.T., Tang, T., Sun, Y., Marcu, L., Gundersen, M.A., and Koeffler, H.P. (2007). In vitro and in vivo evaluation and a case report of intense nanosecond pulsed electric field as a local therapy for human malignancies. *Int. J. Cancer*, 121 :675–682.
- Gawad, S., Holmes, D., Benazzi, G., Renaud, P., and Morgan, H. (2010). Impedance spectroscopy and optical analysis of single biological cells and organisms in microsystems. *Methods Mol. Biol.*, 583 :149–182.
- Gawad, S., Schild, L., and Renaud, P. (2001). Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab Chip*, 1 :76–82.
- Gehl, J. and Mir, L.M. (1999). Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation using a rapid in vivo test for cell permeabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261 :377–380.
- Gimsa, J. and Wachner, D. (2001). Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophys. J.*, 81 :1888–1896.
- Ginggen, A., Tardy, Y., Crivelli, R., Bork, T., and Renaud, P. (2008). A telemetric pressure sensor system for biomedical applications. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 55 :1374–1381.
- Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., and Lander, E.S. (1999). Molecular classification of cancer : class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286 :531–537.
- Gorham, W.F. (1966). A new, general synthetic method for the preparation of linear poly-p-xylylene. *J. Polym. Sci. Part A-1*, 4 :3027–3039.

- Gowrishankar, T.R., Esser, A.T., Vasilkoski, Z., Smith, K.C., and Weaver, J.C. (2006). Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341 :1266–1276.
- Granneman, J.G., Li, P., Lu, Y., and Tilak, J. (2004). Seeing the trees in the forest : selective electroporation of adipocytes within adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 287 :E574–582.
- Granot, Y., Ivorra, A., Maor, R., and Rubinsky, B. (2009). In vivo imaging of irreversible electroporation by means of electrical impedance tomography. *Phys. Med. Biol.*, 54 :4927–4943.
- Grossi, E.A., Parish, M.A., Kralik, M.R., Glassman, L.R., Esposito, R.A., Ribakove, G.H., Galloway, A.C., and Colvin, S.B. (1993). Direct-current injury from external pacemaker results in tissue electrolysis. *Ann. Thorac. Surg.*, 56 :156–157.
- Gulliksen, A. and Karlsen, F. (2007). Microchips for the diagnosis of cervical cancer. *Methods Mol. Biol.*, 385 :65–86.
- Gundersen, M.A., Kuthi, A., Behrend, M., and Vernier, P.T. (2004). Bipolar nanosecond pulse generation using transmission lines for cell electro-manipulation. *Conf. Proc. IEEE Power Modulator Symposium*, 23-26 May 2004 :224–227.
- Haab, B.B., Dunham, M.J., and Brown, P.O. (2001). Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol.*, 2 :0004.1–0004.13.
- Haemmerich, D. and Laeseke, P.F. (2005). Thermal tumour ablation : devices, clinical applications and future directions. *Int. J. Hyperthermia*, 21 :755–760.
- Hair, P.S., Schoenbach, K.H., and Buescher, E.S. (2003). Sub-microsecond, intense pulsed electric field applications to cells show specificity of effects. *Bioelectrochemistry*, 61 :65–72.
- Halfmann, H.J., Röcken, W., Emeis, C.C., and Zimmermann, U. (1982). Transfer of mitochondrial function into a cytoplasmic respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces* yeast by electro-fusion. *Curr. Genet.*, 6 :25–28.
- Hall, E.H., Schoenbach, K., and Beebe, S.J. (2007a). Nanosecond pulsed electric fields have differential effects on cells in the S-phase. *DNA and Cell Biol.*, 26 :160–171.
- Hall, E.H., Schoenbach, K.H., and Beebe, S.J. (2007b). Nanosecond pulsed electric fields induce apoptosis in p53-wildtype and p53-null HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis*, 12(9) :1721–1731.
- He, H., Chang, D.C., and Lee, Y.K. (2006). Micro pulsed radio-frequency electroporation chips. *Bioelectrochemistry*, 68 :89–97.
- He, H., Chang, D.C., and Lee, Y.K. (2007). Using a micro electroporation chip to determine the optimal physical parameters in the uptake of biomolecules in hela cells. *Bioelectrochemistry*, 70 :363–368.
- He, Z., Pipparelli, A., Manissolle, C., Acquart, S., Garraud, O., Gain, P., and Thuret, G. (2009). Ex vivo gene electrotransfer to the endothelium of organ cultured human corneas. *Ophthalmic Res.*, 43(1) :43–55.

- Heller, R., Atkin, M. J. A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J., and Nicolau, C. (1996). In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.*, 389 :225–228.
- Hoefnagel, J.J., Dijkman, R., Basso, K., Jansen, P.M., Hallermann, C., Willemze, R., Tensen, C.P., and Vermeer, M.H. (2005). Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood*, 105 :3671–3678.
- Hoettges, K.F. (2010). Dielectrophoresis as a cell characterisation tool. *Methods Mol. Biol.*, 583 :183–198.
- Hojman, P., Gissel, H., André, F.M., Cournil-Henrionnet, C., Eriksen, J., Gehl, J., and Mir, L.M. (2008). Physiological effects of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *Hum. Gene Ther.*, 19(11) :1249–1260.
- Hong, J.W., Studer, V., Hang, G., Anderson, W.F., and Quake, S.R. (2004). A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture. *Nature Biotechnol.*, 22 :435–439.
- Houssin, T., Follet, J., Follet, A., Dei-Cas, E., and Senez, V. (2010). Label-free analysis of water-polluting parasite by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.*, 25 :1122–1129.
- Hu, Q. and Joshi, R.P. (2009). Transmembrane voltage analyses in spheroidal cells in response to an intense ultrashort electrical pulse. *Phys. Rev. E*, 79 :011901.
- Hu, Q., Viswanadham, S., Joshi, R.P., Schoenbach, K.H., Beebe, S.J., and Blackmore, P.F. (2005). Simulations of transient membrane behavior in cells subjected to a high-intensity ultrashort electric pulse. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 71.
- Huang, Y., Joo, S., Duhon, M., Heller, M., Wallace, B., and Xu, X. (2002). Dielectrophoretic cell separation and gene expression profiling on microelectronic chip arrays. *Anal. Chem.*, 74 :3362–3371.
- Huang, Y. and Rubinsky, B. (1999). Micro-electroporation : improving the efficiency and understanding of electrical permeabilization of cells. *Biomed. Microdevices*, 2(2) :145–150.
- Huang, Y. and Rubinsky, B. (2003). Flow-through micro-electroporation chip for high efficiency single-cell genetic manipulation. *Sens. Actuat. A-Phys.*, 104 :205–212.
- Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B., and Speed, T.P. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.*, 31 :e15.
- Ivorra, A., Al-Sakere, B., Rubinsky, B., and Mir, L.M. (2008). Use of conductive gels for electric field homogenization increases the antitumor efficacy of electroporation therapies. *Phys. Med. Biol.*, 21 :6605–6618.
- Ivorra, A., Al-Sakere, B., Rubinsky, B., and Mir, L.M. (2009). In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation : conductivity changes reflect the treatment outcome. *Phys. Med. Biol.*, 54(19) :5949–5963.
- Jo, B.H., van Lerberghe, L.M., Motsegood, K.M., and Beebe, D.J. (2000). Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *J. MEMS*, 9(1) :76–81.

- Jones, T.B. (1995). *Electromechanics of particles*. Cambridge University Press.
- Jordan, P., Leach, J., Padgett, M., Blackburn, P., Isaacs, N., Goksor, M., Hanstorp, D., Wright, A., Girkin, J., and Cooper, J. (2005). Creating permanent 3D arrangements of isolated cells using holographic optical tweezers. *Lab Chip*, 5 :1224–1228.
- Joshi, R.P., Nguyen, A., Sridhara, V., Hu, Q., Nuccitelli, R., Beebe, S.J., Kolb, J.F., and Schoenbach, K.H. (2007). Simulations of intracellular calcium release dynamics in response to a high-intensity, ultrashort electric pulse. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 75(4).
- Juneja, J.S., Wang, P.I., Karabacak, T., and Lu, T.M. (2006). Dielectric barriers, pore sealing, and metalization. *Thin Solid Films*, 504 :239–242.
- Kaji, H., Kanada, M., Oyamatsu, D., Matsue, T., and Nishizawa, M. (2004). Microelectrochemical approach to induce local cell adhesion and growth on substrates. *Langmuir*, 20 :16–19.
- Kanduser, M., Sentjurc, M., and Miklavcic, D. (2008). The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization. *Bioelectrochemistry*, 74 :52–57.
- Kang, Y., Li, D., Kalams, S.A., and Eid, J.E. (2008). DC-dielectrophoretic separation of biological cells by size. *Biomed. Microdevices*, 10 :243–249.
- Kawakami, M., Inagawa, R., Saito, T. H. T., and Kurasaki, M. (2008). Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 46(6) :2157–2164.
- Keenan, T.M. and Folch, A. (2008). Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip*, 8 :34–57.
- Kim, P.D., Truwit, C.L., and Hall, W.A. (2009). Three-tesla high-field applications. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 20(2) :173–178.
- Kobel, S., Valero, A., Latt, J., Renaud, P., and Lutolf, M. (2010). Optimization of microfluidic single cell trapping for long-term on-chip culture. *Lab Chip*, 10 :857–863.
- Kolb, J.F., Kono, S., and Schoenbach, K.H. (2006). Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects. *Bioelectromagnetics*, 27 :172–187.
- Kopetz, S., Cai, D., Rabe, E., and Neyer, A. (2007). PDMS-based optical waveguide layer for integration in electrical–optical circuit boards. *AEU-Int. J. Electron. C.*, 61 :163–167.
- Kotnik, T., Bobanovic, F., and Miklavcic, D. (1997). Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—a theoretical analysis. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 43 :285–291.
- Kotnik, T. and Miklavcic, D. (2000). Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys. J.*, 79 :670–679.
- Kotnik, T., Miklavcic, D., and Mir, L.M. (2001a). Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses : Part ii. reduced electrolytic contamination. *Bioelectrochemistry*, 54 :91–95.
- Kotnik, T., Miklavcic, D., and Slivnik, T. (1998). Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields – a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 45 :3–16.

- Kotnik, T., Mir, L.M., Flisar, K., Puc, M., and Miklavcic, D. (2001b). Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses. part i. increased efficiency of permeabilization. *Bioelectrochemistry*, 54 :83–90.
- Le Pioufle, B., Fauvarque, J.F., and Delalande, P. (1998). Non linear behavior of electrochemical generators associated to static converters. charge state detection. *Eur. Phys. J. Applied Phys.*, 2 :257–265.
- Lee, K.B., Park, S.J., Mirkin, C.A., Smith, J.C., and Mrksich, M. (2002). Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science*, 295 :1702–1705.
- Lee, P. and Hudson, T.J.S. (2000). La puce à adn en médecine et en sciences. *Médecine/Sciences*, 16 :43–49.
- Lee, S.W. and Tai, Y.C. (1999). A micro cell lysis device. *Sens. Actuat. A Phys.*, 73 :74–79.
- Lee, W.G., Demirci, U., and Khademhosseini, A. (2009). Microscale electroporation : challenges and perspectives for clinical applications. *Integr. Biol.*, 1 :242–251.
- Lefesvre, P., Attema, J., and van Bekkum, D. (2002). A comparison of efficacy and toxicity between electroporation and adenoviral gene transfer. *BMC Mol. Biol.*, 13 :12.
- Leonardi, M., Pitchon, E., Bertsch, A., Renaud, P., and Mermoud, A. (2009). Wireless contact lens sensor for intra ocular pressure monitoring : assessment on enucleated pig eyes. *Acta Ophthalmologica*, 87 :433–437.
- Le Pioufle, B., Frénéa, M., and Tixier, A. (2004). Biopuces pour le traitement de cellules vivantes : micromanipulation des cellules par voie électrique ou microfluidique. *Comptes Rendus Physique*, 5 :589–596.
- Le Pioufle, B., Surbled, P., Chun, K.S., Fujita, H., Nagai, H., Murakami, Y., and Tamiya, E. (1999). Cells on microsystems : Application to the gene transfection. *Transducers '99, Sendai (J)* :768–771.
- Le Pioufle, B., Surbled, P., Nagai, H., Murakami, Y., Chun, K.S., Tamiya, E., and Fujita, H. (2000). Living cells captured on a bio-microsystem devoted to DNA injection. *Mater. Sci. Eng.-C*, 12 :77–81.
- Le Pioufle, B., Suzuki, H., Tabata, K., Noji, H., and Takeuchi, S. (2008). Lipid bilayer microarray for parallel recording of transmembrane ion currents. *Anal. Chem., Tech. Note*, 80 :328–332.
- Liebesny, P. (1939). Athermic short wave therapy. *Arch. Phys. Ther.*, 19.
- Linderholm, P., Marescot, L., Loke, M.H., and Renaud, P. (2008). Cell culture imaging using microimpedance tomography. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 55 :138–146.
- Linnert, M. and Gehl, J. (2009). Bleomycin treatment of brain tumors : an evaluation. *Anticancer Drugs*, 20 :157–164.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R., and Lockhart, D.J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.*, 21 :20–24.

- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E.L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.*, 14 :1675–1680.
- Loste, F., Eynard, N., and Teissié, J. (1998). Direct monitoring of the field strength during electropulsation. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 47 :119–127.
- Loverde, C. (2009). Les ondes électromagnétiques. http://www.lyceejaufrederudel.info/spip.php?article41&var_recherche=champ%20electrique. [En ligne ; visité le 18-Dec-2009].
- Mahalik, N.P. (2008). Principle and applications of MEMS : a review. *Int. J. Manuf. Technol. Manage.*, 13 :324–343.
- Manz, A., Graber, N., and Widmer, H. (1990a). Miniaturized total chemical analysis systems : A novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuat. B Chem.*, 1 :244–248.
- Manz, A., Graber, N., and Widmer, H.M. (1990b). Miniaturized total chemical analysis systems : A novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuat. B Chem.*, 1 :244–248.
- Maor, R., Ivorra, A., and Rubinsky, B. (2009). Non thermal irreversible electroporation : novel technology for vascular smooth muscle cells ablation. *PLoS One*, 4 :e4757.
- Marcus, J.S., Anderson, W.F., and Quake, S.R. (2006). Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis. *Anal. Chem.*, 78 :3084–3089.
- Marmor, J.B., Hahn, N., and Hahn, G.M. (1977). Tumor cure and cell survival after localized radiofrequency heating. *Cancer Res.*, 37 :879–883.
- Martin, R.B. (1988). Metal ions in biological systems. *Bioinorganic Chem. of Aluminium*, 24 :11–17.
- Marty, M., Sersa, G., Garbay, J.R., Gehl, J., Collins, C.G., Snoj, M., Billard, V., Geertsen, P.F., Larkin, J.O., Miklavcic, D., Paulouic, I., Paulin-Kosir, S.M., Cemazar, M., Morsli, N., Soden, D.M., Rudolf, Z., Robert, C., O’Sullivan, G.C., and Mir, L.M. (2006). Electrochemotherapy - an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases : Results of esope (european standard operating procedures of electrochemotherapy) study. *Eur. J. Cancer (Suppl.)*, 4 :3–13.
- Masuda, S., Washizu, M., and Nanba, T. (1989). Novel method of cell-fusion in field constriction area in fluid integrated-circuit. *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 25 :732–737.
- Mathiesen, I. (1999). Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Ther.*, 6 :508–514.
- Maxwell, J.M. (1885 / 1887). *Traité d’Electricité et de Magnétisme*, volume Tome I et tome II. Gauthier-Villars.
- Metref, L., Bianchi, F., Vallet, V., Blanc, N., Goetschmann, R., and Renaud, P. (2009). Microfluidic system based on thermoexpandable polymer for on chip blood coagulation testing. *Micro Nanosystems*, 1 :41–45.

- Mezzasoma, L., Bacarese-Hamilton, T., Di Cristina, M., Rossi, R., Bistoni, F., and Crisantila, A. (2002). Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem.*, 48 :121–130.
- Miklavcic, D., Pucihar, G., Pavlovec, M., Ribaric, S., Mali, M., Macek-Lebar, A., Petkovsek, M., Nastram, J., Kranjc, S., Cemazar, M., and Sersa, G. (2005). The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry*, 65 :121–128.
- Mir, L.M. (2009). Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenotherapy) : past, current, and future. *Mol. Biotechnol.*, 43 :167–176.
- Mir, L.M., Banoun, H., and Paoletti, C. (1988). Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization : direct access to the cytosol. *Exp. Cell Res.*, 175 :15–25.
- Mir, L.M., Belehradek, M., Domenge, C., Orłowski, S., Poddevin, B., Belehradek Jr., J., Schwaab, G., Luboinski, B., and Paoletti, C. (1991a). Electrochemotherapy, a new antitumor treatment : first clinical trial. *C.R. Acad. Sci. III*, 313 :613–618.
- Mir, L.M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J.M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B., and Scherman, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 :4262–4267.
- Mir, L.M., Bureau, M.F., Rangara, R., Schwartz, B., and Scherman, D. (1998a). Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C. R. Acad. Sci. III*, 321 :893–899.
- Mir, L.M., Devauchelle, P., Quintin-Colonna, F., Delisle, F., Doliger, S., Fradelizi, D., Belehradek, J., and Orłowski, S. (1997). First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy. *Br. J. Cancer*, 76 :1617–1622.
- Mir, L.M., Gehl, J., Sersa, G., Collins, C.G., Garbay, J.R., Billard, V., Geertsen, P.F., Rudolf, Z., O'Sullivan, G.C., and Marty, M. (2006). Standard operating procedures of the electrochemotherapy : Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the cliniporator by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur. J. Cancer (Suppl.)*, 4 :14–25.
- Mir, L.M., Glass, L.F., Sersa, G., Teissié, J., Domenge, C., Miklavcic, D., Jaroszeski, M.J., Orłowski, S., Reintgen, D.S., Rudolf, Z., Belehradek, M., Gilbert, R., Rols, M.P., Belehradek Jr., J., Bachaud, J.M., DeConti, R., Stabuc, B., Cemazar, M., Coninx, P., and Heller, R. (1998b). Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br. J. Cancer*, 77 :2336–2342.
- Mir, L.M., Moller, P.H., Andre, F., and Gehl, J. (2005). Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv. Genet.*, 54 :83–114.
- Mir, L.M., Morsli, N., Garbay, J.R., Billard, V., Robert, C., and Marty, M. (2003). Electrochemotherapy : a new treatment of solid tumors. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 22 :145–148.

- Mir, L.M. and Orlowski, S. (1999). Mechanisms of electrochemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 35 :107–118.
- Mir, L.M. and Orlowski, S. (2000). The basis of electrochemotherapy. In *Electrochemotherapy, Electro-genotherapy, and Transdermal Drug Delivery*, volume 37 of *Methods in Molecular Medicine*, pages 99–117. Humana Press.
- Mir, L.M., Orlowski, S., Belehradek, J.Jr., and Paoletti, C. (1991b). Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur. J. Cancer*, 27 :68–72.
- Mir, L.M., Tounekti, O., and Orlowski, S. (1996). Bleomycin : revival of an old drug. *Gen. Pharmacol.*, 27 :745–748.
- Moller, M.G., Salwa, S., Soden, D.M., and O’Sullivan, G.C. (2009). Electrochemotherapy as an adjunct or alternative to other treatments for unresectable or in-transit melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 9(11) :1611–1630.
- Mottet, G. (2009). *Conception et réalisation d’un bio-microsystème basé sur la diélectrophorèse et l’électrofusio*n en vue de l’immunothérapie du cancer. PhD thesis, ENS de Cachan.
- Mottet, G., Villemejeane, J., Mir, L.M., and Le Pioufle, B. (2010). A technique to design a complex 3D lab-on-a-chip involving multilayered fluidics, embedded thick electrodes and hard packaging : application to dielectrophoresis and electroporation of cells. *J. Micromech. Microeng.*
- Muller, K.J., Sukhorukov, V.L., and Zimmermann, U. (2001). Reversible electropermeabilization of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of submicrosecond duration. *J Membrane Biol.*, 184 :161–170.
- Muth, E. (1927). Ueber die erscheinung der perlschnurkettenbildung von emulsionspartikelchen unter einwirkung eines weschselfelds. *Kolloid-Z.*, 41.
- Nascimento, E.M., Nogueira, N., Silva, T., Braschler, T., Demierre, N., Renaud, P., and Oliva, A.G. (2008). Dielectrophoretic sorting on a microfabricated flow cytometer : label free separation of babesia bovis infected erythrocytes. *Bioelectrochemistry*, 73 :123–128.
- Nathanson, H.C., Newell, W.E., Wickstrom, R.A., and Davis Jr., J.R. (1967). The resonant gate transistor. *IEEE Trans. Electron. Devices*, 14 :117–133.
- Neal, R.E. and Davalos, R.V. (2009). The feasibility of irreversible electroporation for the treatment of breast cancer and other heterogeneous systems. *Ann. Biomed. Eng.*, 37 :2615–2625.
- Netherton, B.L., Stecker, M.M., and Patterson, T. (2007). Mechanisms of electrode induced injury. part 3 : practical concepts and avoidance. *Am. J. Electroneurodiagnostic Technol.*, 47 :257–263.
- Neumann, E., Kakorin, S., and Toensing, K. (1999). Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 48(1) :3–16.
- Neumann, E. and Rosenheck, K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.*, 10 :279–290.

- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse luoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1 :841–845.
- Neumann, E., Toensing, K., Kakorin, S., Budde, P., and Frey, J. (1998). Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells. *Biophys. J.*, 74 :98–108.
- Nevill, J.T., Cooper, R., Dueck, M., Breslauer, D.N., and Lee, L.P. (2007). Integrated microfluidic cell culture and lysis on a chip. *Lab Chip*, 7 :1689–1695.
- Nguyen, C., Rocha, D., Granjeaud, S., Baldit, M., Bernard, K., Naquet, P., and Jordan, B.R. (1995). Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics*, 29 :207–216.
- Nuccitelli, R., Chen, X., Pakhomov, A.G., Baldwin, W.H., Sheikh, S., Pomicter, J.L., Ren, W., Osgood, C., Swanson, R.J., Kolb, J.F., Beebe, S.J., and Schoenbach, K.H. (2009). A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence. *Int. J. Cancer*, 125(2) :438–45.
- Nuccitelli, R., Pliquett, U., Chen, X., Ford, W., Swanson, R.J., Beebe, S.J., Kolb, J.F., and Schoenbach, K.H. (2006). Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342 :351–360.
- Orlowski, S., Belehradek Jr., J., Paoletti, C., and Mir, L.M. (1988). Transient electropermeabilization of cells in culture. increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem. Pharmacol.*, 37 :4727–4733.
- Pakhomov, A.G., Kolb, J.F., White, J.A., Joshi, R.P., Xiao, S., and Schoenbach, K.H. (2007a). Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nspef). *Bioelectromagnetics*, 28 :655–663.
- Pakhomov, A.G., Shevin, R., White, J.A., Kolb, J.F., Pakhomova, O.N., Joshi, R.P., and Schoenbach, K.H. (2007b). Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Arch. Biochem. Biophys.*, 465 :109–118.
- Patterson, T., Stecker, M.M., and Netherton, B.L. (2007). Mechanisms of electrode induced injury. part 2 : Clinical experience. *Am. J. Electroneurodiagnostic Technol.*, 47 :93–113.
- Pauly, H. and Schwann, H.P. (1959). Über die impedanz einer suspension von kugelformigen teilchen mit einer schale. *Z. Naturforsch., B : Anorg. Chem., Org. Chem.*, 14 :125–131.
- Petra, P.S. and Manz, A. (2006). Lab-on-a-chip : microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 :210–218.
- Pliquett, U., Gallo, S., Hui, S.W., Gusbeth, C., and Neumann, E. (2005). Local and transient structural changes in stratum corneum at high electric fields : contribution of Jule heating. *Bioelectrochemistry*, 67(1) :37–46.
- Pohl, H. (1951). The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields. *J. Appl. Phys.*, 22 :869–871.

- Pohl, H.A. and Hawk, I. (1966). Separation of living and dead cells by dielectrophoresis. *Science*, 152 :647–649.
- Potter, H. (1988). Electroporation in biology : methods, applications, and instrumentation. *Anal. Biochem.*, 1988 :361–373.
- Prime, K.L. and Whitesides, G.M. (1993). Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) : a model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 115 :10714–10721.
- Puc, M., Kotnik, T., Mir, L.M., and Miklavcic, D. (2003). Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electroporabilization. *Bioelectrochemistry*, 60 :1–10.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Kanduser, M., and Miklavcic, D. (2001). The influence of medium conductivity on electroporabilization and survival of cells in vitro. *Bioelectrochemistry*, 54 :107–15.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Miklavcic, D., and Teissié, J. (2008). Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporabilized cells. *Biophys. J.*, 95 :2837–2848.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Valic, B., and Miklavcic, D. (2006). Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Annals Biomed. Eng.*, 34 :642–652.
- Pucihar, G., Mir, L.M., and Miklavcic, D. (2002). The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electroporabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry*, 57 :167–172.
- Quaglino, P., Mortera, C., Osella-Abate, S., Barberis, M., Illengo, M., Rissone, M., Savoia, P., and Benengo, M.G. (2008). Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Ann. Surg. Oncol.*, 15 :2215–2222.
- Quemper, J.M., Dufour-Gergam, E., Frantz-Rodriguez, N., Gilles, J.P., Grandchamp, J.P., and Bosseboeuf, A. (2000). Effects of direct and pulse current on copper electrodeposition through photoresist molds. *J. Micromech. Microeng.*, 10 :116–119.
- Rols, M.-P., Golzio, M., Delteil, C., and Teissié, J. (2000). In vitro delivery of drugs and other molecules to cells. In *Electrochemotherapy, Electrogenetherapy, and Transdermal Drug Delivery*, volume 37 of *Methods in Molecular Medicine*, pages 83–97. Humana Press.
- Rols, M.P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., and Teissié, J. (1998). In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat. Biotechnol.*, 16 :168–171.
- Rols, M.P., Tamzali, Y., and Teissié, J. (2002). Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report. *Bioelectrochemistry*, 55 :101–105.
- Rols, M.P. and Teissié, J. (1990). Electroporabilization of mammalian cells. quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys. J.*, 58 :1089–1098.
- Rols, M.P. and Teissié, J. (1992). Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporabilization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1111 :45–50.

- Rols, M.P. and Teissié, J. (1998). Electroporation of mammalian cells to macromolecules : control by pulse duration. *Biophys. J.*, 75 :1415–1423.
- Saito, M., Schwan, H.P., and Schwarz, G. (1966). Response of nonspherical biological particles to alternating electric fields. *Biophys. J.*, 6 :313–327.
- Sale, A.J. and Hamilton, W.A. (1968). Effects of high electric fields on micro-organisms. 3. lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 163 :37–43.
- Salomskaite-Davalgiene, S., Cepurniene, K., Satkauskas, S., Venslauskas, M.S., and Mir, L.M. (2009). Extent of cell electrofusion in vitro and in vivo is cell line dependent. *Anticancer Res.*, 29(8) :3125–3130.
- Sankaran, B., Racic, M., Tona, A., Rao, M.V., Gaitan, M., and Forry, S.P. (2008). Dielectrophoretic capture of mammalian cells using transparent indium tin oxide electrodes in microfluidic systems. *Electrophoresis*, 29 :5047–5054.
- Satkauskas, S., André, F., Bureau, M.F., Scherman, D., Miklavcic, D., and Mir, L.M. (2005). Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer. *Hum. Gene Ther.*, 16 :1194–1201.
- Satkauskas, S., Bureau, M.F., Puc, M., Mahfoudi, A., Miklavcic, D. S. D., and Mir, L.M. (2002). Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer : Respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Mol. Ther.*, 5 :133–140.
- Saulis, G., Rodaite-Riseviciene, R., and Snitka, V. (2007). Increase of the roughness of the stainless-steel anode surface due to the exposure to high-voltage electric pulses as revealed by atomic force microscopy. *Bioelectrochemistry*, 70 :519–523.
- Scarlett, S.S., White, J.A., Blackmore, P.F., Schoenbach, K.H., and Kolb, J.F. (2009). Regulation of intracellular calcium concentration by nanosecond pulsed electric fields. *Biochimica Biophysica Acta*, 1788 :1168–1175.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270 :467–470.
- Schmidt, E.M., McIntosh, J.S., and Bak, M.J. (1988). Long-term implants of parylene-C coated microelectrodes. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 26 :96–101.
- Schoenbach, K.H. (2007). Bioelectric effects of intense nanosecond pulses. *IEEE Trans. Dielectrics and Electrical Insulation*, 14 :1088.
- Schoenbach, K.H., Beebe, S.J., and Buescher, E.S. (2001). Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics*, 22 :440–448.
- Schwann, H.P. (1957). Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv*, 5 :147–209.
- Senez, V., Akalin, T., Arscott, S., Bourzgui, N.E., BOcquet, B., Fujii, T., Lennon, E., and Yamamoto, T. (2006). Top-down approaches for the study of single-cells : micro-engineering and electrical phenotype. *Adv. Sci. Tech.*, 53 :97–106.

- Senez, V., Lennon, E., Ostrovidov, S., Yamamoto, T., Fujita, H., Sakai, Y., and Fujii, T. (2008). Integrated 3D silicon electrodes for electrochemical sensing in microfluidic environments : application to single cell characterization. *IEEE Sensors J.*, 8 :548–557.
- Shafiee, H., Caldwell, J.L., Sano, M.B., and Davalos, R.V. (2009). Contactless dielectrophoresis for particle manipulation on-chip. *Biomed. Microdevices*, 11 :997–1006.
- Shin, Y.S., Cho, K., Lim, S.H., Chung, S., Park, S.J., Chung, C., Han, D.C., and Chang, J.K. (2003). PDMS-based micro PCR chip with parylene coating. *J. Microchem. Microeng.*, 13 :768–774.
- Squires, T.M. and Quake, S.R. (2005). Microfluidics : fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Modern Phys.*, 77 :977–1026.
- Stacey, M., Stickley, J., Fox, P., Statler, V., Schoenbach, K., Beebe, S.J., and Buescher, E.S. (2003). Differential effects in cells exposed to ultra-short high intensity electric fields : cell survival, DNA damage and cell cycle analysis. *Mutat. Res.*, 542 :65–75.
- Stecker, M.M., Patterson, T., and Netherton, B.L. (2006). Mechanisms of electrode induced injury. part 1 : theory. *Am. J. Electroneurodiagnostic Technol.*, 46 :315–342.
- Sugar, I.P., Forster, W., and Neumann, E. (1987). Model of cell electrofusion. Membrane electroporation, pore coalescence and percolation. *Biophys. Chem.*, 26(2-3) :321–335.
- Sundararajan, R. (2008). Nanosecond electroporation : a first look. *Methods. Mol. Biol.*, 423 :109–128.
- Sundararajan, R. (2009). Nanosecond electroporation : another look. *Mol. Biotechnol.*, 41 :69–82.
- Susin, S.A., Zamzami, N., and Kroener, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis : doubt no more. *BBA-Bioenergetics*, 1366 :151–165.
- Suzuki, H., Le Pioufle, B., and Takeuchi, S. (2009). Ninety-six-well planar lipid bilayer chip for ion channel recording fabricated by hybrid stereolithography. *Miomed. Microdevices*, 11 :17–22.
- Suzuki, T., Shin, B.C., Fujikura, K., Matsuzaki, T., and Takata, K. (1998). Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. *FEBS Lett.*, 425 :436–440.
- Tabeling, P. (2003). *Introduction à la microfluidique*. Belin.
- Tai, Y.C. and Muller, R.S. (1989). Ic-processed electrostatic synchronous micromotors. *Sensors and Actuators*, 20 :48–55.
- Taketo, A. (1988). DNA transfection of Escherichia coli by electroporation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 31 :318–324.
- Tanase, M., Felton, E.J., Gray, D.S., Hultgren, A., Chen, C.S., and Reich, D.H. (2005). Assembly of multicellular constructs and microarrays of cells using magnetic nanowires. *Lab Chip*, 5 :598–605.
- Tang, L., Yao, C., and Sun, C. (2009). Apoptosis induction with electric pulses - a new approach to cancer therapy with drug free. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390(4) :1098–1101.

- Tang, W.C., Nguyen, T.C.H., Judy, M.W., and Howe, R. (1990). Electrostatic-comb drive of lateral polysilicon resonators. *Sens. Actuat. A Phys.*, 21 :328–331.
- Taylor, M. (2000). Muscle development : molecules of myoblast fusion. *Curr. Biol.*, 10 :R646–648.
- Teissié, J., Golzio, M., and Rols, M.P. (2005). Mechanisms of cell membrane electropermeabilization : a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochim. Biophys. Acta*, 1724 :270–280.
- Teissié, J., Knutson, V.P., Tsong, T.Y., and Lane, M.D. (1982). Electric pulse-induced fusion of 3T3 cells in monolayer culture. *Science*, 216 :537–538.
- Teissié, J. and Rols, M.P. (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys. J.*, 65 :409–413.
- Teixeira-Pinto, A.A., Nejelski Jr, L.L., Cutler, J.L., and Heller, J.H. (1960). The behavior of unicellular organisms in an electromagnetic field. *Exp. Cell Res.*, 20 :548–564.
- Tekle, E., Astumian, R.D., and Chock, P.B. (1991). Electroporation by using bipolar oscillating electric field : an improved method for DNA transfection of NIH3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :4230–4234.
- Tekle, E., Oubrahim, H., Dzekunov, S.M., Kolb, J.F., Schoenbach, K.H., and Chock, P.B. (2005). Selective field effects on intracellular vacuoles and vesicle membranes with nanosecond electric pulses. *Biophys. J.*, 89 :274–284.
- Terry, S., Jerman, J., and Angell, J. (1979). A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Trans. Electron Devices*, 26 :1880–1886.
- Thorsen, T., Maerkl, S.J., and Quake, S.R. (2002). Microfluidic large scale integration. *Science*, 298 :580–584.
- Tiercelin, N., Coquet, P., Senez, V., Sauleau, R., and Fujita, H. (2006). Polydimethylsiloxane membranes for millimeter-wave planar ultra flexible antennas. *J. Micromech. Microeng.*, 16 :2389–2395.
- Titomirov, A.V., Sukharev, S., and Kistanova, E. (1991). In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088 :131–134.
- Toneguzzo, F., Hayday, A.C., and Keating, A. (1986). Electric field-mediated DNA transfer : transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol. Cell Biol.*, 6 :703–706.
- Tornay, R., Braschler, T., Demierre, N., Steitz, B., Finka, A., Hofmann, H., Hubbell, J.A., and Renaud, P. (2008). Dielectrophoresis-based particle exchanger for the manipulation and surface functionalization of particles. *Lab Chip*, 8 :267–273.
- Tresset, G. and Takeuchi, S. (2004). A microfluidic device for electrofusion of biological vesicles. *Bio-med. Microdevices*, 6 :213–218.
- Umezawa, H., Ishizuka, M., Maeda, K., and Takeuchi, T. (1967). Studies on bleomycin. *Cancer*, 20 :891–895.

- Unger, M.A., Chou, H., Thorsen, T., Scherer, A., and Quake, S.R. (2000). Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288 :113–116.
- van den Berg, A. and Bergveld, P. (2006). Labs-on-a-chip : origin, highlights and future perspectives. on the occasion of the 10th *µtas* conference. *Lab Chip*, 6 :1266–1273.
- Vandenbroucke, R.E., Lucas, B., Demeester, J., Smedt, S.C. D., and Sanders, N.N. (2007). Nuclear accumulation of plasmid DNA can be enhanced by non-selective gating of the nuclear pore. *Nucleic Acids Res.*, 35 :e86.
- Vernier, P.T., Levine, Z.A., Wu, Y.H., Joubert, V., Ziegler, M.J., Mir, L.M., and Tieleman, D.P. (2009). Electroporating fields target oxidatively damaged areas in cell membrane. *PLoS ONE*, 4(11) :e7966.
- Vernier, P.T., Sun, Y., Chen, M.T., Gundersen, M.A., and Craviso, G.L. (2008). Nanosecond electric pulse-induced calcium entry into chromaffin cells. *Bioelectrochemistry*, 73 :1–4.
- Vernier, P.T., Sun, Y., and Gundersen, M.A. (2006a). Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *BMC Cell Biol.*, 7 :37.
- Vernier, P.T., Sun, Y., Marcu, L., Craft, C.M., and Gundersen, M.A. (2004a). Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation. *Biophys. J.*, 86 :4040–4048.
- Vernier, P.T., Sun, Y., Marcu, L., Craft, C.M., and Gundersen, M.A. (2004b). Nanosecond pulsed electric fields perturb membrane phospholipids in T lymphoblasts. *FEBS Lett.*, 572 :103–108.
- Vernier, P.T., Sun, Y., Marcu, L., Salemi, S., Craft, C.M., and Gundersen, M.A. (2003). Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310 :286–295.
- Vernier, P.T. and Ziegler, M.J. (2007). Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers. *J. Phys. Chem. B.*, 111 :12993–12996.
- Vernier, P.T., Ziegler, M.J., Sun, Y., Gundersen, M.A., and Tieleman, D.P. (2006b). Nanopore-facilitated, voltage-driven phosphatidylserine translocation in lipid bilayers—in cells and in silico. *Phys. Biol.*, 3 :233–247.
- Villemejeane, J. and Mir, L.M. (2009). Physical methods of nucleic acid transfer : General concepts and applications. *Brit. J. Pharmacol.*, 157 :207–219.
- Voldman, J. (2006). Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8 :425–454.
- Wahizu, M. (1989). Electrostatic manipulation of biological objects in microfabricated structures. *Proc. Integrated micro-motion systems*, Elsevier Publisher :417–432.
- Wang, M.M., Tu, E., Raymond, D.E., Yang, J.M., Zhang, H., Hagen, N., Dees, B., Mercer, E.M., Forster, A.H., Kariv, I., Marchand, P.J., and Butler, W.F. (2005). Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nature Biotechnol.*, 23 :83–87.
- Wang, X., Moualla, D., Wright, J.A., and Brown, D. (2010). Copper binding regulates intracellular alpha-synuclein localisation, aggregation and toxicity. *J. Neurochem.*

- Wang, Z., Kim, M.C., Marquez, M., and Thorsen, T. (2007). High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis. *Lab Chip*, 7 :740–745.
- Wasungu, L., Escoffre, J.M., Valette, A., Teissié, J., and Rols, M.P. (2009). A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation. *Int. J. Pharm.*, 379 :278–284.
- Weaver, J.C. (2003). Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales. *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, 10(5) :754–768.
- Weigl, B.H., Bardell, R.L., and Cabrera, C.R. (2003). Lab-on-a-chip for drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55 :349–377.
- White, J.A., Blackmore, P.F., Schoenbach, K.H., and Beebe, S.J. (2004). Stimulation of capacitive calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields. *J Biol Chem*, 279 :22964–22972.
- Win, W.H., Yan, G.Z., and Wang, W.X. (2010). A stable wireless energy transmission system for gastrointestinal microsystems. *J. Med. Eng. Technol.*, 34 :64–70.
- Wolf, H., Rols, M.P., Boldt, E., Neumann, E., and Teissié, J. (1994). Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.*, 66(2) :524–531.
- Woytasik, M., Grandchamp, J.P., Dufour-Gergam, E., Marincic, E., Gilles, J.P., Megherbi, S., Lavalley, V., and Mathet, V. (2006). Fabrication of planar and three-dimensional microcoils on flexible substrates. *Microsyst. Technol.*, 12 :973–978.
- Wu, J. (2008). Interactions of electrical fields with fluids : laboratory-on-a-chip applications. *IET Nano-biotechnol.*, 2 :14–27.
- Yang, F., Yang, X., Jiang, H., Bulkhaults, P., Wood, P., Hrushesky, W., and Wang, G. (2010). Dielectrophoretic separation of colorectal cancer cells. *Biomicrofluidics*, 4.
- Yang, T.A., Heiser, W.C., and Sedivy, J.M. (1995). Efficient in situ electroporation of mammalian cells grown on microporous membranes. *Nucleic Acids Res.*, 23(15) :2803–2810.
- Yang, X.J., Li, J., Sun, C.X., Zheng, F.Y., and Hu, L.N. (2009). The effect of high frequency steep pulsed electric fields on in vitro and in vivo antitumor efficiency of ovarian cancer cell line skov3 and potential use in electrochemotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 28 :53.
- Yu, L., Tay, F.E.H., Xu, G., Chen, B., Avram, M., and Iliescu, C. (2006). Adhesive bonding with SU-8 at wafer level for microfluidic devices. *J. Phys. Conf. Series*, 34 :776–781.
- Zampaglione, I., Arcuri, M., Cappelletti, M., Ciliberto, G., Perretta, G., Nicosia, A., Monica, N. L., and Fattori, E. (2005). In vivo DNA gene electro-transfer : a systematic analysis of different electrical parameters. *J. Gene Med.*, 7 :1475–1481.
- Zhang, J., Blackmore, P.F., Hargrave, B.Y., Xiao, S., Beebe, S.J., and Schoenbach, K.H. (2008). Bioelectric effects of intense nanosecond pulses. *Arch. Biochem. Biophys.*, 471 :240–248.

-
- Zhong, J.F., Chen, Y., Marcus, J.S., Scherer, A., Quake, S.R., Taylor, C.R., and Weiner, L.P. (2007). A microfluidic processor for gene expression profiling of single human embryonic stem cells. *Lab Chip*, 8 :68–74.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R.A., Gerstein, M., and Snyder, M. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 293 :2101–2105.
- Zimmermann, U. (1982). Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta*, 694 :227–277.
- Zimmermann, U., Pilwat, G., and Riemann, F. (1974). Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys. J.*, 14 :881–899.
- Ziv, R., Steinhardt, Y., Pelled, G., Gazit, D., and Rubinsky, B. (2009). Micro-electroporation of mesenchymal stem cells with alternating electrical current pulses. *Biomed. Microdevices*, 11 :95–101.
- Zupanic, A., Ribaric, S., and Miklavcic, D. (2007). Increasing the repetition frequency of electric pulse delivery reduces unpleasant sensations that occur in electrochemotherapy. *Neoplasma*, 54 :246–250.



LES DIFFÉRENTS ARTICLES

Revue : Physical methods of nucleic acid transfer : general concepts and applications

J. VILLEMEJANE et L.M. MIR

BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY

157, 207–219, 2009

Les méthodes physiques de transfert de gènes ou de médicaments nécessite de combiner deux effets différents pour délivrer du matériel thérapeutique à l'intérieur des cellules. Ces techniques doivent (i) induire une alteration réversible de la membrane plasmique pour permettre le passage direct des molécules d'intérêt dans le cytosol et (ii) amener les acides nucléiques au plus proche de la membrane perméabilisée ou faciliter l'accès à l'intérieur des cellules. Ces deux effets peuvent être réalisés en une ou plusieurs étapes, dépendant de la méthode employée.

Dans cette revue, diverses méthodes physiques sont décrites et discutées : la biolistique, l'injection par jet (*jet injection*), l'injection hydrodynamique, les ultrasons, les champs magnétiques et les champs électriques pulsés. Pour chacune d'entre elles, nous décrivons les mécanismes physiques sous-jacents et discutons de leurs avantages et de leurs limites.

Alors que certaines de ces méthodes sont déjà utilisées chez l'homme, d'autres sont encore en cours de développement et d'optimisation en vue d'essais cliniques pour le transfert de gènes. D'autres possibilités offertes par ces méthodes ne se limitent pas au transfert de gènes et un complément d'informations sur l'utilisation de ces méthodes dans un autre registre est aussi présenté ici.

Ces méthodes de transfert de gènes, permettant de s'affranchir des effets secondaires liés à l'utilisation de vecteurs viraux ou biochimiques, trouveront leurs places pour des applications cliniques spécifiques dans les prochaines années.

THEMED SECTION: VECTOR DESIGN AND DRUG DELIVERY REVIEW

Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications

Julien VILLEMEJANE^{1,2} and Lluís M. MIR^{1,2}

¹CNRS, UMR 8121, Institut Gustave Roussy PR2, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif Cedex, France, and ²Univ Paris-Sud, UMR 8121, Institut Gustave Roussy PR2, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif Cedex, France

Physical methods of gene (and/or drug) transfer need to combine two effects to deliver the therapeutic material into cells. The physical methods must induce reversible alterations in the plasma membrane to allow the direct passage of the molecules of interest into the cell cytosol. They must also bring the nucleic acids in contact with the permeabilized plasma membrane or facilitate access to the inside of the cell. These two effects can be achieved in one or more steps, depending upon the methods employed. In this review, we describe and compare several physical methods: biolistics, jet injection, hydrodynamic injection, ultrasound, magnetic field and electric pulse mediated gene transfer. We describe the physical mechanisms underlying these approaches and discuss the advantages and limitations of each approach as well as its potential application in research or in preclinical and clinical trials. We also provide conclusions, comparisons, and projections for future developments. While some of these methods are already in use in man, some are still under development or are used only within clinical trials for gene transfer. The possibilities offered by these methods are, however, not restricted to the transfer of genes and the complementary uses of these technologies are also discussed. As these methods of gene transfer may bypass some of the side effects linked to viral or biochemical approaches, they may find their place in specific clinical applications in the future.

British Journal of Pharmacology (2009) **157**, 207–219; doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00032.x; published online 21 January 2009

This article is part of a themed section on Vector Design and Drug Delivery. For a list of all articles in this section see the end of this paper, or visit: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/121548564/issueyear?year=2009>

Keywords: gene gun; jet injection; hydrodynamic gene transfer; electro-gene therapy; electro-transfer; sonotransfection; magnetotransfection; naked DNA; cell permeabilization

Abbreviations: ECT, electrochemotherapy; EGT, electrogene therapy; HV, high voltage pulses; LV, low voltage pulses; SPION, superparamagnetic iron oxide nanoparticles

Introduction

The existence of therapeutic targets located within cells has been known for decades. Most of the traditional anti-cancer drugs (still extensively used in chemotherapy) have intracellular targets, such as the cell DNA or the enzymes of the DNA synthesis pathways. These drugs easily enter cells, mainly due to their small size and physicochemical characteristics. Advances in understanding of many diverse intracellular mechanisms, such as signalling pathways, intracellular regulatory pathways through siRNAs, the identification of genes responsible for severe diseases etc., have identified new intracellular targets and novel therapeutic molecules are currently

under development, including complete genes. Many of these molecules are nucleic acids, and they are not able to diffuse through the plasma membrane due to their size and/or their physicochemical properties, for instance hydrophilicity. The therapeutic expectations of gene therapy are considerable. The goal of curing genetic diseases by the transfer of genes coding for functional proteins absent in specific patients is highly desirable. Moreover, the use of gene-transfected cells to produce large quantities of secreted proteins for direct therapeutic application or for the production of vaccines is also of considerable benefit. Strategies for the transfer of nucleic acids, especially genes, have been developed. These strategies include the use of viral vectors, chemical vectors and physical vectors. The physical vectors allow the direct penetration into the cytosol of both small and large nucleic acid molecules, as well as of any other non-permeable molecule, which normally cannot reach the cell cytosol because it can not diffuse

through the plasma membrane or because it is not actively transported across the plasma membrane.

Viral vectors are extremely effective in transferring genes and are the most advanced in development. The efficacy with which these agents affect DNA transfer, particularly *in vivo*, is due to their efficiency and specificity in entering cells and expressing the genes carried in the modified viral genome using the cell's own biosynthetic machinery. Unfortunately, there are well-known adverse effects, such as the immunogenicity of the adenoviral vectors, as well as potential and real risks associated with the use of such viruses, including cell transformation (by insertional mutagenesis with retroviruses), cancer development, etc.

On the other hand, physical and chemical methods of targeting also allow the transfer of long and short nucleic acids, DNA or RNA, across the cell membrane. Physical methods, that is non-viral and non-chemical, can bypass many of the side effects linked to viral or biochemical techniques, and they allow repeated administration of drugs or DNA. Another advantage is that, contrary to the situation with the viral vectors and some chemical vectors, there is no limitation in the length of the coding sequence that can be carried by the physical vectors.

The biggest challenge for these physical approaches is to attain the same efficiency of gene transfer as the viral methods. All the gene transfer methods (viral or non-viral) must overcome two major constraints:

First, there is the need to bring the nucleic acids to the target cells. Viruses are 'naturally' equipped for such encounters. The more 'intelligent' chemical vectors, which are 'stealthy' with respect to the body defence mechanisms, such as the reticulo-endothelial system, are able to recognize specific antigens at the cell surface and are thus able to locate defined target cells. In the case of physical vectors, most use naked DNA, hence, not only does this DNA need to be brought to the target tissue (lung, muscle), but because of the absence of spontaneous diffusion of DNA within the tissues, there is a need for 'active transport' systems to move the DNA within the tissue to individual cells.

The second constraint is that of penetration of the nucleic acids into the cell through the plasma membrane. While viruses achieve this using natural mechanisms, chemical and physical vectors must perturb the plasma membrane (i.e. physical vectors) and/or internal vesicular membranes (e.g. the cationic lipids after their incorporation into the endosomes).

In order to obtain an efficient vector system, particularly a physical one, and to achieve a high rate of cell transfection, these two conditions must be integrated in the development of a genetic vector.

Here, we describe and compare several types of physical methods of gene or drug transfer *in vivo*: biolistics, jet injection, hydrodynamic injection, ultrasound, magnetic field and electric pulse mediated gene transfer. We discuss the physical mechanisms underlying these approaches and we compare their relative advantages and their potential therapeutic applications in research or in preclinical and clinical medicine. The possible uses of the techniques described in this article have not been restricted exclusively to the transfer of genes, and hence, complementary uses of these technologies are also discussed.

Preamble

In vivo, cells can take up naked DNA but the mechanism of this uptake is not completely defined. For example, a simple injection of a plasmid into skeletal muscle may result in the expression of the proteins coded by the DNA at low and extremely variable levels (Wolff *et al.*, 1990; 1991). Similar results have been reported using other tissues such as heart (Acsadi *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1997), skin (Hengge *et al.*, 1996) and thyroid (Sikes *et al.*, 1994). One hypothesis for this phenomenon proposed the existence of a DNA uptake pathway involving endocytosis mediated by DNA receptors (Budker *et al.*, 2000).

It has been recently shown that a rapid injection into a tissue can also induce an increase of the gene expression compared with a 'classical' slow injection (André *et al.*, 2006). In muscle, an injection of less than 2 s duration results in a 500-fold increase of gene expression compared with the expression obtained with the same amount of DNA injected over 25 s, even when using the same injection volume (20 µL). Most of this uptake can be inhibited by the addition of heparin, a linear polymer with anionic charges that mimics the phosphate charge distribution of DNA. This observation is suggestive of receptor-mediated uptake of DNA as heparin would be a competitive inhibitor of the DNA binding to the receptors. However, at the highest injection speed, a slight permeabilization of the muscle fibres was also observed (André *et al.*, 2006). In the brain, another 'simple injection' technique has been applied to improve drug and gene transfer, known as the convection-enhanced delivery. It consists of a continuous injection of a fluid containing drugs or plasmids under positive pressure (Raghavan *et al.*, 2006). The main benefit is that the volume distribution of the drug or the gene into the brain is enhanced because of their transport by convection, that is by the injected fluid itself (Voges *et al.*, 2003; Raghavan *et al.*, 2006).

The role of the injections is to introduce the naked DNA into the tissue. The injections are expected to have little or no influence on the uptake of the naked DNA into the cells, where the DNA will be expressed, which would explain their low efficacy. Therefore, in order to increase gene expression up to levels essential for a therapeutic effect and to achieve reproducible conditions to reach this level of expression, several types of physical methods of gene or drug transfer have been developed and are described below.

Biolistics (the 'gene gun')

In the biolistics technique, heavy metal particles are coated with naked DNA plasmid and propelled into the cells. The technique was first used in 1987 on plant cells (Klein *et al.*, 1987) and later used on mammalian cells and then whole tissues (Yang *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1991).

Targeted tissues or cells are thus permeabilized by small beads of biocompatible heavy metal (gold or tungsten) with diameters from 1 to 5 µm and coated with the DNA plasmid of interest (Fyran *et al.*, 1993). The necessary acceleration of the particles is made by a gas discharge in a gun ('gene gun'). Water vaporization under high-voltage electric spark (Yang *et al.*, 1990) or helium discharge (Wolff *et al.*, 1991) can also give sufficient velocity to the particles to penetrate the cells. The area targeted *in vivo* using a classical gene gun (Helios, Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA) is about 2 cm². A single shot using this method requires 0.5–5 mg of gold beads coated by 1–10 µg of DNA. One advantage of this technique is that DNA is transported directly into the cytosol and is not damaged during its penetration into cells, for example, by transport via the endosomes (Condon *et al.*, 1996; Porgador *et al.*, 1998). The transfection efficiency of biolistics is due to the penetration of certain gold particles into the cell nucleus (Shestopalov *et al.*, 2002). Under these conditions, high-level gene expression can appear after only 3 h in cattle (Loehr *et al.*, 2000) and be present for up to 18 h in the cornea (Zagon *et al.*, 2005). Another advantage is the long-lasting expression of the transfected DNA: transgene expression was present even after 28–50 days following the ‘shooting’ of particles into muscle (Ajiki *et al.*, 2003). These effects were also seen in other tissues such as epithelial cells and neurons (Sudha *et al.*, 2001).

Many organs can be reached without damaging the surrounding tissues: muscle (Zelenin *et al.*, 1997; Lauritzen *et al.*, 2002), liver (Kuryama *et al.*, 2000; Watkins *et al.*, 2005), heart (Matsuno *et al.*, 2003) and brain (Zhang and Selzer, 2001; O’Brien and Lummis, 2004). However, the most important limitation of this method is the low efficiency of the metal particles in reaching the entire tissue due to the low penetration of the particles. Moreover, surgery is often necessary to use the technique in order to reach any non-superficial tissue. Although various kinds of injectors have been made (Dileo *et al.*, 2003), the major application of this technique remains gene delivery to skin cells (Wang *et al.*, 2004).

The approach has been used extensively for genetic vaccination (Larregina *et al.*, 2001) and for ‘suicide’ gene therapy to treat certain cancers (Yang and Sun, 1995). Skin vaccination with DNA by gene gun induces two types of response (Tuting *et al.*, 1998): generation of cytotoxic lymphocytes and generation of antibodies. Recent studies using skin reported the combination of this method together with different adjuvants to determine efficacy and to increase the transfection efficiency. One specific study combined an antigen-coding plasmid with the plasmid-encoding interleukin 3 (pIL-3) (Matthews *et al.*, 2007).

The second type of application is the treatment of various types of cancer by DNA vaccination. Hung *et al.* (2007) developed various strategies to enhance the potency of the vaccines and to increase vaccine-elicited T-cell immune responses in cervical cancer. Clinical trials of these vaccines showed a disease regression in three of nine patients post vaccination (Hung *et al.*, 2007). More recently, Luz Garcia-Hernandez *et al.* (2008) reported that the use of prostate stem cell antigen vaccination induced a long-term protective immune response against prostate cancer. Only one patient out of 12 displayed a complete regression, probably because of the advanced stage of the disease (the efficacy of anti-cancer vaccines is greater when administered in the early stages of disease).

Another potential application that was tested was the *ex vivo* gene transfer to liver allografts prior to transplantation (Nakamura *et al.*, 2003): this DNA vaccination provides an effective strategy for inducing protective immunity to infection and malignancy.

The main drawback of the gene gun approach is thought to be associated with the deposition of metal particles into the body and the potential long-term consequences. As an alter-

native to heavy metal particles, Lee *et al.* (2008a) used biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun. The chitosan and poly-gamma-glutamic acid beads showed the same efficiency of DNA transfection, as obtained with heavy metal particles (Lee *et al.*, 2008a).

This technology has also been used in plant tissue to establish chloroplast transformation in cabbage (Liu *et al.*, 2007) and to study protein targeting by genetic transformation in diatoms, unicellular eukaryotes playing an important role in ecology by fixing large amounts of CO₂ in the oceans (Kroth, 2007).

Jet injection

Jet injection is also a ballistic method based on a principle close to that of the gene gun. Jet injection is the local injection of a liquid by means of a device that uses high pressure to force microdroplets of liquid to penetrate the skin or mucous membrane. The jet injection method is used to inject the molecules (drugs, nucleic acids) diluted in liquid without the use of a needle or particles. This high-pressure stream of liquid is used to pierce the skin or targeted tissues. Pressure can reach up to 3–4 bar, and the velocity of the droplets range from 100 m·s⁻¹ to 200 m·s⁻¹. The advantage of using jet injection is to minimize patient discomfort.

There are two types of jet injections: high volume (more than 100 µL) and low volume (20–30 µL). The low-volume method limits the volume of the injected solution, but it cannot target a large tissue area (anything greater than 1 cm²). Both methods use the same concentrations of DNA: from 0.1 to 1 µg·µL⁻¹ of solution. Velocity of the fluid in jet injection contributes to the penetration into the skin, whereas the diameter of the jet and the injected volume limit the penetration depth of the solution (Arora *et al.*, 2007).

The physical phenomenon linked to jet-induced penetration in the skin has only recently been investigated (Schramm-Baxter *et al.*, 2004). A hole is created in the skin surface by the high pressure of the jet, most likely through the erosion or fracture of the skin. The depth of this hole is increased until the liquid that has accumulated in the hole created by the jet is sufficient to slow down the speed of the incoming jet, and the progression stops (Baxter and Mitragotri, 2005). The penetration of the injected molecules inside the cells is a consequence of the pressure caused by the liquid, locally delivered into the targeted tissue. The efficiency of this method and the depth of the penetration depend on several jet parameters including nozzle diameter (generally in the range of 150–300 µm), velocity of the liquid jet and the distance between the nozzle and the surface of the skin (Rajaratnam *et al.*, 1994). For example, the highest concentration of DNA in keratinocytes was found using a distance of about 10 cm between the skin surface and the jet injector (Sawamura *et al.*, 1999).

Since 1930, different types of jet injectors have been developed and used in clinical applications: immunization with vaccines (Canter *et al.*, 1990; Ren *et al.*, 2002), insulin delivery (Weller and Linder, 1966; Lindmayer *et al.*, 1986), growth hormone delivery (Verhagen *et al.*, 1995), local anaesthesia (Jimenez *et al.*, 2006) and even tattooing (Kang *et al.*, 2007). Jet injectors were and are still widely used in large vaccination

campaigns, especially by the US War Department during the deployment of the American army in countries at risk (Warren *et al.*, 1953; Foege and Eddins, 1973). The most important usage was probably in the WHO vaccination campaign against smallpox (Roberto *et al.*, 1969). The feasibility of 600 or more subcutaneous injections per hour makes this the fastest immunization system (Grabenstein *et al.*, 2006).

Jet injection can be also used in gene therapy for the transfer of genes to the skin or to tissues such as muscle, fat, skin and mammary cells of mice and sheep (Furth *et al.*, 1995). In mice, injections of naked DNA coding for the cytosine deaminase suicide gene using the jet injection method promoted tumour regression caused by injection of 5-fluorocytosine (Walther *et al.*, 2001; Walther *et al.*, 2005). Intradermal genetic vaccination induces a jet-injected DNA immune response (Johansson *et al.*, 2007). A preclinical evaluation of a CEA DNA prime/protein boost vaccination strategy against colorectal cancer has also been performed (Hallermalm *et al.*, 2007). Another attractive application is jet-mediated gene delivery for the treatment of skin diseases caused by genetic defects, such as the production of abnormal proteins in keratinocytes (Sawamura *et al.*, 1999). ShRNA encoding DNA, utilized to reverse the classical MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance phenotype *in vivo*, was also delivered by a jet injection method in mice (Stein *et al.*, 2008). Siegel *et al.* (2007) started a phase I trial of gene transfer into in-transit metastases from melanoma and skin metastases from breast cancer.

Other applications of jet injection have been considered. The combination of jet injection with conventional electroporation was tested in order to transfer DNA into murine muscles with the same or larger efficiency than with a needle injection before electro-transfer (Horiki *et al.*, 2004).

Hydrodynamic injection

Hydrodynamic injection was first performed on mice by Budker *et al.* (1996). Gene transfer, mainly in the liver, was achieved through the rapid intravenous injection in the tail vein of a high volume of solution (almost equivalent to the blood volume of the treated animal) in just a few seconds. This method leads to an efficient gene transfer in mice with, for example, an injected volume of 8–12% of their mass and an injection duration of 5–10 s (Liu *et al.*, 1999). The same result was shown in rats of 250 g with an injection volume of 25 mL containing 800 µg of DNA injected in 15 s in the tail vein (Maruyama *et al.*, 2002). The transgene mRNA is mainly found in the liver (Herweijer and Wolff, 2003) and in lungs, kidney, spleen and heart, but in a lower extent. Both Liu *et al.* (1999) and Zhang *et al.* (1999) developed the tail vein approach to deliver genes by this method, but direct injection into liver vessels (Zhang *et al.*, 1997) and muscle vessels (Budker *et al.*, 1998) have also been used.

It is agreed that the volume of the injected liquid is too high to be handled by the heart in the normal way, so the liquid accumulates in the inferior vena cava (Zhang *et al.*, 2004). Moreover, the low K⁺ content of the injection liquid also contributes to block the passage through the heart (Sawyer *et al.*, 2007). Organs linked to the inferior vena cava (especially the liver, which can be easily distended) (Wolff and Budker, 2005), capture the injected DNA due to the high

volume injected and the resulting pressure (Liu *et al.*, 1999; Niidome and Huang, 2002).

There also appeared to be permeabilization of the membranes of hepatocytes, capillary endothelium and surrounding parenchymal cells, due to the increase of the hydrodynamic pressure (Zhang *et al.*, 2004). The mechanism of hydrodynamic delivery in the liver is called hydroporation but the explanation of this hydrodynamic permeabilization is still hypothetical. The DNA uptake by the hepatocytes could also be mediated by DNA receptors (Budker *et al.*, 2000) or by macropinocytosis (Sebestyen *et al.*, 2006).

For many years, the hydrodynamic injection method was mostly limited to the hepatic transfer of genes in small animal research. The limitation of the procedure was essentially due to the high volume of DNA solution required for injection and the frequent lethality of rapid injection. Sawyer *et al.* (2007) reported temporary cardiac dysfunction in rats following hydrodynamic injection. Moreover, Liu and Huang (2001) showed that transfection could be improved by an interruption of hepatic blood flow for 3 min. Studies were performed on larger mammals, such as dogs and monkeys (Zhang *et al.*, 2001; Wells, 2004), and more recently on pigs by isolating the inferior vena cava (Fabre *et al.*, 2008). This last experiment was reproduced on a rat liver with a low-volume injection, but severe cardiovascular disturbances were induced (Sawyer *et al.*, 2008). Until now, the delivery of DNA was tested with inserts less than 100 kb, but Hibbit *et al.* (2007) demonstrated the possibility of delivering a 135 kb human genomic DNA fragment containing the gene coding for the low-density lipoprotein receptor.

A computer-controlled injection device was recently developed to achieve an efficient, safe and automatically controlled hydrodynamic injection (Suda *et al.*, 2008). This programmable device measures the pressure in the injected vessel, adjusting the speed of the injection to maintain a target pressure for a precise time, thus allowing efficient delivery of both viral and non-viral vectors to various organs with a minimal injection volume. This study should result in the advancement of a safe and programmable injection device for clinical use.

Ultrasound-mediated gene transfer

Sonoporation consists of the application of ultrasound to permeabilize cell membranes in order to improve internalization of large molecules. Although ultrasound has long been used for diagnostic purposes, its application as an experimental delivery system for molecules such as DNA is relatively new for studies *in vitro* (Kim *et al.*, 1996; Bao *et al.*, 1997; Tata *et al.*, 1997). This technique has been used to produce growth factor (Schratzberger *et al.*, 2002) or to transfect neuronal cells (Fischer *et al.*, 2006). Ultrasonic waves were recently used in *in vivo* studies for the delivery of naked DNA into muscle (Taniyama *et al.*, 2002a; Lu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005), carotid artery (Miller and Song, 2003), solid tumours (Huber *et al.*, 2003), liver (Miao *et al.*, 2005), kidney (Koike *et al.*, 2005), heart (Taniyama *et al.*, 2002b; Bekeredian *et al.*, 2003), and for transdermal delivery (Smith, 2007). Inhibition of prostate tumour growth was also demonstrated (Duvshani-Eschet *et al.*, 2007) after the *in situ* transfer of genes encoding

for hemopexin-like domain fragment by ultrasound (using ultrasound at 1 MHz and $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ for 30 min with 10% of the volume of Optison). They have also been applied to gene transfer in plant cells (Liu *et al.*, 2005).

Therapeutic ultrasound operates at frequencies from 1 to 3 MHz (or lower) and intensities of 0.5 to $3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Other diagnostic techniques operate at higher frequencies (from 3.5 to 40 MHz) and lower intensities. Therapeutic trials consist of DNA plasmid injection followed by tissue irradiation by ultrasound for periods between 3 ms and 20–30 min. Ultrasound is easily approved for clinical use (delivery of chemotherapeutic, thrombolytic and gene-based drugs) because of the low energy delivered and because it is non-invasive (Ng and Liu, 2002). Ultrasound has other advantages: it has good penetration through soft tissue, does not damage cells or tissues (at appropriate intensities), and does not affect DNA integrity. One limitation of this technique is that it can cause the breakdown of the cytoskeleton, thus altering, among other mechanisms, the DNA trafficking inside the cells (Skorpikova *et al.*, 2001).

Potential therapeutic application of ultrasound, as mentioned above, can be used in gene therapy. Ultrasound seems to facilitate the penetration of the DNA into several tissues (Newman *et al.*, 2001) by increasing the porosity of membranes (Deng *et al.*, 2004). Sonoporation mechanisms are not well characterized (Ferrara, 2008). Acoustic cavitation seems to be the most probable explanation of the phenomenon, coupled with acoustic pressure (Schlicher *et al.*, 2006). The efficiency of this method can be improved by the use of an ultrasound contrast agent, which consists of compressible gas-filled microbubbles such as perfluorocarbon-filled microspheres of heat-denatured human albumin in the case of the commonly used Optison™ (Taniyama *et al.*, 2002a; 2002b; Duvshani-Eschet and Machluf, 2007). The collapse of these microbubbles results in a gas jet that could explain the penetration of gene or drugs in cells (Prentice *et al.*, 2005). Ultrasound also improved the transfer of DNA entrapped in nanoparticles, micelles (Husseini and Pitt, 2008) and liposomes (Huang, 2008).

High-intensity-focused ultrasound is also known to provoke the thermal ablation of tumours (Uchida *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). Another anti-tumour approach without thermal effects is the combination with bleomycin, which results in an effective tumour therapy (Larkin *et al.*, 2008). Ultrasound can stimulate the anti-cancer effect of bleomycin in tumour-bearing tissues because of the ultrasound-induced permeabilization of the cell membrane. Ultrasound application is a mechanical way to permeabilize cells, to be compared with electroporation, an electrical way to cause cell permeabilization (see next paragraph). Yamashita *et al.* (2002) tried to combine sonoporation with the application of an electric field. This new method, called electro-sonoporation, consists of an intramuscular injection of naked DNA followed by a 5 min application of ultrasound combined with electric pulses. Greater efficiency was achieved when electrical pulses were applied in the middle of the ultrasound wave delivery.

Magnetic field mediated gene transfer

Magnetofection or magnetic gene transfer is based on the application of a magnetic field in order to set in motion

super-paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) (50 nm in diameter) that are coupled to DNA plasmids (Barnes *et al.*, 2007).

This method is based on the use of cationic polymers that can combine the SPION and DNA, or RNA, via electrostatic interactions. They form stable complexes and DNA is protected from degradation (Hildebrandt *et al.*, 2003). However, SPION can be used with viral vectors like paramyxoviruses (Kadota *et al.*, 2005). In the presence of static magnets, the coupled magnetic polyplex nanoparticles display a transfection efficiency of reporter genes comparable with conventional non-viral transfection systems. The uptake of DNA/SPION complexes into the cells is by non-specific endocytosis (Huth *et al.*, 2004). The magnetic field allows the concentration of the magnetic complexes within the target tissue. Moreover, it seems to cause the extravasation of the magnetic particles through the vascular wall into the target tissue (Goodwin *et al.*, 2001). Although the influence of these magnetic particles on cellular functions is not well known, rapid kinetics of efficient transfection has been reported (Plank *et al.*, 2003).

Other studies with pulsed magnetic fields reported an enhancement of the efficiency of *in vitro* non-viral gene delivery (Kamau *et al.*, 2006). Magnetofection was used to transfect *in vitro* primary cells such as endothelial cells (Krotz *et al.*, 2003), embryonic stem cells (Lee *et al.*, 2008b) and neurons (Buerli *et al.*, 2007). This technique is still in development for *in vivo* use, but early results have showed an enhancement of non-viral-mediated gene transfer into airway epithelium (Xenariou *et al.*, 2006). *Ex vivo* trials, a compromise between *in vitro* and *in vivo* experiments, showed good results in gene transfer into osteoblast cells (Yang *et al.*, 2008).

While static magnetic fields can be used for magnetofection, alternating magnetic fields can be used to heat tissue due to the movement of ferromagnetic nanoparticles, empty or filled with drugs or nucleic acids. The principle of this method is the direct injection of a magnetic fluid into a tumour, and then heating in an alternating magnetic field thereby causing a tumouricidal effect. Anti-tumour studies using this method have been reported for breast cancer (Kikumori *et al.*, 2008), on prostate (Kawai *et al.*, 2008), and on brain tumours (Jordan and Maier-Hauff, 2007). In addition, specific nano-entities have been developed for both the optical detection and the hyperthermic treatment (Jin *et al.*, 2008). This technique cannot yet be considered as a method of gene transfer as it has only been used for drug transfer. Some experiments have been performed in tumour-bearing rabbits to transfer drugs into the tumour cells (Alexiou *et al.*, 2000). The technique has also had limited use in clinical trials on patients with advanced sarcomas, using injected epirubicin and applying a 0.8 Tesla permanent magnetic field for a 30–120 min duration (Lubbe *et al.*, 1996).

Electric pulse mediated gene transfer

Electroporation or electroporeabilization consists of the exposure of living cells to short and intense electric pulses. The first use of this method was published by Neumann *et al.* (1982) who demonstrated that DNA could be introduced into viable mouse lymphoma cells by means of electric pulses. Two years later, the efficiency of this method was proved by

transferring genes using standard laboratory equipment (generators for proteins and DNA electrophoresis) into mouse pre-B lymphocytes (Potter *et al.*, 1984). These systems delivered exponentially decaying electric pulses. A square wave pulse generator was developed in 1985 by J. Teissié with outputs compatible for the treatment of cells (in suspension or attached) with rectangular pulses for which pulse duration and pulse amplitude are independently adjusted (Zerbib *et al.*, 1985). Many trials started rapidly: not only on animal cells but also on plant cells, to transfer genes (Fromm *et al.*, 1985) or to inhibit gene expression with antisense RNA (Ecker and Davis, 1986), and on bacterial transformation (Fiedler and Wirth, 1988; Taketo, 1988). Electroporation has been the most popular way to transfect bacterial cells since 1988.

The exposure of living cells to electric pulses induces a position-dependent modification of the transmembrane potential difference, which is numerically described by the equation of Schwan (1957). This induced transmembrane potential difference depends on physical parameters (pulse duration, field intensity and electrode geometry) and biological factors (cell size, shape and density). It is superimposed on the resting transmembrane potential difference. Electroporation is generated when the net value of the transient transmembrane potential difference exceeds a threshold value between 0.2 and 0.4 V across the membrane (Teissié and Rols, 1993). Transient permeation structures are generated at the cell membrane level due to electrocompressive forces induced by the potential difference and the field effects on the water and membrane dipoles (Teissié *et al.*, 2005). This 'de-structuring' of the membrane takes place in a few tens of microseconds (the duration of the pulses usually applied to permeabilize cells or tissues is 100 μ s), but the membrane remains permeable for several minutes. Electroporation mechanisms are still under investigation (Teissié *et al.*, 2005). Several models have been proposed (Neumann *et al.*, 1982; Tsong, 1991), the more recent based on electric (Kotnik and Miklavcic, 2000) and molecular dynamics (Tieleman, 2006) simulation.

Under appropriate electrical parameters, the destabilization of membrane structure is completely reversible, ensuring the survival of the transiently permeabilized cells. Another property of this method comes from the fact that pulses are too short to provoke thermal effects, contributing to the reversibility of this phenomenon (Tsong and Su, 1999). When very high intensity fields are delivered to the cells, the changes in membrane structure can become permanent, resulting in the loss of the cell viability due to the generation of large, long-lived 'holes' in the membrane. This electroporation is termed irreversible and may be produced in the absence of thermal effects (Davalos *et al.*, 2005). Recent molecular dynamics simulations have suggested that pores could indeed be generated, but these simulations are performed with numerical values of the transmembrane potential difference much larger than those necessary to obtain physiological reversible cell permeabilization (Tieleman *et al.*, 2003).

One of the most frequent applications of cell electroporation *in vitro* and *in vivo* is the electric pulse mediated transfer of nucleic acids, also termed DNA or gene electro-transfer or electro-gene therapy. It has been applied in a large number of tissues like the skeletal muscle (Aihara and

Miyazaki, 1998; Mir *et al.*, 1998; 1999), human prostate cancer xenograft, skin (Mikata *et al.*, 2002), tumours (Rols *et al.*, 1998), cornea (Blair-Parks *et al.*, 2004), brain (Kondoh *et al.*, 2000) and liver (Suzuki *et al.*, 1998). It has also been used to transfect fungal (Robinson and Sharon, 1999) and plant tissues (Dekeyser *et al.*, 1990). The tissues, genes and type of experimental or therapeutic applications have been reviewed elsewhere (André and Mir, 2004; Mir *et al.*, 2005). Long-term expression of the luciferase reporter gene can be detected for at least 9 months after DNA electro-transfer into muscle (Mir *et al.*, 1998). Recent studies have shown the efficiency of this technique when transferring nucleic acids other than DNA plasmids, such as mRNA, to chronic lymphocytic leukemia cells (Van Bockstaele *et al.*, 2008) or siRNA to tumours *in vivo* (Golzio *et al.*, 2007).

While permeabilization is sufficient to ensure a good transfer of drugs, especially *in vivo* (see below), efficient and safe gene electro-transfer requires both target cell permeabilization and DNA electrophoretic transport towards the permeabilized membranes. It is thus necessary to deliver either trains of long (several milliseconds) identical pulses or combinations of permeabilizing high voltage (HV) short electric pulses and of electrophoretic low voltage (LV) long electric pulses (Satkauskas *et al.*, 2002; Satkauskas *et al.*, 2005). For example, in skeletal muscle, one HV pulse of 800 V·cm⁻¹ and duration of 100 μ s and 4 LV pulses of 80 V·cm⁻¹ and duration of 100 ms result in very high level of expression (André *et al.*, 2008).

The therapeutic use of the delivery of electric pulses in patients is, at present, confined to the transfer of anti-cancer drugs to tumour cells *in vivo*. Electrochemotherapy (ECT) combines the administration of an anti-tumour agent, like bleomycin or cisplatin, to the delivery of electric pulses to the tumours. Since the first clinical trial (Mir *et al.*, 1991), clinical devices have been developed and clinical trials (Marty *et al.*, 2006) allowed for the development of standard operating procedures of ECT for cutaneous and subcutaneous tumours (Mir *et al.*, 2006). ECT is now routinely used for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumours in humans (Sersa *et al.*, 2008) and, more recently, in pet animals (Cemazar *et al.*, 2008). But these results have paved the way for the clinical use of gene electro-transfer in humans. DNA electro-transfer is reaching the clinical stage as several clinical trials to transfer genes in tumours and in muscle are ongoing (Heller and Heller, 2006).

Discussion

We report six different physical methods of gene (and drug) transfer in cells or tissues. All methods have their advantages and limitations, and the choice of one over the others essentially depends on the proposed therapeutic application. All of them permit the delivery of therapeutic materials into cells by combining two effects: (i) the reversible alteration of the plasma membrane, which allows the passage of the molecules of interest directly into the cell cytosol; and (ii) the movement of the nucleic acids to the permeabilized plasma membrane or to the inside of the cell. These two effects can be achieved in one or two steps, depending upon the method and its physical basis.

The one step methods are the biolistic method, the jet injection and the hydrodynamic injection. In these methods, the DNA carriers (beads or liquids) not only carry the nucleic acids, but they are also responsible for the penetration of the DNA to inside the cell. Therefore, the DNA carriers bring the DNA close to the cell and are involved in the crossing of the plasma membrane. In all cases, energy is transferred to the DNA carriers. In the biolistics method (the 'gene gun'), a kinetic energy is given to the small beads: they can cross the cell membrane and bring the DNA coated on their surface to the cell interior. In the jet injection method, the high-pressure fluid jet brings the DNA to and across the membrane. In the hydrodynamic injection, the high-injected volume causes an increase of the hydrodynamic pressure, especially in liver, thus inducing the permeabilization of the membrane and allowing the entrance of the DNA into the cells. All these methods do not need previous injection of DNA or other molecules close to the tissue to be treated, because the DNA is present in the solution or on the particles directly injected.

The multistep methods are the ultrasound, the magnetic field and the electric pulse mediated gene transfer approaches. The first step is the injection of the nucleic acids either intravenously or locally (almost mandatory for the electro-transfer, even though electro-transfer in liver at low levels of expression has been obtained by intravenous injections of DNA). The intravenous route of administration is suitable in the case of the magnetofection. The magnetic particles can be concentrated in particular areas of the body by magnets before a second event allows for their uptake by the cells. In all cases, the liquid in which the DNA is dissolved is not responsible for the permeabilization of the cell membranes or of the crossing of the membrane. In the case of the electro-transfer, these two functions are achieved by the electric pulses as described above; while in the case of the magnetofection or the sonoporation, they are achieved by these approaches alone or after combination with a second physical method. In this respect, these two methods can be combined with adjuvants: the sonoporation with echocontrast agents and the magnetofection with transfection reagents. It was shown that transgene expression can be increased 100-fold depending on the type of echocontrast agents that are coupled to optimize ultrasound physical parameters (e.g. delivered energy, frequency). (Zarnitsyn and Prausnitz, 2004). Under these favourable conditions, sonoporation permitted gene expression in 75% of the HL60 cells transfected *in vitro* (Gac *et al.*, 2007) and transgene expression was evident in all treated animals *in vivo* (Li *et al.*, 2003).

More precisely, in the case of the multistep methods, we must distinguish permeabilization of the cell membrane (achieved by electroporating electric pulses or cavitationultrasounds) and transfer of the DNA close or across the permeabilized membrane. This second step can be achieved by the magnetic forces dragging the iron oxide nanoparticles, by the electrophoretic component of the electric pulses, or by the mechanical energy carried by the ultrasonic forces combined with microbubbles from echocontrast agents which can collapse and produce the necessary pressure for molecules to penetrate into the cells.

Another step is required for efficient transfection: transport of the DNA from the plasma membrane to and across the

nuclear membrane. Some of the physical methods presented here do little to address this step, but other strategies might be coupled with these physical approaches to address this transport, such as the inclusion of nuclear localization sequences in the sequence of the DNA molecules, or the formation of complexes with peptides presenting the nuclear import sequence, or the treatment of the cells by nuclear pore-enlarging molecules, such as trans-cyclohexane-1,2-diol. However, these strategies are beyond the scope of this review.

Concerning the transfection rates and the efficiency of the transfected gene expression, there is a general consensus that viral methods are, very often, more efficient than the non-viral methods listed here. However, the levels reached by hydrodynamic injections or by electro-transfer are important and in many cases are most likely sufficient to induce a therapeutic effect. The particular interest of the biophysical methods for gene transfer is that unmodified, naked DNA can be used. This provides a real simplification of the vector preparation, which can be considered as a chemical product for which the quality control and quality assurance procedures are well known. The production of DNA under GMP conditions is achievable, and safe products can be obtained. Conveniently applied, these methods are also safe by themselves. For example, electric pulses can be safely delivered as models of the electric field distribution in tissue have been produced and validated. Significant experience has been acquired in large animals and in humans by the application of electroporating pulses to treat solid tumours by ECT.

It is important to recall that the methods described have preferential targets and limitations, mainly due to the physical mechanisms on which these treatments are based. First of all, while the skin is a convenient target for the gene gun and jet injection, skin is not suitable for hydrodynamic injection. The low-depth penetration of particles in tissues by gene gun mediated delivery does not exceed 4 mm into the skin (Zelenin *et al.*, 1997), though it is sufficient for skin DNA vaccination (Luz Garcia-Hernandez *et al.*, 2008) or for the transfection of thin tissues, such as plant leaves (Remacle *et al.*, 2006). If large volumes of tissue are considered, then the gene gun and the jet injection are not adequate as they only allow for the treatment of small areas or volumes. On the contrary, the methods that require the preliminary injection of the DNA in the tissue, such as electro-transfer, can be limited by the feasibility of this injection. It must be noted that intravenous DNA injection has been used for electro-transfer into liver cells (André *et al.*, 2008). The ability to place the electrodes around the treated tissue may also limit the application of gene electro-transfer. This limitation may be overcome by using sonofection and magnetofection, as they do not require a direct physical contact between the devices and the tissues. Nevertheless, to apply these methods (particularly gene electro-transfer and magnetofection) on internal organs it is necessary to bring the devices delivering the physical energy close the target tissue. In this respect, the type of device used for the treatment can also modulate the effect on the gene expression. In the case of the gene gun approach, helium powered or gunpowder, hand-held or stand-alone systems do not give the same results. In electro-transfer, the choice between plate electrodes and needle electrodes with different geometries can be important depending on the

Table 1 Summary of the physical methods presented here

	<i>Methods</i>	<i>Target tissue(s)</i>	<i>Mechanism(s)</i>	<i>Naked DNA alone^a</i>
Single step methods	Biolistics (gene gun)	Skin (mainly used for DNA vaccination), muscle, liver, heart, brain, cornea	Heavy metal particles coated with naked DNA plasmid and propelled into the cells. Necessary acceleration is made by gas discharge in a gun.	Yes
	Jet injection (needleless injection)	Skin, muscle, mammary cells; method also used for vaccination, insulin delivery, local anaesthesia	Local injection of a liquid by means of a device that uses high pressure to force the microdroplets of the liquid to penetrate the skin or mucous membrane. Uptake of DNA into cells is a consequence of the pressure due to the high volume locally delivered into the targeted tissue.	Yes
	Hydrodynamic injection	Liver, muscle, lungs, kidney, spleen, heart	In rodents, rapid intravenous injection in the tail vein of a high volume of solution in just a few seconds. Organs linked to the inferior vena cava capture the injected DNA due to the high volume injected and the resulting pressure. In large animals, target organs are clamped.	Yes
Multistep methods	Ultrasound-mediated gene transfer	Muscle, carotid artery, liver, solid tumours, kidney, heart, skin	Application of ultrasound (frequencies from 1 to 3 MHz and intensities of 0.5 to 3 W·cm ⁻²) increasing the permeability of the membrane due to the acoustic pressure. Efficiency is improved by the adjuvant use of ultrasound contrast agents containing microbubbles which can easily collapse and produce local high pressure.	Yes/No
	Magnetic field-mediated gene transfer	Airway epithelium, synovium, tumours	Super-paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) coupled to DNA in a cationic polymer to bring the DNA close to the targeted tissue by a magnetic field. Uptake of DNA/SPION complexes into the cells is by non-specific endocytosis.	No
	Electric pulse mediated gene transfer	Muscle, skin, tumours, cornea, brain, liver, embryos, lung, tendons, spleen, cartilage, testis, ovaries, bladder, adipocytes . . .	Exposure of living cells or targeted tissues to short and intense electric pulses inducing a position-dependent modification of the transmembrane potential difference. Transient permeation structures are generated at the cell membrane level due to electrocompressive forces induced by the potential difference and the field effects on water and membrane dipoles.	Yes

^aNot considering the carrier physiological fluid in which DNA is dissolved.

shape, size and location of the treated tissue. Finally, the high volume injected in the hydrodynamic method limits the use to small animals or to organs that can be easily isolated from the rest of the body by means of clamps on the afferent arteries and efferent veins.

Some of these methods are also relatively new in their application to gene transfer and all the potential side effects are not yet known. For example, the long-term presence of gold beads in tissues after gene gun bombardment has not yet been studied, and their toxicity is not well known. The same is true for the magnetic nanoparticles used in magnetofection, although so far they have not proved to be toxic for the treated tissues (Plank *et al.*, 2003). These methods must still be considered as investigational tools: even though a few clinical trials have already been performed (or are in progress for some of them), none has already become a routine technique.

In summary (see Table 1), all the physical methods we presented here have the common potential to deliver gene into cells and tissues by bringing the DNA across the plasma membrane into the cell cytosol. The high and rapid level of the foreign gene expression is likely to be due to the direct transfer of the DNA into the cytoplasm and into the nucleus, ensuring its integrity against enzymes. Although all these techniques have both positive and negative features in their efficiency, they can all find their use as physical methods to deliver specific genes into tissues.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNRS, Institut Gustave Roussy, Institut National du Cancer (INCa) and

CLINIGENE (FP6 – LSH-2004-018933). The authors acknowledge An Vu for her detailed revision of the manuscript.

Conflicts of interest

J.V. has no conflict of interest, while L.M.M. has been granted several patents covering some aspects of the electric pulses mediated drug and gene transfer.

References

- Acsadi G, Jiao SS, Jani A, Duke D, Williams P, Chong W *et al.* (1991). Direct gene transfer and expression into rat heart *in vivo*. *New Biol* **3**: 71–81.
- Aihara H, Miyazaki J (1998). Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* **16**: 867–870.
- Ajiki T, Murakami T, Kobayashi Y, Hakamata Y, Wang J, Inoue S *et al.* (2003). Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacaine: combinatorial gene therapy with IL-12 and IL-18 cDNA against rat sarcoma at a distant site. *Cancer Gene Ther* **10**: 318–329.
- Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C *et al.* (2000). Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res* **60**: 6641–6648.
- André F, Mir LM (2004). DNA electrotransfer: its principle and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* **11** (Suppl. 1): S33–43.
- André FM, Cournil-Henrionnet C, Vernery D, Opolon P, Mir LM (2006). Variability of naked DNA expression after direct local injection: the influence of the injection speed. *Gene Ther* **13**: 1619–1627.
- André FM, Gehl J, Sersa G, Prétat V, Hojman P, Eriksen J *et al.* (2008). Efficiency of high and low voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumour and skin. *Hum Gene Ther* **19**: 1261–1271.
- Arora A, Hakim I, Baxter J, Rahtnasingham R, Srinivasan R, Fletcher DA *et al.* (2007). Needle-free delivery of macromolecules across the skin by nanoliter-volume pulsed microjets. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 4255–4260.
- Bao S, Thrall BD, Miller DL (1997). Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* **23**: 953–959.
- Barnes AL, Wassel RA, Mondalek F, Chen K, Dormer KJ, Kopke RD (2007). Magnetic characterization of superparamagnetic nanoparticles pulled through model membranes. *Biomagn Res Technol* **5**: 1.
- Baxter J, Mitragotri S (2005). Jet-induced skin puncture and its impact on needle-free jet injections: experimental studies and a predictive model. *J Control Release* **106**: 361–373.
- Bekeredjian R, Chen S, Frenkel PA, Grayburn PA, Shohet RV (2003). Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation* **108**: 1022–1026.
- Blair-Parks K, Weston BC, Dean DA (2004). High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *J Gene Med* **4**: 92–100.
- Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA (1996). Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther* **3**: 593–598.
- Budker V, Zhang G, Danko I, Williams P, Wolff J (1998). The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther* **5**: 272–276.
- Budker VG, Budker T, Zhang G, Subbotin VM, Loomis A, Wolff JA (2000). Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells *in vivo* by a receptor-mediated process. *J Gene Med* **2**: 874–888.
- Buerli T, Pellegrino C, Baer K, Lardi-Studler B, Chudotvorova I, Fritschy JM *et al.* (2007). Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection. *Nat Protoc* **2**: 3090–3101.
- Canter J, Mackey K, Good LS, Roberto RR, Chin J, Bond WW *et al.* (1990). An outbreak of hepatitis-B associated with jet injections in weight-reduction clinic. *Arch Intern Med* **150**: 1923–1927.
- Cemazar M, Tamzali Y, Sersa G, Tozon N, Mir LM, Miklavcic D *et al.* (2008). Electrochemotherapy in veterinary oncology. *J Vet Intern Med* **22**: 826–831.
- Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD (1996). DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nat Med* **2**: 1122–1128.
- Davalos RV, Mir IL, Rubinsky B (2005). Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann Biomed Eng* **33**: 223–231.
- Dekeyser RA, Claes B, De Rycke R, Habets ME, Van Montage MC, Caplan HB (1990). Transient gene expression in the intact and organized rice tissues. *Plant Cell* **2**: 591–602.
- Deng CX, Sieling F, Pan H, Cui J (2004). Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol* **30**: 519–530.
- Dileo J, Miller TE Jr, Chesnoy S, Huang L (2003). Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design. *Hum Gene Ther* **14**: 79–87.
- Duvshani-Eschet M, Machluf M (2007). Efficient transfection of tumours facilitated by long term therapeutic ultrasound in combination with contrast agent: from *in vitro* to *in vivo* setting. *Cancer Gene Ther* **14**: 306–315.
- Duvshani-Eschet M, Benny O, Morgenstern A, Machluf M (2007). Therapeutic ultrasound facilitates anti-angiogenic gene delivery and inhibits prostate tumour growth. *Mol Cancer Ther* **6**: 2371–2382.
- Ecker JR, Davis RW (1986). Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5372–5376.
- Fabre JW, Grehan A, Whitehorne M, Sawyer GJ, Dong X, Salehi S *et al.* (2008). Hydrodynamic gene delivery in the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava. *Gene Ther* **15**: 452–462.
- Ferrara W (2008). Driving delivery vehicles with ultrasound. *Adv Drug Deliv Rev* **60**: 1097–1102.
- Fiedler S, Wirth R (1988). Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem* **170**: 38–44.
- Fischer AJ, Stanke JJ, Omar G, Askwith CC, Burry RW (2006). Ultrasound-mediated gene transfer into neuronal cells. *J Biotechnol* **20**: 393–411.
- Foegle WH, Eddins DL (1973). Mass vaccination programs in developing countries. *Prog Med Virol* **15**: 205–243.
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5824–5828.
- Furth PA, Shamay A, Hennighausen L (1995). Gene transfer into mammalian cells by jet injection. *Hybridoma* **14**: 149–152.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL (1993). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral mucosal and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11478–11482.
- Gac SL, Zwaan E, van den Berg A, Ohl CD (2007). Sonoporation of suspension cells with a single cavitation bubble in a microfluidic confinement. *Lab Chip* **7**: 1666–1672.
- Golzio M, Mazzolini L, Ledoux A, Paganin A, Iazard M, Hellaudais L *et al.* (2007). *In vivo* gene silencing in solid tumors by targeted electrically mediated siRNA delivery. *Gene Ther* **14**: 752–759.
- Goodwin SC, Bittner CA, Peterson CL, Wong G (2001). Single-dose toxicity study of hepatic intra-arterial infusion of doxorubicin coupled to a novel magnetically targeted drug carrier. *Toxicol Sci* **60**: 177–183.
- Grabenstein JD, Pittman PR, Greenwood JT, Engler RJM (2006). Immunization to protect the US Armed Forces: heritage, current practice, and prospects. *Epidemiol Rev* **28**: 3–26.

- Hallermalm K, Johansson S, Brave A, Ek M, Engstrom G, Boberg A *et al.* (2007). Pre-clinical evaluation of a CEA DNA prime/protein boost vaccination strategy against colorectal cancer. *Scand J Immunol* **66**: 43–51.
- Heller LC, Heller R (2006). *In vivo* electroporation for gene therapy. *Hum Gene Ther* **17**: 890–897.
- Hengge UR, Walker PS, Vogel JC (1996). Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest* **97**: 2911–2916.
- Herweijer H, Wolff JA (2003). Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* **10**: 453–458.
- Hibbit OC, Harbottle RP, Waddington SN, Bursill CA, Coutelle C, Channon KM *et al.* (2007). Delivery and long-term expression of a 135 kb LDLR genomic DNA locus *in vivo* by hydrodynamic tail vein injection. *J Gene Med* **9**: 488–497.
- Hildebrandt IJ, Iyer M, Wagner E, Gambhir SS (2003). Optical imaging of transferring targeted PEI/DNA complexes in living subjects. *Gene Ther* **10**: 758–764.
- Horiki M, Yamato E, Ikegami H, Ogihara T, Miyazaki J (2004). Needleless *in vivo* gene transfer into muscles by jet injection in combination with electroporation. *J Gene Med* **6**: 1134–1138.
- Huang SL (2008). Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **60**: 1167–1176.
- Huber PE, Mann MJ, Melo LG, Ehsan A, Kong D, Zhang L *et al.* (2003). Focused ultrasound (HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery. *Gene Ther* **10**: 1600–1607.
- Hung CF, Monie A, Alvarez RD, Wu TC (2007). DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Exp Mol Med* **39**: 679–689.
- Husseini GA, Pitt WG (2008). Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **60**: 1137–1152.
- Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welshb U *et al.* (2004). Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* **6**: 923–936.
- Jimenez N, Bradford H, Seidel KD, Sousa M, Lynn AM (2006). A comparison of a needle-free injection system for local anesthesia versus EMLA for intravenous catheter insertion in the paediatric patient. *Anesth Analg* **102**: 411–414.
- Jin H, Hong B, Kakar SS, Kang KA (2008). Tumour-specific nano-entities for optical detection and hyperthermic treatment of breast cancer. *Adv Exp Med Biol* **614**: 275–284.
- Johansson S, Ek M, Wahren B, Stout R, Liu M, Hallermalm K (2007). Intracellular targeting of CEA results in Th1-type antibody responses following intradermal genetic vaccination by a needle-free jet injection device. *ScientificWorldJournal* **7**: 987–999.
- Jordan A, Maier-Hauff K (2007). Magnetic nanoparticles for intracranial thermotherapy. *J Nanosci Nanotechnol* **7**: 4604–4606.
- Kadota S, Kanayama T, Miyajima N, Takeuchi K, Nagata K (2005). Enhancing of measles virus infection by magnetofection. *J Virol Methods* **128**: 61–66.
- Kamau SW, Hassa PO, Steitz B, Petri-Fink A, Hofmann H, Hofmann-Antenbrink M *et al.* (2006). Enhancement of the efficiency of non-viral gene delivery by application of pulsed magnetic field. *Nucleic Acids Res* **34**: e40.
- Kang MJ, Kim MY, Kim YJ, Park YM, Kim HO (2007). Traumatic tattoo associated with jet injector (Dermojet) use. *J Dermatol* **34**: 732–733.
- Kawai N, Futakuchi M, Yoshida T, Ito A, Sato S, Naiki T *et al.* (2008). Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumour in bone. *Prostate* **68**: 784–792.
- Kikumori T, Kobayashi T, Sawaki M, Imai T (2008). Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast Cancer Res Treat* Mar 2 [Epub ahead of print] PMID: 18311580.
- Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander E (1996). Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther* **7**: 1339–1346.
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**: 70–73.
- Koike H, Tomita N, Azuma H, Taniyama Y, Yamasaki K, Kunugiza Y *et al.* (2005). An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney. *J Gene Med* **7**: 108–116.
- Kondoh T, Motooka Y, Bhattacharjee AK, Kokunai T, Saito N, Tamaki N (2000). *In vivo* gene transfer into the periventricular region by electroporation. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **40**: 618–622.
- Kotnik T, Miklavcic D (2000). Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields. *IEEE Trans Biomed Eng* **47**: 1074–1081.
- Kroth PG (2007). Genetic transformation: a tool to study protein targeting in diatoms. *Methods Mol Biol* **390**: 257–268.
- Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Plank C, Pohl U (2003). Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J Vasc Res* **40**: 425–434.
- Kuryama S, Mitoro A, Tsujinoue H, Nakatani T, Yoshiji H, Tsujimoto T *et al.* (2000). Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther* **7**: 1132–1136.
- Larkin JO, Casey GD, Tangney M, Cashman J, Collins CG, Soden DM *et al.* (2008). Effective tumour treatment using optimized ultrasound-mediated delivery of bleomycin. *Ultrasound Med Biol* **34**: 406–413.
- Laregina AT, Watkins SC, Erdos G, Spencer LA, Storkus WJ, Beer SD *et al.* (2001). Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells. *Gene Ther* **8**: 608–617.
- Lauritzen HP, Reynet C, Schjerling P, Ralston E, Thomas S, Galbo H *et al.* (2002). Gene gun bombardment-mediated expression and translocation of EGFP-tagged GLUT4 in skeletal muscle fibres *in vivo*. *Pflugers Arch* **444**: 710–721.
- Lee PW, Peng SF, Su CJ, Mi FL, Chen HL, Wei MC *et al.* (2008a). The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery. *Biomaterials* **29**: 742–751.
- Lee CH, Kim EY, Jeon K, Tae JC, Lee KS, Kim YO *et al.* (2008b). Simple, efficient, and reproducible gene transfection of mouse embryonic stem cells by magnetofection. *Stem Cells Dev* **17**: 133–142.
- Li K, Welikson RE, Vikstrom KL, Leinwand LA (1997). Direct gene transfer into mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* **29**: 1499–1504.
- Li T, Tachibana K, Kuroki M, Kuroki M (2003). Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice – initial results. *Radiology* **229**: 423–428.
- Lindmayer I, Menassa K, Lambert J, Moghrabi A, Legendre L, Legault C *et al.* (1986). Development of new jet injector for insulin therapy. *Diabetes Care* **9**: 294–297.
- Liu CW, Lin CC, Chen JJ, Tseng MJ (2007). Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep* **26**: 1733–1744.
- Liu F, Huang L (2001). Improving plasmid DNA-mediated liver gene transfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature. *J Gene Med* **3**: 569–576.
- Liu F, Song Y, Liu D (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* **6**: 1258–1266.
- Liu Y, Yang H, Sakanishi A (2005). Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnol Adv* **24**: 1–16.
- Loehr BI, Willson P, Babiuk LA, van Drunen Little-van den Hurk S (2000). Gene gun-mediated DNA immunization primes development of mucosal immunity against bovine herpes virus 1 in cattle. *J Virol* **74**: 6077–6086.
- Lu QL, Liang HD, Partridge T, Blomley MJ (2003). Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle *in vivo* with reduced tissue damage. *Gene Ther* **10**: 396–405.
- Lubbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K *et al.* (1996). Clinical experiences with magnetic drug targeting: a

- phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumours. *Cancer Res* **56**: 4686–4693.
- Luz Garcia-Hernandez M, Gray A, Hubby B, Klinger O, Kast WM (2008). Prostate stem cell antigen vaccination induces a long-term protective immune response against prostate cancer in the absence of autoimmunity. *Cancer Res* **68**: 861–869.
- Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M *et al.* (2006). Electrochemotherapy – an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOP (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer* **4**: (Suppl) 3–13.
- Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazama JJ *et al.* (2002). High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J Gene Med* **4**: 333–341.
- Matsuno Y, Iwata H, Umeda Y, Takagi H, Mori Y, Miyazaki J *et al.* (2003). Non-viral gene gun mediated transfer into the beating heart. *ASAIO J* **49**: 641–644.
- Matthews K, Rhind SM, Gossner AG, Dalziel RG, Hopkins J (2007). The effects of gene gun delivered pIL-3 adjuvant on skin pathology and cytokine expression. *Vet Immunol Immunopathol* **119**: 233–242.
- Miao CH, Brayman AA, Loeb KR, Ye P, Zhou L, Mourad P *et al.* (2005). Ultrasound enhances gene delivery of human factor IX plasmid. *Hum Gene Ther* **16**: 893–905.
- Mikata K, Uemura H, Ohuchi H, Ohta S, Nagashima Y, Kubota Y (2002). Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of p53 gene: gene transfer by electroporation. *Mol Cancer Ther* **1**: 247–252.
- Miller DL, Song J (2003). Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound *in vivo*. *Ultrasound Med Biol* **29**: 887–893.
- Mir LM, Belehradek M, Domenge C, Orłowski S, Poddevin B, Belehradek J Jr *et al.* (1991). Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. *C R Acad Sci III* **313**: 613–618.
- Mir LM, Bureau MF, Rangara R, Schwartz B, Scherman D (1998). Long term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C R Acad Sci III* **321**: 893–899.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM *et al.* (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4262–4267.
- Mir LM, Moller PH, André F, Gehl J (2005). Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv Genet* **54**: 83–114.
- Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V *et al.* (2006). Standard operating procedures of the electrochemotherapy: instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer* **4**: (Suppl) 14–25.
- Nakamura M, Wang J, Murakami T, Ajiki T, Hakamata Y, Kaneko T *et al.* (2003). DNA immunization of the grafted liver by particle-mediated gene gun. *Transplantation* **15**: 1369–1375.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofscheider PH (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1**: 841–845.
- Newman CM, Laurie A, Brisken AF, Cumberland DC (2001). Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. *Echocardiography* **18**: 339–347.
- Ng KY, Liu Y (2002). Therapeutic ultrasound: its application in drug delivery. *Med Res Rev* **22**: 204–223.
- Niidome T, Huang L (2002). Gene therapy progress and prospects: non-viral vectors. *Gene Ther* **9**: 1647–1652.
- O'Brien J, Lummis SC (2004). Biolistic and diolistic transfection: using the gene gun to deliver DNA and lipophilic dyes into mammalian cells. *Methods* **33**: 121–125.
- Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Krotz F *et al.* (2003). The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* **384**: 737–747.
- Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN (1998). Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ cells after gene gun immunization. *J Exp Med* **188**: 1075–1082.
- Potter H, Weir L, Leder P (1984). Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7161–7165.
- Prentice P, Cuschierp A, Dholakia K, Prausnitz M, Campbell P (2005). Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation. *Nat Phys* **1**: 107–110.
- Raghavan R, Brady ML, Rodríguez-Ponce MI, Hartlep A, Pedain C, Sampson JH (2006). Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. *Neurosurg Focus* **20**: E12.
- Rajaratnam N, Steffler PM, Rizvi SAH, Smy PR (1994). An experimental study of very high velocity circular water jets in air. *J Hydraul Res* **32**: 461–470.
- Remacle C, Cardol P, Coosemans N, Gaisne M, Bonnefoy N (2006). High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4771–4776.
- Ren S, Li M, Smith JM, DeTolla LJ, Furth PA (2002). Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits. *BMC Biotechnol* **23**: 2–10.
- Roberto RR, Wulff H, Millar JD (1969). Smallpox vaccination by intradermal jet injection. 2. Cutaneous and serological responses to primary vaccination in children. *Bull World Health Organ* **41**: 761–769.
- Robinson M, Sharon A (1999). Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene* by electroporation of germinated conidia. *Curr Genet* **36**: 98–104.
- Rols MP, Delteil C, Golzio M, Dumond P, Cros S, Teissié J (1998). *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* **16**: 168–171.
- Satkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavcic D *et al.* (2002). Mechanisms of *in vivo* DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Mol Ther* **5**: 133–140.
- Satkauskas S, André F, Bureau MF, Scherman D, Miklavcic D, Mir LM (2005). Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of *in vivo* DNA electrotransfer. *Hum Gene Ther* **16**: 1194–1201.
- Sawamura D, Ina S, Itai K, Meng X, Kon A, Tamai K *et al.* (1999). *In vivo* gene introduction into keratinocytes using jet injection. *Gene Ther* **6**: 1785–1787.
- Sawyer GJ, Dong X, Whitehorne M, Grehan A, Seddon M, Shah AM *et al.* (2007). Cardiovascular function following acute volume overload for hydrodynamic gene delivery in the liver. *Gene Ther* **14**: 1208–1217.
- Sawyer GJ, Grehan A, Dong X, Whitehorne M, Seddon M, Shah AM *et al.* (2008). Low-volume hydrodynamic gene delivery to the rat liver via an isolated segment of the inferior vena cava: efficiency, cardiovascular response and intrahepatic vascular dynamics. *J Gene Med* **10**: 540–550.
- Schlicher RK, Radhakrishna H, Tolentino TP, Apkarian RP, Zarnitsyn V, Prausnitz MR (2006). Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol* **32**: 915–924.
- Schramm-Baxter JR, Katrenick J, Mitragotri S (2004). Jet injection into polyacrylamide gels: investigation of jet injection mechanisms. *J Biomech* **37**: 1181–1188.
- Schratzberger P, Krainin JG, Schratzberger G, Silver M, Ma H, Kearney M *et al.* (2002). Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle. *Mol Ther* **6**: 576–583.
- Schwan HP (1957). Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv Biol Med Phys* **5**: 147–209.
- Sebestyén MG, Budker VG, Budker T, Subbotin VM, Zhang G, Monahan SD *et al.* (2006). Mechanism of plasmid delivery by

- hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med* 8: 852–873.
- Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M (2008). Electrochemotherapy in treatment of tumours. *Eur J Surg Oncol* 34: 232–240.
- Shestopalov VI, Missey H, Bassnett S (2002). Delivery of genes and fluorescent dyes into cells of the intact lens by particle bombardment. *Exp Eye Res* 74: 639–649.
- Siegel R, Stein U, Kobelt D, Aumann J, Schlag PM, Walther W (2007). Early results of a phase-I-clinical trial of non-viral gene transfer by jet-injection into cutaneous lesions of metastatic breast cancer and in-transit lesions of metastatic melanoma. *Chir Forum* 36: 441–443.
- Sikes M, O'Malley BW Jr, Finegold MJ, Ledley FD (1994). *In vivo* gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum Gene Ther* 5: 837–844.
- Skorpikova J, Dolnikova M, Hrazdira I, Janisch R (2001). Changes in microtubules and microfilaments due to a combined effect of ultrasound and cytostatics in HeLa cells. *Folia Biol (Praha)* 47: 143–147.
- Smith NB (2007). Perspectives on transdermal ultrasound mediated drug delivery. *J Nanomedicine* 2: 585–594.
- Stein U, Walther W, Stege A, Kaszubiak A, Fichtner I, Lage H (2008). Complete *in vivo* reversal of the multidrug resistance phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA. *Mol Ther* 16: 178–186.
- Suda T, Suda K, Liu D (2008). Computer-assisted hydrodynamic gene delivery. *Mol Ther* 16: 1098–1104.
- Sudha PM, Low S, Kwang J, Gong Z (2001). Multiple tissue transformation in adult zebrafish by gene gun bombardment and muscular injection of naked DNA. *Mar Biotechnol* 3: 119–125.
- Suzuki T, Shin BC, Fujikura K, Matsuzaki T, Takata K (1998). Direct gene transfer into rat liver cells by *in vivo* electroporation. *FEBS Lett* 425: 436–440.
- Taketo A (1988). DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim Biophys Acta* 949: 318–324.
- Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Aoki M, Yamamoto S, Matsumoto K *et al.* (2002a). Development of safe and efficient novel non-viral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 9: 372–380.
- Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Namba T, Yamasaki K, Hashiya N *et al.* (2002b). Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* 105: 1233–1239.
- Tata DB, Dunn F, Tindall DJ (1997). Selective clinical ultrasound signals mediate differential gene transfer and expression in two human prostate cancer cell lines: LnCap and PC-3. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 64–67.
- Teissié J, Rols MP (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys J* 65: 409–413.
- Teissié J, Golzio M, Rols MP (2005). Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochim Biophys Acta* 1724: 270–280.
- Tieleman DP (2006). Computer simulations of transport through membranes: passive diffusion, pores, channels and transporters. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 893–903.
- Tieleman DP, Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ (2003). Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields. *J Am Chem Soc* 125: 6382–6383.
- Tsong TY (1991). Electroporation of cell membranes. *Biophys J* 60: 297–306.
- Tsong TY, Su ZD (1999). Biological effects of electric shock and heat denaturation and oxidation of molecules, membranes, and cellular functions. *Ann N Y Acad Sci* 888: 211–232.
- Tuting T, Storkus WJ, Falo LD (1998). DNA immunization targeting the skin: molecular control of adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 111: 183–188.
- Uchida T, Sanghyi NT, Gardner TA, Koch MO, Ishii D, Minei S *et al.* (2002). Transrectal high-intensity focused ultrasound for treatment of patients with stage T1b-2n0m0 localized prostate cancer: a preliminary report. *Urology* 59: 394–399.
- Van Bockstaele F, Pede V, Naessens E, Van Coppennolle S, Van Tendeloo V, Verhasselt B *et al.* (2008). Efficient gene transfer in CLL by mRNA electroporation. *Leukemia* 22: 323–329.
- Verhagen A, Ebels KT, Dogterom AA, Jonkman JH (1995). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose of recombinant human growth hormone after subcutaneous administration by jet-injection: comparison with conventional needle-injection. *Eur J Clin Pharmacol* 49: 69–72.
- Voges J, Reszka R, Gossmann A, Dittmar C, Richter R, Garlip G *et al.* (2003). Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. *Ann Neurol* 54: 479–487.
- Walther W, Stein U, Fichtner I, Malcherek L, Lemm M, Schlag PM (2001). Non-viral *in vivo* gene delivery into tumours using a novel low volume jet-injection technology. *Gene Ther* 8: 173–180.
- Walther W, Stein U, Fichtner I, Kobelt D, Aumann J, Arlt F *et al.* (2005). Non-viral jet-injection gene transfer for efficient *in vivo* cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma. *Mol Ther* 12: 1176–1184.
- Wang S, Joshi S, Lu S (2004). Delivery of DNA to skin by particle bombardment. *Methods Mol Biol* 245: 185–193.
- Wang X, Liang HD, Dong B, Lu QL, Blomley MJ (2005). Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology* 237: 224–229.
- Warren J, Zihel FA, Kish AW *et al.* (1953). Large-scale administration of vaccines by means of an automatic jet injection syringe. *JAMA* 157: 633–637.
- Watkins C, Hopkins J, Harkiss G (2005). Reporter gene expression in dendritic cells after gene gun administration of plasmid DNA. *Vaccine* 23: 4247–4256.
- Weller C, Linder M (1966). Jet injection of insulin vs the syringe-and-needle method. *JAMA* 195: 844–847.
- Wells DJ (2004). Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther* 11: 1363–1369.
- Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JC (1991). Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2726–2730.
- Wolff JA, Budker V (2005). The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 54: 3–20.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A *et al.* (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247: 1465–1468.
- Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W (1991). Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *Biotechniques* 11: 474–485.
- Wu F, Wang ZB, Chen WZ, Wang W, Gui Y, Zhang M *et al.* (2004). Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of 1038 patients with solid carcinomas in China: an overview. *Ultrason Sonochem* 11: 149–154.
- Xenariou S, Griesenbach U, Ferrari S, Dean P, Scheule RK, Cheng SH *et al.* (2006). Using magnetic forces to enhance non-viral gene transfer to airway epithelium *in vivo*. *Gene Ther* 13: 1545–1552.
- Yamashita Y, Shimada M, Tachibana K, Harimoto N, Tsujita E, Shirabe K *et al.* (2002). *In vivo* gene transfer into muscle via electrosonoporation. *Hum Gene Ther* 13: 2079–2084.
- Yang NS, Sun WH (1995). Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat Med* 1: 481–483.
- Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D (1990). *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9568–9572.
- Yang SY, Sun JS, Liu CH, Tsuang YH, Chen LT, Hong CY *et al.* (2008). *Ex vivo* magnetofection with magnetic nanoparticles: a novel platform for non-viral tissue engineering. *Artif Organs* 32: 195–204.

- Zagon IS, Sassani JW, Verderame MF, McLaughlin PJ (2005). Particle-mediated gene transfer of opioid growth factor receptor cDNA regulates cell proliferation of the corneal epithelium. *Cornea* **24**: 614–619.
- Zarnitsyn VG, Prausnitz MR (2004). Physical parameters influencing optimization of ultrasound-mediated DNA transfection. *Ultrasound Med Biol* **30**: 527–538.
- Zelenin AV, Kolesnikov VA, Tarasenko OA, Shafei RA, Zelenina IA, Mikhailov VV *et al.* (1997). Bacterial beta-galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection. *FEBS Lett* **414**: 319–322.
- Zerbib D, Amalric F, Teissié J (1985). Electric field mediated transformation: isolation and characterization of a TK+ subclone. *Biochem Biophys Res Commun* **129**: 611–618.
- Zhang G, Selzer ME (2001). *In vivo* transfection of lamprey brain neurons by gene gun delivery of DNA. *Exp Neurol* **167**: 304–311.
- Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA (1997). Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* **8**: 1763–1772.
- Zhang G, Budker V, Wolff JA (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* **10**: 1735–1737.
- Zhang G, Budker V, Williams P, Subbotin V, Wolff JA (2001). Efficient expression of naked DNA delivered intra-arterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **12**: 427–438.
- Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ *et al.* (2004). Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* **11**: 675–682.

Themed Section: Vector Design and Drug Delivery

Delivery of magic bullets: on the still rocky road to gene therapy: *K. Takeda*

Viral vectors: from virology to transgene expression: *D. Bouard, N. Alazard-Dany & F.-L. Cosset*

Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers: *P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc & P.-A. Jaffrès*

Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA: *E. Fattal & G. Barratt*

Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics: *F. Heitz, M. C. Morris & G. Divita*

Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications: *J. VILLEMEJANE & L. M. MIR*

Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future: *P. Chames, M. Van Regenmortel, E. Weiss & D. Baty*

The issue is available online at <http://www3.interscience.wiley.com/journal/121548564/issueyear?year=2009>

Article : Nanosecond pulsed electric field delivery to biological samples : difficulties and potential solutions

A. SILVE, J. VILLEMEJANE, V. JOUBERT, A. IVORRA et L.M. MIR

ADVANCED ELECTROPORATION TECHNIQUES IN BIOLOGY AND MEDICINE / CRC PRESS - M. MARKOV

Chap. 18, 2010

L'électroporation "conventionnelle" (utilisant des impulsions électriques de durée micro- ou millisecondes) est une technique largement utilisée aussi bien en recherche (transformation de bactéries et de cellules eucaryotes) qu'en clinique (traitement de tumeurs par électrochimiothérapie).

Les nsPEF sont une nouvelle technologie très prometteuse en particulier dans le domaine de l'électromanipulation de cellules. En effet, avec des impulsions "longues" (μs et ms), des changements sont détectables uniquement au niveau de la membrane cellulaire, alors que des impulsions "courtes" (ns) peuvent provoquer des modifications de comportement des membranes internes. En partant de cette idée, différents groupes se sont mis à étudier les effets de ces impulsions ultra-courtes sur les cellules vivantes.

Dans le chapitre proposé par la suite, les caractéristiques particulières des systèmes de génération et d'exposition d'objets biologiques (cellules ou tissus) à ce type d'impulsions sont détaillées et discutées. Alors que le passage de l'utilisation d'impulsions milliseconde à microseconde (ou inversement) est simple en terme d'équipements et de précautions à prendre pour l'exposition de cellules, cela est moins vrai pour le passage aux nsPEF. Nous fournissons ici quelques conseils pour les futurs utilisateurs de cette technologie afin de garantir une utilisation correcte et une bonne reproductibilité des expériences : il est essentiel de bien définir les besoins et d'utiliser des outils adaptés, tant pour le traitement que pour la récupération des données.

18

Nanosecond Pulsed Electric Field Delivery to Biological Samples: Difficulties and Potential Solutions

Aude Silve

*Institut Gustave-Roussy
Univ Paris-Sud*

Julien Villemejeane

*Institut Gustave-Roussy
Univ Paris-Sud
Ecole Normale
Supérieure de Cachan*

Vanessa Joubert

*Institut Gustave-Roussy
Univ Paris-Sud*

Antoni Ivorra

*Institut Gustave-Roussy
Univ Paris-Sud*

Lluis M. Mir

*Institut Gustave-Roussy
Univ Paris-Sud*

Tip to the Reader	18-1
18.1 Introduction	18-1
18.2 Taking Propagation into Account When Applying nsPEFs	18-2
When Propagation Is Relevant • Behavior of a Transmission Line • Impedance Matching for Exposure Devices	
18.3 Breakdown of Dielectric Materials	18-8
18.4 Monitoring of an Ultrashort Electric Signal	18-9
Choice of Suitable Probes • Monitoring Devices	
18.5 Side Effects of the Application of Pulsed Electric Fields	18-10
Thermal Effects • Electrochemical Effects	
18.6 Conclusion	18-14
Acknowledgments.....	18-15
References.....	18-15

Tip to the Reader

Non-bold italic symbols are employed here to denote scalars or time variables (e.g., a voltage signal in the time domain will be noted as $V(t)$ or V). Bold italic symbols are employed for complex variables (e.g., the Fourier transform of a voltage signal $V(t)$ will be noted as $V(\omega)$ or V). On the other hand, bold non-italic symbols are employed for vectors such as the electric field, \mathbf{E} , and the current density, \mathbf{J} .

18.1 Introduction

Electroporation using microsecond- or millisecond-long electric pulses is a well-known technology frequently used on the bench (e.g., bacteria and eukaryotic cell transformation in research laboratories) as well as at the bed (e.g., tumor treatment by electrochemotherapy, nowadays routinely used in Europe).

18-1

NsPEF is an emerging technology that encompasses a lot of promises because it opens new opportunities for cell “electromanipulation.” Indeed, with “long” (μs and ms) pulses, changes can only be generated at the level of the cell membrane, while “short” (ns) pulses can also provoke modifications at the level of the internal membranes. So, coming from the experience of using “long” pulses, several groups have started to use “short” pulses on living cells. It is also expected that, in the future, when equipment will become easier to use and more accessible, many other groups will also apply this technology.

In this chapter, we discuss the particular features of the delivery systems of nsPEFs that must be taken into account when cells or tissues are exposed to the pulses. While the transition from the use of millisecond pulses to the delivery of microsecond pulses (and vice versa) is almost straightforward, the same cannot be said for the transition from the micro-/milli-second pulses to nsPEFs. The purpose of this chapter is to provide some advice to future users of this technology on how to apply it correctly. More precisely, the ultimate goal of the chapter is to give a warning message regarding the use of nsPEF technology: usage of this technology is not straightforward; the experimental setup has to be designed carefully and some nontrivial considerations must be taken into account to ensure experimental repeatability and reproducibility.

18.2 Taking Propagation into Account When Applying nsPEFs

Generally, in benchtop-sized electrical systems involving signals with frequencies below 1 MHz, or with durations longer than $1\ \mu\text{s}$, propagation-related phenomena through the electrical connections can be considered negligible and it can be assumed that all points in a good electrical conductor reach the same voltage simultaneously. This is, for example, the case of conventional electroporation in which square pulses with a duration longer than $1\ \mu\text{s}$ (typically $100\ \mu\text{s}$ or longer) are applied. However, for nsPEFs the duration of the signals may be shorter than the time of propagation through the connections and, as a result, propagation-related phenomena will be very relevant. Actually, as it will be shown here, even in the case of the long pulses employed in conventional electroporation, it is possible to notice the consequences of propagation-related phenomena.

In this section, we give a brief introduction to propagation-related phenomena and we point out how these phenomena can be relevant when performing experiments involving nsPEFs. More comprehensive explanations for propagation-related phenomena and concepts can be found in the appropriate textbooks.

18.2.1 When Propagation Is Relevant

A pair of long conductors separated by a dielectric forms a *transmission line*, which is a structure that allows the transmission of voltage signals between two points. In a lot of cases, such transmission appears to be instantaneous (e.g., switching on lights), but in others the voltage *wave* requires a significant amount of time to propagate from one point to the other one (e.g., wired electrical telegraphy). When transmission is considered to be instantaneous, each conductor of the transmission line is simply modeled as an ideal wire, which implies that all points along that wire have the same voltage value at the same time and that simple circuit theory is applicable (i.e., Kirchhoff’s circuit laws). On the other hand, when propagation is relevant, different phenomena associated with propagation are manifested (e.g., delay, reflections, and stationary waves) and the ideal wire model is no longer valid.

Determining when propagation will be relevant or not is not always obvious. A continuous sinusoidal signal applied to one of the extremes of the transmission line will cause a sinusoidal pattern of voltages along the transmission line length as the signal propagates. The distance between the crests of this spatial sinusoidal pattern, measured in meters, is known as *wavelength*, λ , and it depends on the frequency of the excitation signal, f , expressed in hertz (Hz) and the propagation speed of the transmission line for that specific frequency, v , expressed in m/s :

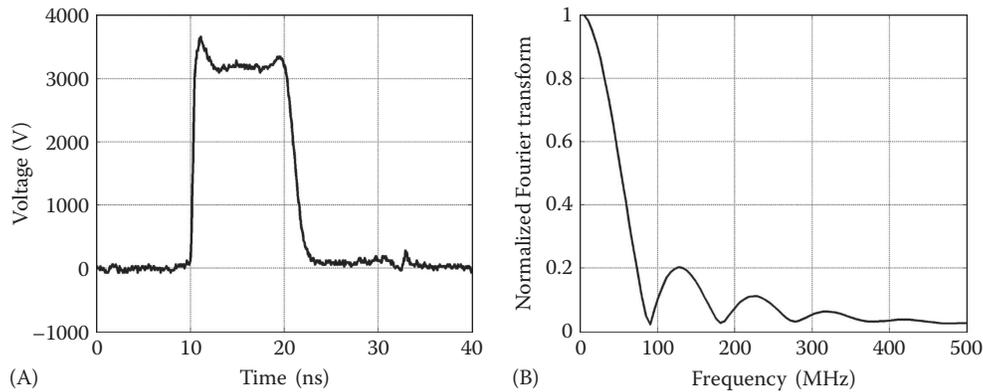


FIGURE 18.1 Example of a 10 ns pulse delivered by a high-voltage pulse generator. (A) Voltage signal measured at a $50\ \Omega$ load, and (B): normalized spectrum of the voltage signal in (A) computed by performing the Fourier transform.

$$\lambda = \frac{v}{f}$$

Following this definition, in most textbooks it is stated that propagation phenomena have to be considered when the transmission line length, L , is larger than the wavelength of the signal in that particular line. This rule is not applicable for the case of pulse signals but, with some limitations, it can be transposed for those cases by saying: propagation-related phenomena will have to be considered when the transmission line is longer than the wavelength corresponding to the maximum frequency at which the power spectral density of the pulse signal is still significant. For instance, in Figure 18.1, it can be observed that the power spectral density of a 10 ns quasi-square pulse is still significant up to frequencies above 200 MHz. For this 200 MHz frequency, since the wavelength will be in the order of 1 m ($v \sim 2 \times 10^8$ m/s), according to the transposed rule it can be said that propagation phenomena have to be considered in benchtop-sized systems. The frequency contents of a pulse signal will depend both on its duration (observe that in Figure 18.1 the first notch corresponds to the inverse of pulse duration) and on its rising time: the steeper the voltage rise is, the broader the frequency content will be.

Intuitively, it could be thought that an alternate, and simpler, rule for deciding when propagation will be relevant in the case of pulse signals could be the following: propagation has to be taken into account when the propagation time of the pulse through the length of the transmission line is longer, or in the same order, than the duration of the pulse (i.e., propagation is relevant when $(L/v) > T$, where T is the duration of the pulse). However, as it will be shown now, this rule is not valid.

As it has been mentioned, in conventional electroporation, propagation-related phenomena are generally neglected. This is not surprising when it is taken into consideration that cables between the electrodes and the generator are shorter than 1 or 2 m and that propagation speeds are in the order of 2×10^8 m/s; it would take 10 ns for an electrical signal to travel along 2 m of cable, which is negligible compared with the total duration of the pulse (i.e., $(L/v) \ll T$).

Nevertheless, it must be noted that the impact of propagation-related phenomena on pulse signals with a duration larger than $1\ \mu\text{s}$ can actually be noticed if careful observations are performed. For instance, Figure 18.2 shows the result of a simulation in which a $100\ \mu\text{s}$ pulse is delivered to a $10\ \Omega$ resistance through a cable with a propagation delay of 7.5 ns (equivalent to 1.5 m). At first glance, it can be observed that the voltage signals at the generator (V_{in}) and at the load (V_{out}) are apparently identical. However, if the attention is focused on the pulse edges, then it can be noticed that both signals are not strictly identical; V_{out} appears to be delayed and “softened.” This distortion is not only due to mere

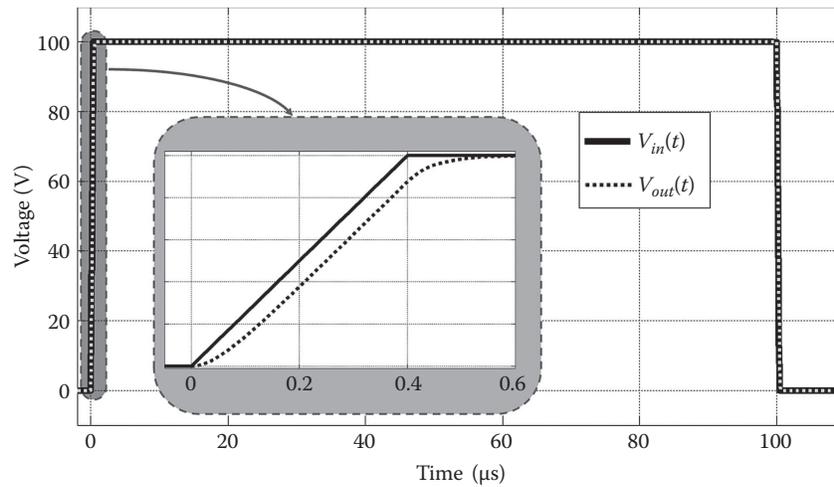


FIGURE 18.2 Simulated example of the influence of propagation related phenomena on the shape of a 100 μs pulse. This is a SPICE simulation (LTspice IV by Linear Technology Corp., Milpitas, California) in which the voltage at a 10 Ω load (V_{out}) was monitored when pulses (V_{in}) from a 0 Ω output impedance generator were delivered through a transmission line with propagation delay of 7.5 ns (equivalent to 1.5 m) and a characteristic impedance of 50 Ω (these concepts are later explained in Section 18.2.2).

propagation but also to a propagation-related phenomena that is later described: signal reflections occur at the connections between the three different elements of the system (generator, cable, and resistance).

Therefore, propagation-related phenomena actually do have an impact on the signals typically used in conventional electroporation. However, this impact is only significant on the pulse edges and, in terms of biological consequences, it has been demonstrated that the shape of those edges is not relevant in conventional electroporation (Kotnik et al. 2001a).

18.2.2 Behavior of a Transmission Line

18.2.2.1 Propagation Phenomenon

This section presents a classical electrical model for transmission lines (e.g., coaxial cables) that reveals the propagation phenomenon.

For the whole length of the transmission line, the model consists of a succession of small electric sub-circuits each of which has a infinitesimal length, dx , very small compared with the wavelength. Because of their short length, in each sub-circuit it is possible to ignore the propagation phenomenon and the simple circuit theory analysis can be applied. Each sub-circuit (Figure 18.3) is modeled by a series inductance ($L = l \cdot dx$ [H], l is the linear inductance [H/m]) and a parallel capacitance ($C = c \cdot dx$ [F], c is the linear capacitance [F/m]). In addition, more complete models include resistive elements (a series resistance with L and a parallel conductance with C) that are responsible for an attenuation of propagated signals. Nevertheless, signal attenuation, and hence those dissipative elements, are usually neglected if the transmission line length does not exceed the wavelength by several orders of magnitude, which is the case in nsPEF experimental setups.

Then, despite the fact that each sub-circuit does not model the propagation phenomenon, it is possible to demonstrate by means of differential equations that voltage signals do propagate without distortion along the transmission line length (x) with a speed equal to

$$v = \frac{1}{\sqrt{lc}} \quad [\text{m/s}]$$

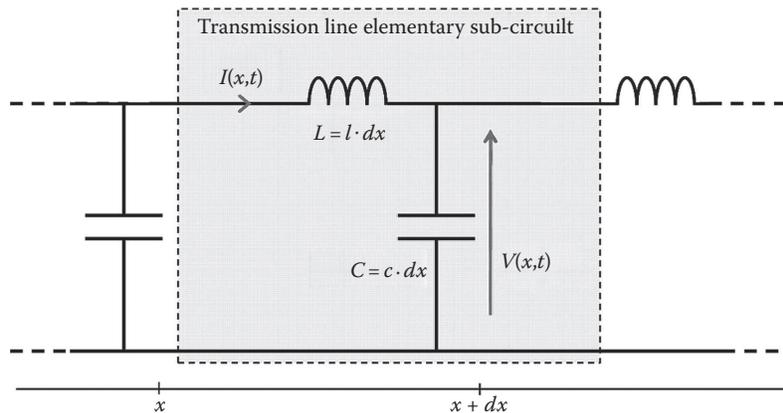


FIGURE 18.3 A transmission line can be modeled as a succession of elementary sub-circuits in which the propagation phenomenon can be neglected.

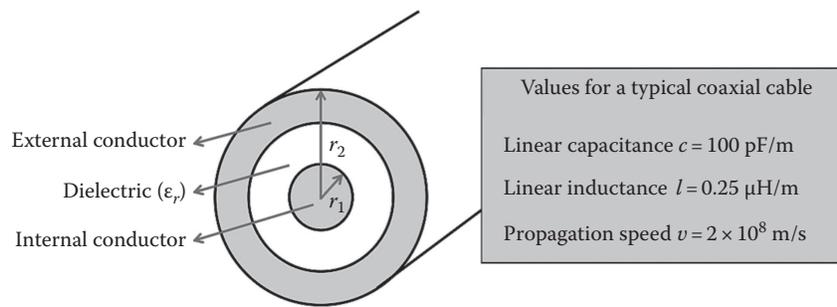


FIGURE 18.4 Electrical characteristics of a common coaxial cable.

The propagation speed is fixed by the linear capacitance and inductance of the transmission line, which are themselves imposed by the materials (especially the dielectric) that compose the line and by the geometry of the transmission line. In the case of a coaxial cable (presented in Figure 18.4), approximate values for linear capacitance and inductance can be evaluated by the following expressions:

$$c = \frac{2\pi\epsilon_0\epsilon_r}{\text{Log}\left(\frac{r_1}{r_2}\right)} \text{ [F/m]} \quad \text{and} \quad l = \frac{\mu_0}{2\pi} \text{Log}\left(\frac{r_1}{r_2}\right) \text{ [H/m]}$$

18.2.2.2 Characteristic Impedance and Reflections

It can be demonstrated that at any point in the transmission line, when the signal propagates from the pulse generator to the biological load (+ direction), the voltage ($V(x)_+$) and current ($I(x)_+$) are related according to

$$\frac{V(x)_+}{I(x)_+} = Z_c \quad \text{with} \quad Z_c = \sqrt{\frac{l}{c}}$$

The impedance introduced here, Z_c , is called the *characteristic impedance* of the transmission line and is expressed in ohms. A standard value for radio-communications coaxial cables is 50 Ω.

The sample that is exposed to nsPEFs is commonly placed at the end of the cable and, from an electrical point of view, it can be modeled as a load with complex impedance Z (Figure 18.5). If this load matches the characteristic impedance of the cable, i.e., when $Z = Z_c$, then the voltages and the currents at the two sides

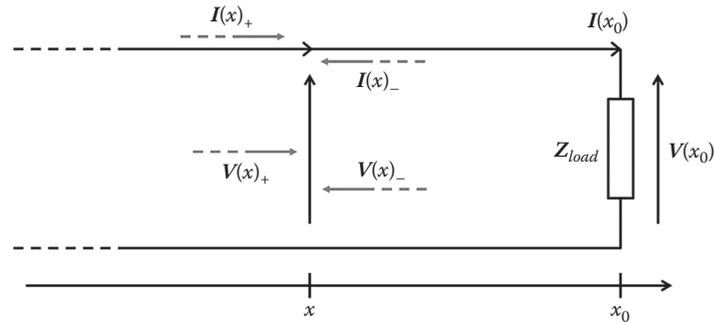


FIGURE 18.5 Reflection on the termination of the transmission line. When the voltage and current signals propagating in the positive x -direction ($V(x)_+$; $I(x)_+$) reach a mismatched load, they are partially reflected. The reflected signals ($V(x)_-$; $I(x)_-$) propagate in the opposite direction.

of the transmission line termination (i.e., at the load and at the transmission line) are the same. In this case, all the energy that was propagating in the line is absorbed by the termination load. On the contrary, if $Z \neq Z_c$, a reflection will occur and a voltage wave will start to propagate in the opposite direction through the transmission line (i.e., from the load towards the pulse generator). This reflected wave is produced by the following mechanism: the Ohm's law is valid at both sides of the transmission line termination (i.e., at the load and within the transmission line); therefore, since the voltage at both sides of the termination is also the same, when $Z \neq Z_c$, it is required that a current is generated in the opposite direction in order to obey Kirchhoff's current law. This current in turn generates the voltage wave ($V(x)_- = Z_c \cdot I(x)_-$). Once the reflected wave reaches the generator, another reflected wave (in the $+$ direction) will be generated if the impedance of the generator (i.e., its output impedance) does not match the characteristic impedance.

When reflections occur, part of the energy contained in the pulse is absorbed by the load and part of it is reflected. The fraction of energy transmitted to the load can be evaluated. The results of the computation for a $50\ \Omega$ cable and a resistive termination R_{load} , are plotted in Figure 18.6. As displayed, transmitted power is maximum for the impedance matching condition and it rapidly decreases for lower or larger load resistance values.

It is important to mention that not only the amount of energy transmitted to the load will be affected by reflection. The levels and shapes of voltage and current signals can be dramatically different from the ones initially coming out of the generator. Indeed, the voltage at the load and the current that runs through it are the sum of the initial signals and the reflected ones:

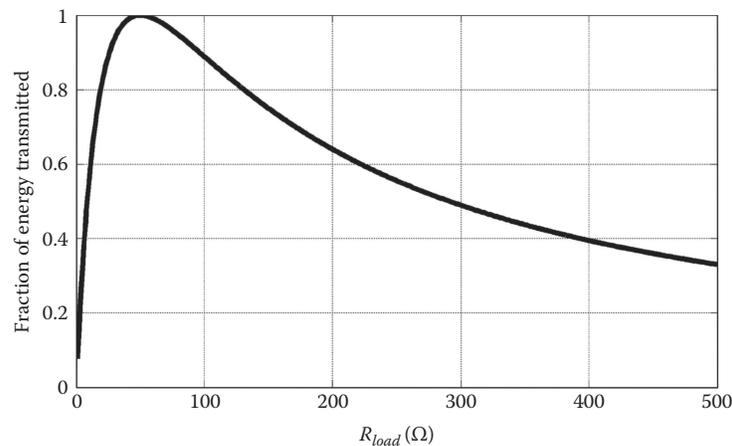


FIGURE 18.6 Fraction of the energy transmitted to the load in the case of a resistive termination and a $50\ \Omega$ cable.

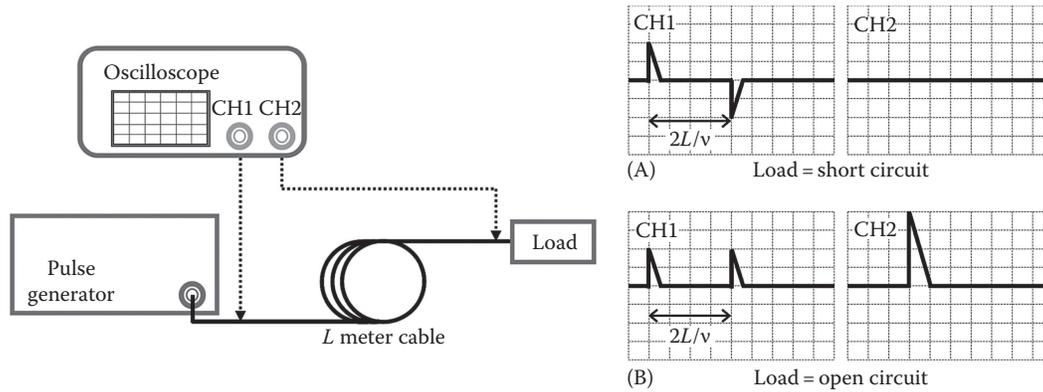


FIGURE 18.7 Illustration of reflection for two different loads. A pulse generator is connected to a load through a transmission line (length L ; propagation speed v). If the load is a short circuit (A), the pulse is totally reflected in phase opposition and the resulting voltage on the load is null. If the load is an open circuit (B), the pulse is totally reflected in phase and the resulting voltage is twice the generated one.

$$I(x_0) = I(x_0)_+ + I(x_0)_- \quad \text{and} \quad V(x_0) = V(x_0)_+ + V(x_0)_-$$

These relations are also true in the frequency domain:

$$I(x_0) = I(x_0)_+ + I(x_0)_- \quad \text{and} \quad V(x_0) = V(x_0)_+ + V(x_0)_-$$

The magnitudes and phases of the reflected signals can be expressed as functions of the initial signals defining the complex reflection coefficients Γ_V and Γ_I :

$$\Gamma_V = \frac{V(x_0)_-}{V(x_0)_+} = \frac{Z_{load} - Z_c}{Z_{load} + Z_c} \quad \text{and} \quad \Gamma_I = \frac{I(x_0)_-}{I(x_0)_+} = \frac{Z_c - Z_{load}}{Z_{load} + Z_c} = -\Gamma_V$$

The most striking examples of impedance mismatch are observable in extreme cases: a perfect short-circuit and a perfect open circuit. These examples are illustrated in Figure 18.7. When the load is an open circuit, the voltage amplitude of the pulse at the load terminals is twice the amplitude of the pulse that was traveling from the generator. On the other hand, if the load is a short-circuit, the voltage amplitude at the load will be null.

As a consequence, it appears that for a given pulse generator and cable, the applied signals, and in particular the applied voltage, will be highly dependent on the impedance of the exposure device, which in turn will depend on the properties of the biological sample.

18.2.3 Impedance Matching for Exposure Devices

One of the common ways of doing in vitro experiments is to use commercial electroporation cuvettes filled with cell suspensions (Garon et al. 2007, Kolb et al. 2006). The typical dimensions for such cuvettes are: an electrode area S of 1 cm^2 and an electrode separation l of 1 mm (volume = 0.1 mL). With these dimensions, a cuvette filled with a solution with a conductivity of $\sigma = 1 \text{ S/m}$ would have a resistance R (Ω) of approximately

$$R = \frac{1}{\sigma} \cdot \frac{l}{S} = 10 \Omega$$

If a 10 kV pulse was applied through a 50Ω cable to such a cuvette, the resulting voltage according to the reflection coefficients would be 3.3 kV . In order to minimize such voltage drop, it is possible to adjust the

conductivity of the solution or to modify the geometrical characteristics of the cuvette so that the load impedance is better matched to the characteristic impedance of the cable. Unfortunately, the experimental conditions narrow the degrees of freedom for such kind of solutions. For instance, although it is possible to reduce the conductivity of a cell suspension medium without altering its osmolarity by adding non-ionic agents (e.g., sucrose), the biological consequences of an extreme depletion of extracellular ions will add uncertainty to the interpretation of the observations.

Alternative solutions can be based on modifying the other elements of the system. For instance, it is possible to interconnect multiple generators in order to change the total source impedance or even to build an adapted generator (Hall et al. 2007). Another feasible solution is to insert a matching impedance in parallel with the load in those cases in which the sample has a high impedance. Some examples of this approach can be found for single cell exposure (Pakhomov et al. 2007). In this configuration, most electrical power will be transmitted to the matching impedance and not directly to the biological sample.

In general, both the resistive component, R , and the reactive component, X , of the biological sample impedance ($Z = R + jX$) will be significant at the frequencies of interest. Then, since the characteristic impedance of most transmission lines is purely resistive ($Z_c = 50\ \Omega + j0\ \Omega$), some degree of pulse distortion will be almost unavoidable. In radio-communications, it is possible to match reactive impedances by inserting compensating circuits. However, such compensating circuits are only useful for a single frequency or for a narrow bandwidth, which is not the case in pulse transmission.

Finally, it must be mentioned that the electrical connection from the transmission line to the sample will also contribute by itself to the global impedance of the load. Indeed, a cuvette holder is necessary for connecting a cuvette to a coaxial cable for in vitro experiments. Similarly, for performing in vivo experiments, electrodes and connectors are necessary. These connections will basically add parasitic capacitances and inductances to the sample. An essential rule for limiting parasitic effects is to make the connection as short as possible both to avoid propagation phenomena and to minimize inductive and capacitive parasitic elements. In conclusion, even if all the issues described above are carefully addressed when implementing the experimental setup, distortion cannot be fully avoided. As a consequence, nsPEF delivery must be accompanied by monitoring of the signal waveforms.

18.3 Breakdown of Dielectric Materials

The so-called *dielectric strength* of an electrically insulating material indicates the maximum electric field that the material can withstand without experiencing an abrupt failure of its insulating properties, either reversible or irreversible. Such failure in isolation is known as an *electrical breakdown* and it has been observed to occur in dielectric solids, gases, and liquids. Dry air at atmospheric pressure has a dielectric strength of about 3 MV/m, polytetrafluoroethylene (Teflon™) has a dielectric strength higher than 60 MV/m, that value for alumina is about 13 MV/m, for polystyrene it is about 20 MV/m, and for fused silica it is possible to measure dielectric strength values above 400 MV/m. The breakdown process typically develops within a few nanoseconds (Beddow and Brignell 1966) and, for most materials, it is believed that the main phenomenon responsible for it is the *avalanche breakdown*: if the electric field is strong enough, free electrons in the dielectric material, either preexisting or freed by the electric field, are accelerated by the electric field and liberate additional electrons when colliding with the atoms of the material (i.e., ionization) so that the number of free charged particles is thus increased rapidly in an avalanche-like fashion. In the context of this book, it is interesting to note that cell membrane electroporation is a case in which avalanche breakdown does not seem to be involved in the insulation failure process (Crowley 1973).

Transmission lines consist of metallic conductors and dielectrics. It is obvious then that the maximum voltage that a transmission line will be able to withstand will depend on the geometrical features of the line (e.g., the separation distance between conductors) and the dielectric strength of the dielectric material. A typical RG-58/U coaxial cable employed in 10BASE2 Ethernet computer networks and for radio-communications is specified to withstand $1500\ V_{DC}$ between the inner conductor and the shield, whereas a RG-194/U coaxial cable, intended for pulse transmission, can withstand DC voltages above

30 kV. Such an increase in voltage tolerance comes with the drawback of a larger diameter (5 mm for the RG-58/U against 50 mm for the RG-194/U) and an increase in mechanical stiffness.

The same kinds of considerations have to be applied to the connectors between the transmission lines and the exposure chamber or the pulse generator. Furthermore, an aspect that must be carefully taken into account is that the dielectric strength of air is particularly low (3 MV/m) and sparks (i.e., dielectric breakdown) may occur easily at open connectors or between the electrodes of the exposure chamber. These sparks will probably not be destructive but they will prevent the proper application of the pulses to the sample. On the other hand, it is convenient to mention that for solid dielectrics even a single breakdown event can severely permanently degrade the insulating capabilities of the material.

18.4 Monitoring of an Ultrashort Electric Signal

18.4.1 Choice of Suitable Probes

As mentioned earlier, it is advisable to capture and observe the signals that are actually applied to the exposure chamber. Besides the voltage signal, it can also be convenient to monitor the current that flows through the sample.

The first stage in the acquisition chain consists of the so-called *probes*. A *high-voltage probe* scales down the voltage to tolerable levels by the next stage in the acquisition chain (e.g., a 50 Ω oscilloscope input typically tolerates voltage amplitudes of about 1 V), whereas a current probe transforms the current signal into a voltage signal. High-voltage probes are usually based on resistive voltage dividers and high-current probes are generally based on the Hall effect. The specific features of the nsPEFs (high voltage, high current, and high bandwidth) impose some serious design constraints for the probes and, as consequence, only a handful of suppliers commercialize suitable probes. Probes useful for monitoring nsPEF signals are typically employed in applications that involve similar signal features (e.g., ultra large band radar and plasma generation).

A fundamental limitation of high-voltage probes and current probes is their bandwidth. Typically, these probes behave as first-order low-pass filters and their cutoff frequency will determine to a large extent the fidelity of the whole acquisition system. For instance, the simulations depicted in Figure 18.8

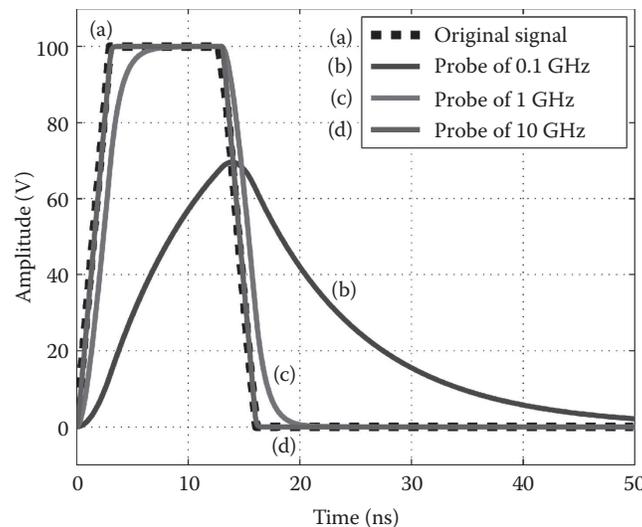


FIGURE 18.8 Time behavior of voltage probes with different cutoff frequencies. Responses (traces b, c, and d) have been obtained from SPICE simulations (MacSpice) under the assumption that probes behave as first-order low-pass filters. The simulated original signal (trace a) has an amplitude of 100 V and a duration of 16 ns (including 3 ns + 3 ns rise and fall times).

show the response to a 16 ns pulse (including 3 ns + 3 ns rise and fall times) when three voltage probes with different cutoff frequencies are employed: 0.1, 1, and 10 GHz. As it can be noticed, a voltage probe with a cutoff frequency of 0.1 GHz (trace b) would not only dramatically distort the shape of the original signal but it would also yield an underestimation of the pulse amplitude (70 V instead of 100 V).

As an alternative to high-voltage probes, it is possible to employ *tap-offs*, also known as *power dividers* or *splitters*, inserted in the transmission line. These components are particularly interesting as they allow a direct visualization of the reflections.

18.4.2 Monitoring Devices

Once the high-voltage and current signals have been transformed into low-voltage signals, capturing them and digitalizing them before proceeding to the subsequent monitoring stages is required (e.g., storage, parameterization, and visualization). Different solutions can be adopted in order to perform all the required steps but, in terms of convenience, modern digital oscilloscopes probably outperform all other approaches. Digital oscilloscopes integrate signal acquisition elements together with visualization elements (i.e., display), data storage, and parameterization mathematical tools (e.g., automatic quantification of pulse amplitude and width).

The particular features of the nsPEFs signals impose at least two specific characteristics of the monitoring system: (1) large acquisition bandwidth and (2) large memory.

Signal acquisition bandwidth is largely determined by the sampling rate of the analog to digital converter (ADC) embedded within the acquisition system. The Nyquist–Shannon theorem states that it is sufficient to sample at a rate twice higher than the bandwidth of the input signal in order to be able to accurately reconstruct the original waveform. However, oversampling, that is, digitalizing the signal at a higher frequency than twice the bandwidth of the signal being sampled, is commonly performed in signal acquisition systems as it provides some advantages in terms of noise cancellation and facilitates the design of the system. As a matter of fact, digital oscilloscopes generally have sampling rates well above three times the maximum input bandwidth.

A second important feature, especially in the case of acquisition of long trains of pulses, is the memory available for the storage of the acquired data. A single 10 ns pulse sampled at 50 GS/s will only require 500 points of memory. However, a single pause of 100 ms between two pulses in a train of pulses (i.e., pulse repetition frequency of 10 Hz) will fill 5×10^9 points of memory, which is well above the *memory depth* of current scopes. Fortunately, current high-performance oscilloscopes include a memory segmentation function that allows the recording of all the “interesting” points, whereas the “dull” ones are disregarded. When a pulse is detected (i.e., oscilloscope *trigger*), only a limited number of samples before and after the trigger are recorded so that only the time segments corresponding to the pulses are recorded sequentially in memory. Later on, all the useful information concerning the applied pulses (e.g., amplitude, duration, and rise and fall times) can be assessed.

18.5 Side Effects of the Application of Pulsed Electric Fields

The administration of pulsed electric fields to biological samples can be accompanied by phenomena not related to the direct effects of the electric fields on biological structures and their constituents. These phenomena, which could be labeled as *interfering phenomena*, must be taken into account and, if possible, avoided in order to simplify the interpretation of the experimental results. Phenomena such as cell electrodeformation (due to Maxwell stress) or ionization of macromolecules should not be included within this category as they are in fact a direct consequence of the pulses on the constituents of the biological sample.

Here we briefly introduce and discuss two groups of *interfering phenomena* caused by the application of high field pulses: (1) thermal effects and (2) electrochemical effects. Our description of both

families of phenomena is focused on nsPEFs but most of what is said here can also be applied to pulses employed in conventional electroporation.

18.5.1 Thermal Effects

Electrical power is dissipated as heat at any conductor. This phenomenon is known as *Joule heating* but it is also referred to as *ohmic heating* or *resistive heating* because of its relationship with Ohm's law ($V = IR$)

$$P_{dissipated} = VI = I^2R = \frac{V^2}{R} = V^2G$$

where

$P_{dissipated}$ is the total amount of heat power generated in the whole conductor (expressed in watts [W])

V is the applied voltage (volts [V])

I is the current that flows through the conductor (amperes [A])

R is the resistance of the conductor (ohms [Ω])

G is the conductance of the conductor (inverse of the resistance, expressed in siemens [S])

The above equation is intended for two-terminal components (e.g., a piece of wire). For infinitesimal volumes, the Ohm's law can be expressed as

$$\rho = \frac{|\mathbf{E}|}{|\mathbf{J}|}$$

where

ρ is the resistivity of the material (ohms \times meter, [Ω m])

$|\mathbf{E}|$ is the local magnitude of the electric field (V/m)

$|\mathbf{J}|$ is the magnitude of the current density (A/m²)

And now it is possible to write down an expression for the dissipated power due to Joule heating in a unitary volume ($p_{dissipated}$, expressed in W/m³)

$$p_{dissipated} = |\mathbf{E}||\mathbf{J}| = \frac{|\mathbf{E}|^2}{\rho} = \sigma |\mathbf{E}|^2$$

where σ is the conductivity of the material (inverse of ρ , [S/m]).

If it is assumed that no heat exchange occurs within the conductive material and between the material and its environment (i.e., the worst case scenario if sample heating is undesirable), then the increase in temperature at each sample point (ΔT) can be easily calculated as

$$\Delta T = \frac{U_{heat}}{cd} = \frac{\sigma |\mathbf{E}|^2 t}{cd}$$

where

t is the time (s)

U_{heat} is the applied thermal energy (= power \times time, expressed in joules, [J] = [W s])

c is the specific heat capacity of the material (joules/(grams \times Kelvin), [J/(g K)])

d is the mass density of the material (g/m³)

If a single 10 ns pulse of 1 MV/m (10 kV/cm) is applied to a cell suspension in a highly conductive medium ($\sigma = 1.5 \text{ S/m}$), the maximum temperature increase that can be expected is only 0.0036 K ($c_{\text{water}} = 4.184 \text{ J/(g K)}$, $d_{\text{water}} = 0.997 \times 10^6 \text{ g/m}^3$), which is negligible under biological experimental conditions. On the other hand, if longer or larger pulses are considered, then the temperature jumps can start to be significant. For instance, a single pulse of 5 MV/m and 50 ns would produce a temperature rise of about 0.45°, which is probably still too low to cause observable biological effects; particularly taking into account that such an increase in temperature will only last for a few seconds or fractions of a second in the actual setups in which heat dissipates. However, it must be noticed that pulses are commonly applied at repetition frequencies of 1 Hz or higher and, in these cases, temperature can build up if heat does not dissipate rapidly enough. In such cases, it is highly advisable to perform thermal measurements (e.g., by means of fiber optic thermal sensors or infrared cameras, which are both fast and free of pulse interference) or to perform numerical thermal modeling of the system (Davalos et al. 2005).

The maximum tolerable temperature increase will depend on the experimental conditions and on the objectives of each biological study. As stated by Diller and Pearce (1999), damage to biological structures resulting from elevated temperatures is very sensitive to the value of the highest temperature that is reached and less so to the time of exposure, but, of course, both factors are important. Nevertheless, although some models have been implemented to describe such double dependency (Diller and Pearce 1999) and have been applied for electroporation (Maor et al. 2008), until now most studies in conventional electroporation and in the nsPEF field only consider a maximum value for the temperature increase as the criterion for tolerability. In particular, researchers in the nsPEF field consider that temperature rises of about some tenths of Kelvin (Schoenbach et al. 2001, Vernier et al. 2004) or of a few Kelvins (Deng et al. 2003, Nuccitelli et al. 2006) are perfectly tolerable in their studies.

It must be noted that Joule heating depends on the square of the electric field magnitude. This fact implies that field distribution heterogeneities will have a significant impact on heating. For instance, high electric fields around the electrodes due to the edge effect may cause local thermal burns after nsPEF administration in the same way that has been observed in conventional tissue electroporation (Edd et al. 2006). Moreover, Vernier et al. hypothesized that field distribution heterogeneities at the cell or sub-cellular level could cause thermal differences at the microscopic level, but those were not noticed in their study (Vernier et al. 2004).

Temperature plays an important role in ionic conductance: the viscosity of the solvent decreases as the temperature rises, increasing ion mobility and, consequently, increasing electrical conductivity. Although such dependence is not very significant (for most aqueous ionic solutions, the temperature dependence of conductivity is about +2%/K), this phenomenon can in turn have a slight effect on the temperature: as temperature increases due to Joule heating, conductivity increases and therefore Joule heating further increases, which accelerates the climb in temperature.

Finally, we want to point out another temperature-related phenomenon that may have some biological significance: water thermal expansion. When liquid water is heated, its volume increases and, if such volume increase is confined or cannot disperse sufficiently rapidly, as happens in the case of short thermal bursts, then pressure increases according to the equation

$$\Delta P = \frac{\alpha}{\beta} \Delta T$$

where

ΔP is the resulting pressure increase

α is the thermal expansion coefficient of water ($207 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$)

β is the compressibility coefficient of water ($4.6 \times 10^{-4} \text{ Pa}^{-1}$)

ΔT is the applied temperature increase

This sudden increase in pressure may have some effect by itself at the location where it is created but it can also affect distant locations as it causes a shockwave that propagates. In fact, this phenomenon has been proposed as a mechanism to generate shockwaves for lithotripsy treatments as an alternative to underwater sparks (U.S. patent 6,383,152 B1). Nevertheless, it does not seem very plausible that this phenomenon could have significant biological consequences. A sudden increase in temperature of 0.5° would imply an increase in pressure of about 225 kPa (2.2 atm). This figure may seem important but in fact is almost negligible taking into account that lithotripsy shockwaves have pressures of about 100 atm and are only effective on hard materials (e.g., kidney stones) and not on soft tissues.

18.5.2 Electrochemical Effects

When DC currents are forced to flow through the interface between an electronic conductor (e.g., a metal) and an ionic conductor (e.g., biological media), oxidation and reduction chemical reactions (“redox” reactions) occur, which involve the molecules of the metal (electrode) and those of the ionic media (electrolyte) in a process called electrolysis. Some of the resulting chemical species liberated into the media can interfere with the biological processes up to the point of compromising cell viability. As a matter of fact, at present, electrochemical reactions are intentionally caused with low level currents applied through metallic needles for the ablation of solid tumors in a procedure called electrochemical treatment (EChT) (Nilsson et al. 2000).

In comparison with Joule heating, electrochemical effects are fundamentally accumulative: the chemical species created by electrolysis will accumulate pulse after pulse; although some molecules will finally escape as gas or will recombine with molecules in the media to form neutral species.

The main reactions that are believed to occur in biological samples when inert electrodes (e.g., platinum) are employed are (Nilsson et al. 2000, Saulis et al. 2005)

1. $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \Rightarrow \text{H}_2 (\text{gas}) + 2\text{OH}^-$ at the cathode
2. $2\text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{O}_2 (\text{gas}) + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ at the anode
3. $2\text{Cl}^- \Rightarrow \text{Cl}_2 (\text{gas}) + 2\text{e}^-$ also at the anode

Furthermore, if instead of inert electrodes, electrochemically soluble electrodes (e.g., copper, aluminum, or stainless steel) are employed, then other oxidation reactions that release metallic ions can also occur at the anode (Kotnik et al. 2001b), such as (Saulis et al. 2005)

4. $2\text{Al} \Rightarrow 2\text{Al}^{3+} + 6\text{e}^-$

The biological significance of each one of the above reactions and their resulting species is still a matter of debate. Nevertheless, it is believed that H^+ production at the anode (i.e., pH decrease) is particularly important in EChT (Nilsson et al. 2000), whereas the release of Al^+ ions has been found to alter Ca^{2+} homeostasis in cell cultures (Loomis-Husselbee et al. 1991).

Faraday’s laws of electrolysis indicate that the amount of substance (M), measured in moles (i.e., number of molecules), produced by the above electrochemical reactions will be proportional to the total electric charge injected by the external source (Q , measured in coulombs, [C])

$$M \propto Q = \int_{-\infty}^t I(t) dt$$

or, for a constant current pulse (I) with Δt duration,

$$M \propto Q = I\Delta t$$

Therefore, if it is assumed that electrochemically generated species freely diffuse through the whole sample, it seems reasonable to specify doses for electrochemical treatments as the amount of charge per unit of volume (C/m^3). Yen et al. (1999) reported that charge to volume ratios as low as $0.3 C/mL$ ($3 \times 10^5 C/m^3$) have an impact on cell growth. That figure can be put in the perspective of the nsPEFs with the following example: a single $1 MV/m$ pulse of $10 ns$ applied in a cuvette with an electrode area of $1 cm^2$ and an electrode separation of $1 mm$ (i.e., volume = $1 \times 10^{-7} m^3 = 0.1 mL$) would produce a charge of approximately $15 \mu C/mL$ assuming that the medium had a conductivity of $1.5 S/m$. Therefore, in order to reach the $0.3 C/mL$ dose, $20,000$ pulses would be required, which is much higher than the number of pulses that researchers usually apply in the nsPEF field. On the other hand, since the amount of charge is proportional both to the pulse duration and to the current, a single $5 MV/m$ pulse of $50 ns$ applied to the same setup would produce a charge of $375 \mu C/mL$. In this case, for reaching the $0.3 C/mL$ dose, 800 pulses would be required, which, although still higher than the number of pulses usually applied, comes closer to the actual experimental conditions. Furthermore, two facts must be noted here for precaution: (1) the $0.3 C/mL$ dose was obtained under specific experimental conditions and quite probably the dose for other conditions and other biological effects is significantly lower and (2) at higher voltages, the kinetics of the electrochemical reactions may be significantly different and other chemical species could be produced. In other words, currently there is the need for experimental studies in which the dose to avoid electrochemical effects is obtained for conditions equivalent to those used with nsPEFs.

It is interesting to note that Vijh (2004) points at hydrogen cavitation at the cathode as a possible cause of erosive damage to tissues in electrochemical treatments. As far as we know, this hypothetical source of damage is not mentioned by other authors in the field, which is not surprising considering the low rate at which hydrogen is generated in standard electrochemical treatments. However, with nano-second pulses of high intensity, this phenomenon appears to be more plausible because the amount of gas suddenly created is quite significant. Moreover, the gas bubbles created at the anode (O_2 and Cl_2) and the cathode (H_2) may not withstand the magnitude of the nsPEF and dielectric rupture (i.e., sparks) may occur accompanied by pressure shockwaves and flashes of light. In this case, the pressure of the shockwaves could be higher than that of those caused by the water thermal expansion phenomenon. Further research is required in this area.

18.6 Conclusion

A reliable nsPEF generator is a necessary but not sufficient prerequisite for reproducible experimentation in the field of nsPEFs delivery to biological samples. Here, our aim has been to point out the different aspects that can have a very significant impact on the experimental conditions. Our own experience tells us that those aspects can be easily overlooked, particularly by those research teams more focused on the biological aspects of nsPEFs delivery or those that come from the conventional electroporation field. Hence, this chapter should be taken as a caution message for those researchers interested in entering this field.

In this chapter, we have described first how the propagation phenomenon and particularly one of its associated phenomena, the reflection phenomenon, have a very relevant impact on the pulse field that is actually applied to the sample. Then we have explained that, up to a point, it is possible to control those reflections by matching the impedance of the exposure cell. Nevertheless, due to the uncertainties of this impedance matching process, we consider that voltage and current monitoring systems are highly advisable and we have given some indications about the use of these systems and their limitations. Furthermore, since high-voltage is a fundamental attribute of nsPEF signals, we have provided some details on the electrical breakdown phenomenon.

Finally, we have discussed two groups of side effects of the application of nsPEFs: electrochemical and thermal effects. Actually, both families of phenomena are also present in the case of conventional electroporation. The extremely short duration of the nsPEFs does not necessarily avoid the problems related to the electrochemical formation of chemical species at the electrode-sample interface. A rise

in temperature because of the Joule effect will be particularly significant if the nsPEF application comprises a train of pulses at a high repetition frequency.

The nsPEF can be an extraordinary tool for intracellular electromanipulation. The use of nsPEFs may raise many hopes in terms of the improvement of our knowledge in cell biology and cell functioning, as well as in terms of the development of new biotechnological and biomedical applications. The future will confirm these hopes or prove them wrong. In any case, only well-controlled experimental conditions will result in robust and reproducible biological effects and in their translation into interesting applications.

Acknowledgments

The work of the authors is supported by the grants of the CNRS, Institut Gustave-Roussy, Université Paris-Sud, EU 6th FP (CLINIGENE - FP6, LSH-2004-018933), INCA (Institut National of Cancer, France—contract number 07/3D1616/Doc-54-3/NG-NC), DGA/D4S/MRIS (contract number 06 34 017), and the French National Agency (ANR) through the Nanoscience and Nanotechnology Program (Nanopulsebiochip n ANR-08-NANO-024-01).

References

- Beddow AJ, Brignell JE. 1966. Nanosecond breakdown time lags in a dielectric liquid. *Electron Lett* 2: 142–143.
- Crowley JM. 1973. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys J* 13: 711–724.
- Davalos RV, Mir LM, Rubinsky B. 2005. Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann Biomed Eng* 33: 223–231.
- Deng J, Schoenbach KH, Buescher ES, Hair PS, Fox PM, Beebe SJ. 2003. The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells. *Biophys J* 84: 2709–2714.
- Diller KR, Pearce JA. 1999. Issues in modeling thermal alterations in tissues. *Ann NY Acad Sci* 888: 153–164.
- Edd JF, Horowitz L, Davalos RV, Mir LM, Rubinsky B. 2006. In vivo results of a new focal tissue ablation technique: Irreversible electroporation. *IEEE Trans Bio-Med Eng* 53: 1409–1415.
- Garon EB, Saweer D, Vernier PT, Tang T, Sun Y, Marcu L, Gundersen MA, Koeffler HP. 2007. *In vitro* and *in vivo* evaluation and a case report of intense nanosecond pulsed electric field as a local therapy for human malignancies. *Int J Cancer* 121: 675–682.
- Hall EH, Schoenbach KH, Beebe SJ. 2007. Nanosecond pulsed electric fields have differential effects on cells in the S-phase. *DNA Cell Biol* 26: 160–171.
- Kolb JF, Kono S, Schoenbach KH. 2006. Nanosecond pulsed electric field generators for the study of sub-cellular effects. *Bioelectromagnetics* 27: 172–187.
- Kotnik T, Mir LM, Fisar K, Puc M, Miklavcic D. 2001a. Cell membrane electroporation by symmetrical bipolar rectangular pulses. Part I. Increased efficiency of permeabilization. *Bioelectrochemistry* 54: 83–90.
- Kotnik T, Miklavcic D, Mir LM. 2001b. Cell membrane electroporation by symmetrical bipolar rectangular pulses. Part II. Reduced electrolytic contamination. *Bioelectrochemistry* 54: 91–95.
- Loomis-Husselbee JW, Cullen PJ, Irvine RF, Dawson AP. 1991. Electroporation can cause artefacts due to solubilization of cations from the electrode plates. Aluminum ions enhance conversion of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate into inositol 1,4,5-trisphosphate in electroporated L1210 cells. *Biochem J* 277: 883–885.
- Maor E, Ivorra A, Rubinsky B. 2008. Intravascular irreversible electroporation: Theoretical and experimental feasibility study. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008: 2051–2054.

- Nilsson E, Von Euler H, Berendson J, Thörne A, Wersäll P, Näslund I, Lagerstedt AS, Narfström K, Olsson JM. 2000. Electrochemical treatment of tumours. *Bioelectrochemistry* 51: 1–11.
- Nuccitelli R, Pliquett U, Chen X, Ford W, James Swanson R, Beebe SJ, Kolb JF, Schoenbach KH. 2006. Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 351–360.
- Pakhomov AG, Kolb JF, White JA, Joshi RP, Xiao S, Schoenbach KH. 2007. Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF). *Bioelectromagnetics* 28: 655–663.
- Saulis G, Lape R, Praneviciūte R, Mickevicius D. 2005. Changes of the solution pH due to exposure by high-voltage electric pulses. *Bioelectrochemistry* 67: 101–108.
- Schoenbach KH, Beebe SJ, Buescher ES. 2001. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses, *Bioelectromagnetics* 22: 440–448.
- Sun Y, Vernier PT, Bebrend M, Marcu L, Gundersen MA. 2005. Electrode microchamber for noninvasive perturbation of mammalian cells with nanosecond pulsed electric fields. *IEEE Trans Nanobiosci* 4: 277–283.
- AQ2 Vernier PT, Sun Y, Marcu L, Craft CM, Gundersen MA. 2004. Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation. *Biophys J* 86: 4040–4048.
- Vijh AK. 2004. Electrochemical treatment (ECT) of cancerous tumours: Necrosis involving hydrogen cavitation, chlorine bleaching, pH changes, electroosmosis. *Int J Hydrogen Energy* 29: 663–665.
- Yen Y, Li JR, Zhou BS, Rojas F, Yu J, Chou CK. 1999. Electrochemical treatment of human KB cells in vitro. *Bioelectromagnetics* 20: 34–41.

Author Queries

[AQ1] Please check the edited running head is ok.

[AQ2] Please provide in-text citation for reference Sun et al. (2005).

Article : A technique to design complex 3D lab on a chip involving multilayered fluidics, embedded thick electrodes and hard packaging—application to dielectrophoresis and electroporation of cells

G. MOTTET, J. VILLEMEJANE, L.M. MIR et B. LE PIOUFLE

JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING

20, 2010

De nos jours, les laboratoires-sur-puce (ou *lab-on-chips*, LOC) accélèrent le développement de nouvelles technologies pour pouvoir intégrer des fonctions de plus en plus complexes (fluidique, capteurs, actionneurs,...). Mais cette intégration doit outrepasser des difficultés technologiques croissantes et viser à diminuer les coûts de production de tel système. Nous proposons ici une technique pour réaliser des LOCs complexes et réutilisables, à l'aide de résine SU-8 pour la partie fluidique et de verre pour l'emballage final, tout en y intégrant des électrodes épaisses.

Cette méthode est basée sur la combinaison de deux techniques de collage de substrat. La première consiste à coller un film fin de SU-8 photosensible (procédé similaire à de la lamination). La seconde repose sur la technique standard de collage de substrat rigide couvert par une couche de SU-8. Le résultat est un LOC parfaitement transparent et incluant des structures 3D microfluidiques et des électrodes épaisses. De plus, ces microsystèmes sont réutilisables et prêts à l'emploi. Afin de valider le concept, une biopuce dédiée à l'électroporation de cellules après les avoir attrapé par diélectrophorèse a été réalisée.

Quelques résultats obtenus avec ce concept sont présentés dans le chapitre 8.

TECHNICAL NOTE

A technique to design complex 3D lab on a chip involving multilayered fluidics, embedded thick electrodes and hard packaging—application to dielectrophoresis and electroporation of cells

G Mottet¹, J Villemejeane^{1,2,3}, L M Mir^{2,3} and B Le Pioufle¹

¹ SATIE, ENS Cachan, 61av Président Wilson, 94235 Cachan cedex, France

² CNRS, UMR 8121, Institute Gustave-Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif cedex, France

³ Université Paris Sud, UMR 8121, Orsay cedex, France

E-mail: guillaume.mottet@free.fr, bruno.lepioufle@satie.ens-cachan.fr, julien.villemejeane@ens-cachan.fr and luis.mir@igr.fr

Received 24 December 2009, in final form 10 February 2010

Published 15 March 2010

Online at stacks.iop.org/JMM/20/047001

Abstract

Nowadays, lab on chips (LOCs) require the development of new technologies in order to integrate complex fluidics, sensors, actuators, etc. Such integration requires overcoming both technological bottlenecks and an increase in production cost. We propose a technique to manufacture reusable and complex LOCs made up of SU-8 resist for the fluidic structure and of glass for the hard packaging, and are compatible with the integration of thick electrodes. The method is based on the combination of two bonding technologies, both based on a wafer bonder. The first one consists of the bonding of a thin photosensitive SU-8 dry film, which is similar to lamination. The second one is the standard bonding technique which uses a hard substrate covered by an SU-8 layer. The LOCs that can be obtained by combining these two methods are transparent, and include 3D microfluidic structures and thick electrodes. Moreover, these LOCs are reusable, packaged and ready to use. In order to validate the concept, we designed an LOC devoted to cell arraying, using dielectrophoresis, as well as to cell electroporation.

 Online supplementary data available from stacks.iop.org/JMM/20/047001/mmedia

1. Introduction

In 1970s, Stephen and Angell proposed to miniaturize a gas chromatography device [1]. They integrated a miniature valve, a long spiral column and a thermal conductivity detector on a single device. This is often considered as a pioneering

work in lab-on-a-chip (LOC) fabrication. With the advent of microtechnology in the 1990s, fluidic microsystems became more complex. Manz [2] suggested to call these microsystems ‘micro total analysis systems’ (μ TAS). With the evolution and sophistication of the microsystems, the usual term became ‘LOC’.

Micro- and nanotechnologies enabled the development of miniaturization, providing hopes and new ideas in this field. Miniaturization provides better control, interaction and manipulation. At the same time, the complexity of the technology requires more and more energy, time and money. Since most LOCs are developed for a single use, due to their fragility and the difficulty or impossibility cleaning them, our objective was to make a robust and reusable LOC.

Most LOCs have to integrate complex fluidic networks (large size, with any forms, channels at different levels, etc). Moreover, a large category has to interact with biological materials that require electric or chemical effects to be handled. Finally, LOCs should involve sensing functions (electrical, electrochemical or optical) that should be integrated.

A great number of processes were developed to design LOCs. In 1990s, the first processes were inherited directly from the microelectronic technologies. These technologies were predominantly based on silicon (Si). Indeed, it is possible to structure it or dope it, respectively, to make channels or electrodes. It is also possible to seal these channels using anodic bonding or eutectic bonding. However, the use of silicon brings up several problems: too large electrical resistivity for high current applications, complexity and time-consuming processes as the Bosch process requires the use of ICP-RIE (inductively coupled plasma reactive ion etching). Glass technology is another alternative that is currently used for chip elaboration [3] which remains complicated and costly. Finally, the use of an organic polymer [4] like PDMS (polydimethylsiloxane) proved to be quite convenient for the fabrication of microchannels [5], three-dimensional (3D) microfluidic chips [6] and even LOCs [7]. PDMS structures can be obtained by micromolding technologies, but it remains difficult to make an accurate alignment with another layer or with electrodes.

Surprisingly, an advantageous solution has recently emerged from a specific photoresist dedicated to MEMS (micro-electro-mechanical systems) devices, termed SU-8 (Microchem). SU-8 is a multifunctional epoxy-based negative resist, interesting for its ability to sustain high aspect ratio and 3D structures [8]. Furthermore, it has excellent chemical resistance, high transparency, biocompatibility [9–11] and a low bonding temperature (<80 °C). All these advantages make SU-8 a good candidate to elaborate LOCs. Today, several distinct techniques based on SU-8 allow the integration of complex microfluidic networks in a microsystem. A first method to make multilevel fluidic structures is based on the patterning of successive SU-8 layers after UV exposure. To isolate each patterned SU-8 layer from following UV exposures, a metallic layer is intercalated [12]. Similarly, a second method consists of playing with the exposure dose in order to get a partial insulation [13]. Another alternative consists in using epoxy resists [14] or other materials [15] like sacrificial layers. However, all these methods have an important drawback: the development of embedded channels remains difficult or even impossible, as the developer penetrates long or curved channels with difficulty.

To overcome this drawback, an alternative approach was suggested, where channels were sealed once structured.

This technique relies on the SU-8/SU-8 bonding either by lamination or by wafer bonding. Lamination process allows an SU-8 dry film to be applied on another SU-8 layer already structured. This technique allows reliable fabrication of multilevel fluidic networks [16]. This process has multiple advantages: it is compatible with non-flat surfaces and requires a low force during the bonding that helps in limiting the flow of SU-8 in channels and thus the risk of channel clogging. Unfortunately, this technique does not allow the bonding of a hard substrate, which is highly recommended for the chip packaging (physical protection for the chip and ease in fluidic connection).

On the other hand, wafer bonding is a commonly used process that enables the bonding of hard substrates, but this requires an important external force and a very flat surface. Different reports showed the possibility of using this technique to make channels. Some used auxiliary moats to prevent channels' clogging [17], but it makes the design of the system complex and is not compatible with the insertion of electrodes. Others suggested to bond after a soft bake to avoid the flow of SU-8, but the bonding remains very sensitive to the surface roughness [18].

The idea developed in this paper is to advantageously combine the two techniques: the photosensitive SU-8 dry films bonding technique and the hard glass substrate bonding technique. Furthermore, we demonstrate how thick electrodes (>5 μm) can be integrated. This type of electrode could be essential for obtaining strong and uniform electric fields [19]. As a proof of concept, a cell biochip, devoted to cell arraying prior to electroporation, was made using this new technique.

2. Materials

Single-sided polished 2 in (1 0 0) Si wafers (250 μm thickness) and 2 in glass wafers (1 mm thickness) were used. AZ5214E and AZ developer from Clariant Corp. were involved in the liftoff process. We used the commercial SU-8 2100 or SU-8 3050 negative epoxy photoresist for spin coating (Microchem). The SU-8 dry film was from Microchem Corp.: DF 1000-20 as well as the propylen-glycol-monoether-acetate (PGMEA) was used for the developing and the remover PG was used for the removing.

3. Concept and realization

The fabrication is based on the use of EVG 501, a commercial wafer bonding machine from EVG (St. Florian am Inn, Austria). This machine allows us to squeeze the different substrates with the required force, temperature and vacuum. During the process, we use it twice: the first time to level off a layer of SU-8 and the second time to bond two layers of SU-8.

The first step is to build thin electrodes on a glass wafer by the liftoff technique. Then, we form an SU-8 mold on these thin electrodes to make thick electrodes by electrodeposition (copper electroplating from sulfuric acid solution). When the deposition is finished, the release of the mold by a hot solution of remover PG reveals the thick electrodes. After this, a first

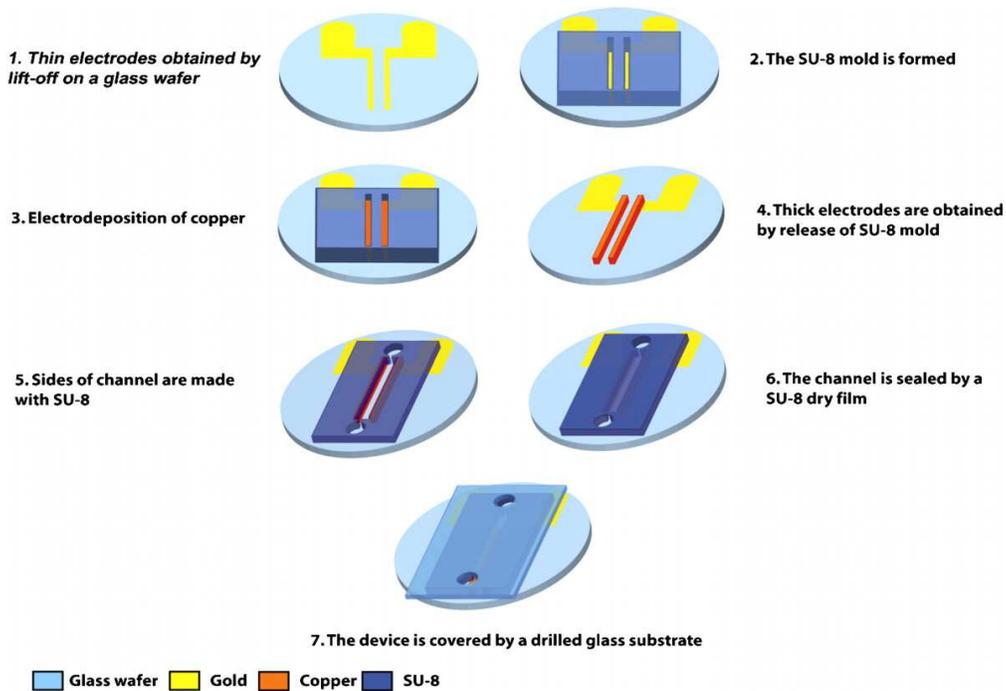


Figure 1. Fabrication process of the fluidic chips.

layer of SU-8 is deposited to structure the channels. This first layer is highly irregular due to the presence of the thick electrodes, which explains why a wafer bonder has to be used to make this layer uniform. Then, the bonding of a dry film of SU-8 is performed to close the channels. This step can be repeated to manufacture 3D interconnected channels. Finally, the LOC is sealed with a glass substrate (drilled and covered by SU-8), which permits the fluidic interconnections after PDMS blocks are stuck on the glass substrate. The details of the fabrication process are shown in figure 1.

3.1. Thin electrodes

Thin electrodes are obtained by a liftoff process for the rapidity of the process and in order to avoid metal contamination on non-metallic surfaces. The glass wafer is cleaned with a succession of acetone, ethanol and water baths. Then, the reversal photoresist AZ 5214E is spin-coated (1000 rpm for 30 s) which gives a layer of $3 \mu\text{m}$ of thickness. A prebake at 110°C is performed for 50 s to remove the solvent. Then, the resist is exposed a first time to UV light with a dose of 2 mJ cm^{-2} through an appropriate mask using a conventional EVG 620 lithographic aligner. After this, the resist is reversed via a bake at 120°C for 2 min. Next, the resist receives a flood exposure of 180 mJ cm^{-2} . Finally, the resist is developed in a solution of AZ developer mixed with water (1:1) for approximately 90 s.

The metal deposition is obtained by a sputtering system from Denton Vacuum. First, a layer of 300 nm of titanium is deposited to improve adhesion and then a second layer of

800 nm of gold. The thin electrodes are finally obtained by dipping the chip in acetone solution, due to the cap profile of the inverted resist.

3.2. Thick electrodes

The objective of our LOC is the generation of an electric field that could interact homogeneously and intensely with the cells. Therefore, thick electrodes have to be elaborated. This goal is accomplished in three steps. The first step consists of making the mold for the thick electrodes, the second step is the electrodeposition and the third step involves the release of the mold to obtain the desired thick electrodes.

The mold is composed of two layers. The first layer is a thin layer of OmnicoatTM (Microchem) which improves the adhesion of SU-8 on glass and helps to remove the mold afterward. The second layer made with SU-8 2100 gives the shape of the mold (all parameters used during the fabrication are given in table 1). To ensure that the surface is clean, the sample is exposed to O_2/CF_4 plasma at 200 W for 3 min. At this level of the process, the mold is ready for the electrodeposition.

Electrodeposition of copper was achieved by immersing the sample in an acid copper solution, then by connecting the sample to the cathode and by applying a current of $3 \times 10^{-2} \text{ A cm}^{-2}$. With this current intensity, approximately $0.8 \mu\text{m}$ of copper is electroplated per minute. Usually, plating was restricted to 10 or $15 \mu\text{m}$, but it is possible to deposit a much thicker layer ($\sim 50 \mu\text{m}$). To release the mold, the sample is plunged in a hot solution of remover PG ($\sim 80^\circ\text{C}$).

Table 1. Omnicoat, SU-8 and SU-8 dry film process parameters used in this study.

Resist	Omnicoat	SU-8 2100	SU-8 3050	SU-8 dry film
First spin acceleration (rpm s ⁻¹)	300	300	300	
First spin rotation speed (rpm)	500	500	500	
Time (s)	10	30	30	
Second spin acceleration (rpm s ⁻¹)	300	300	300	
Second spin rotation speed (rpm)	1000	5000	3000	
Time (s)	60	60	60	
Soft bake (min)	1 at 200 °C	3 at 65 °C, 13 at 95 °C	1 at 65 °C, 10 at 95 °C	
Exposure (mJ cm ⁻²)		150	200	180
Post-bake (min)		2 at 65 °C, 10 at 95 °C	1 at 65 °C, 8 at 95 °C	2 at 65 °C, 8 at 95 °C
Development in PGMEA (min)		8	5	5
Thickness (μm)	~0.02	~80	~50	20

Ultrasonic cleaning can be necessary to remove all the SU-8. Finally, the microsystem has both thin electrodes and thick electrodes.

3.3. Buried electrodes and first-layer channel

To obtain a flat layer, despite the strong structuration caused by the presence of thick electrodes, we developed a new technique to smooth the surface. This technique, which removes the large roughness (see figure 3(a)), consists of a spin of SU-8 3050 and its squeezing in a commercial wafer bonder (EVG 501).

The process begins with a dehydrating treatment on a hot plate at 200 °C for approximately 30 min. This step is very important as SU-8 is hydrophobic. Also, a thin layer of water in the wafer would increase the stress and consequently decrease the adhesion. After this, the SU-8 is deposited and baked to remove the solvent (see table 1). At this time, the surface level varies largely. In order to remove these level variations, the sample is squeezed in the wafer bonder with a force of 700 N at 70 °C. To protect the wafer bonder from SU-8 flow, a PET (polyethylene terephthalate) film is inserted between the sample and the piston (this film is removed after the squeezing). Finally, the sample is exposed to UV (in order to structure the channels), baked and developed. After this step, the microsystem consists of the thick electrodes and the sides of the channels. One can note that this technique can be used to limit the edge effects after a spin coating.

3.4. SU-8 dry film bonding

In order to close the channels, a technique similar to the one developed by Abgrall *et al* [16] is applied. Its principle is based on the bonding of an SU-8 dry film on a structured SU-8 layer. The SU-8 dry film (20 μm) is sandwiched between two PET protective films. To use it, one PET layer is peeled off to enable the contact between the SU-8 and the SU-8 layer of the device. Then, oxygen plasma is applied on the sample to improve the adhesion between SU-8 layers (200 W, 3 min). The dry film (SU-8+one PET layer) is then pressed on the sample by the wafer bonder with a force between 200 and 300 N at 65 °C. After this, the chip is perfectly covered by the SU-8 dry film. To finalize the bonding and structure the inlets and the outlets, we expose the SU-8 dry film to UV

light and then bake it. Until the step of baking, it is important to maintain the second PET protective layer because if it is removed before, the SU-8 will not strongly stick to the surface and could tear. After baking, the second PET film is peeled off to enable the development of the added SU-8 layer (see table 1). To achieve a multilevel channel network, this process has to be repeated as many times as necessary.

3.5. Hard glass substrate bonding

The hard glass substrate bonding is necessary in order to strengthen the packaging and create the external fluidic connections (SU-8 dry film is too thin and fragile). The glass substrate is drilled for the inlet and the outlet, dehydrated and a layer of SU-8 3050 is spun on it with the same parameters as those previously used (see table 1). During this step, the facts that SU-8 is a very viscous resist and the holes are very small (1 mm diameter) enable to cover well the glass substrate (without the problem of uniformity, except at the edges where homogeneity can be simply imposed by using the wafer bonder; see section 3.3). After spinning and baking, we simply remove the SU-8 covering the holes with a drill. At the end, a glass with holes covered by a uniform layer of SU-8 is obtained. An O₂ plasma is used on the microsystem (200 W, 3 min) in order to improve the adhesion between it and the SU-8 layer. Then, the hard glass substrate with SU-8 and the microsystem are kept in contact and squeezed together by a wafer bonder (650–750 N at 65 °C). Due to the fact that the substrate is hard, the force necessary is higher than for an SU-8 dry film. Finally, the whole setup is exposed to UV light and baked to cross-link the last layer.

3.6. Electrical and fluidic connections

To transform the microsystem into an LOC, electric wires are simply welded to the electrodes. For the fluidic connection, PDMS blocks are prepared and drilled to accept the insertion of micro-capillaries. Then, the microsystem and the PDMS blocks are exposed to oxygen plasma (30 W, 30 s). The PDMS block and the microsystem are assembled to achieve the bonding. The LOC is now ready to be connected with an electric generator, a syringe pump, etc.

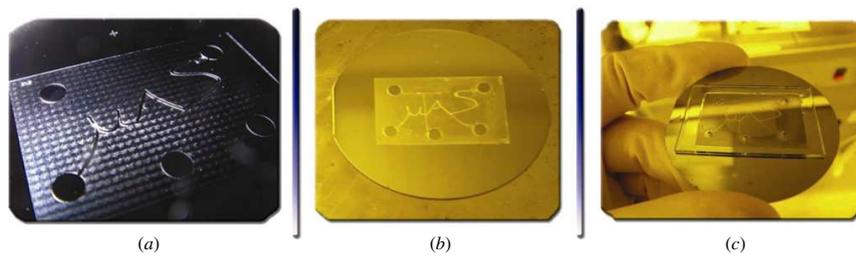


Figure 2. Fabrication steps of the multilevel fluidic system. (a) First microfluidic level with the channel 'μAS'. (b) Second level with the channel 'T'. (c) Third bonding of a glass substrate.

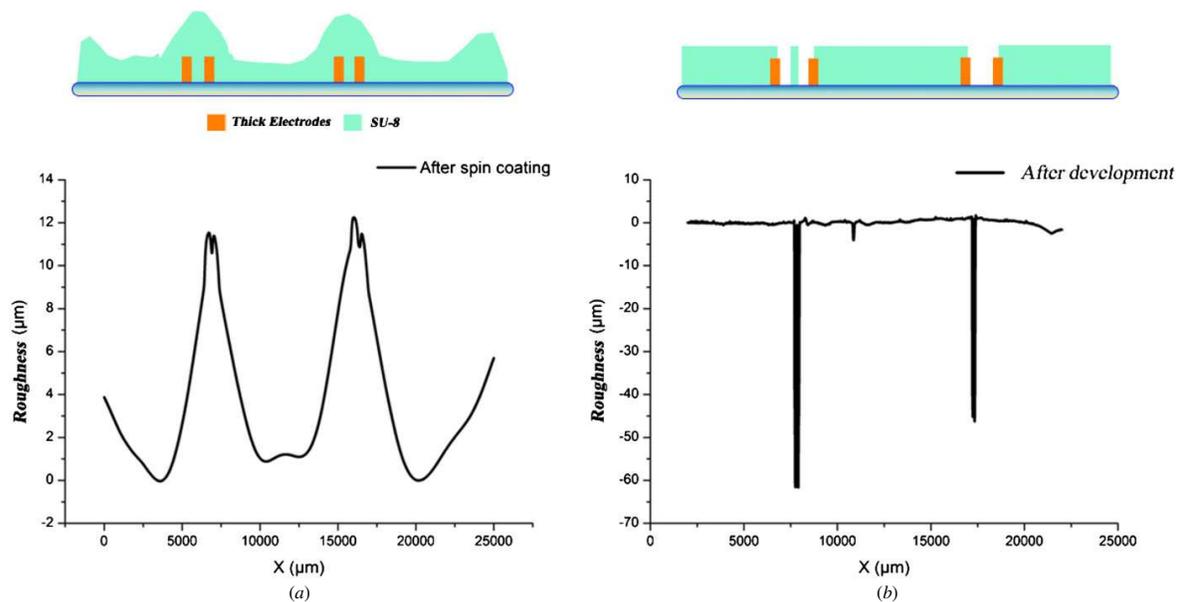


Figure 3. Mechanical profilometer measures of the SU-8 surface just after spinning (a) and at the end of the process (insulation, post-bake and development) (b). At the top, schematic views of the different phenomena.

4. Results and discussion

To demonstrate the efficiency of our process, two devices were manufactured: the first was a multilevel microfluidic system and the second a bio-LOC with thick electrodes.

4.1. Fabrication of the demonstrators

4.1.1. Fabrication process of a multilevel microfluidic system.

This device shows the possibility of using SU-8 dry films and wafer bonding to make multilevel microchannels networks. In this process, five SU-8 dry films were used. The first layer enabled defining the shape of the first channel which corresponds to the letters 'μAS'. The second and the third layers were bonded to seal the first channel and consolidate it. The fourth layer structured the second channel in the shape of a 'T'. Finally, the last layer sealed the whole structure. A drilled glass substrate was bonded to connect it with outside. Figure 2 displays the different fabrication steps. As shown in figure 2(c), the glass substrate does not totally cover the device.

This is not really a problem because channels were already sealed with an SU-8 dry film. A bonding was considered good enough if the inlet and the outlet were correctly bonded, which was mostly the case. Lastly, during the sealing of the channel with an SU-8 dry film, the uncross-linked SU-8 could flow at the beginning of the channel. To remove this uncross-linked SU-8, the sample was inserted in a low-power ultrasonic generator for 5 s. Normally, if the protocol is followed, there is no problem of leakage.

4.1.2. Bio-LOC with thick electrodes.

This second demonstrator of our technology targeted a biological application of LOCs, namely a biochip devoted to cell placement at precise locations and cell treatment by means of electric fields. This LOC consisted of channels, thick electrodes and dielectric structures to focus on the electric fields. A bottleneck that could be overcome due to the technique presented in this paper was the capability to get thick electrodes buried in thick SU-8 (channel), while keeping the capability to seal the whole system with a glass substrate.

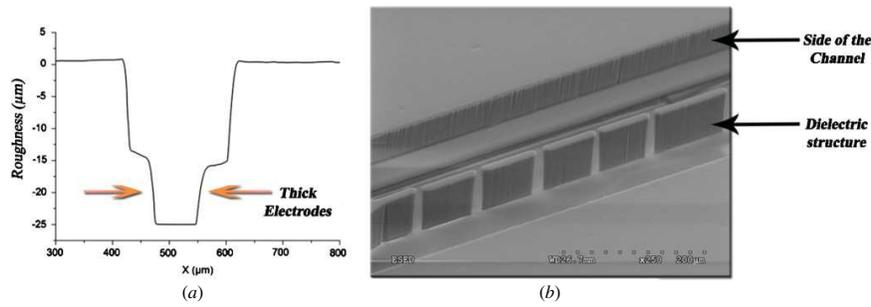


Figure 4. Integration of thick electrodes and dielectric structures in the channel. (a) Mechanical profilometer measures of a channel. (b) SEM image of a channel within its center dielectric structures (SU-8).

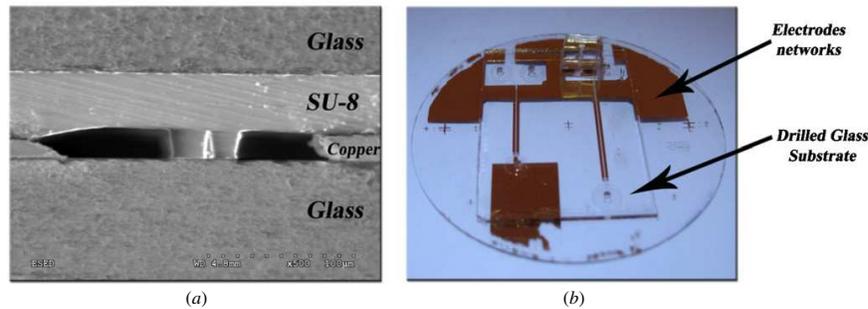


Figure 5. Images of the complete device. (a) SEM image of a cross section. (b) Overview of the sample.

Indeed, a smooth SU-8 surface (see figures 3(b), 4(a) and (b)) was obtained, allowing compatibility with further packaging steps (sealing with an SU-8 dry film and a glass substrate). A cross section of the complete device is shown in figure 5(a) and an overview is presented in figure 5(b).

4.2. Hydraulic and biological tests on the demonstrators

4.2.1. Hydraulic tests on the multilevel microfluidic system. Our demonstrator device has two levels: a first level where the channel forms the letters ‘μAS’ and a second level with the letter T. Two fluorescent molecules (DCM (4-dicyanomethylene-2-methyl-6-p-dimethylaminostyryl-4H-pyran) and eosine) were, respectively, injected in these two levels in order to test the functionality of the microfluidic chip. Flowing of the two markers, without any cross-contamination, was clearly demonstrated by fluorescence observations (figures 6(a) and (b)). These tests validated our technology from a hydraulic point of view.

4.2.2. Biological tests on the bio-LOC. The LOC was designed in order to optimize the electric field needed to establish a convenient interaction with the cells. Thick electrodes and dielectric structures were integrated into the device. The bio-LOC had two purposes: cell placement by dielectrophoresis and cell electroporation.

A non-uniform alternating electric field can be used to handle a neutral particle, like a cell, in a liquid. This phenomenon is the consequence of the dielectrophoresis (DEP) force [20, 21]. Depending on the frequency, the particle

will move toward maxima of the electric field (positive DEP) or toward minima of the electric field (negative DEP). If the cell is approximated to a spherical dielectric with losses, the average dielectrophoresis force is expressed as

$$\langle F_{DEP}(t) \rangle = 2\pi \epsilon_m r^3 Re[K(w)] \cdot \nabla E_{eff}^2$$

where r is the radius of the cell, E symbolizes the electric field and K is called the criterion of Clausius–Mossotti which is given by

$$K(w) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*}$$

Here, ϵ_p^* is the complex permittivity of the particle and ϵ_m^* is the complex permittivity of the surrounding liquid. The orientation of the force depends on the sign of the criterion of Clausius–Mossotti which is linked to the frequency. For our experiments, either a high frequency (>100 kHz), which forced the cells to move toward the maxima of the field (figure 7(b)), or inversely, a low frequency (<10 kHz), which forced the cells to move toward the minima of the field (figure 7(b)), was applied. The consequences of the application of a high- and a low-frequency signal on the B16 cells are shown in figure 7, see also videos 1 and 2, available at stacks.iop.org/JMM/20/047001/mmedia.

The second objective of the bio-LOC was to electroporate the membrane of the cells which had been previously arrayed due to DEP. This point was checked using a fluorescent dye (calcein) introduced inside the cell before the experiment. This molecule can be externalized only from the cell, if the cell membrane is permeabilized.

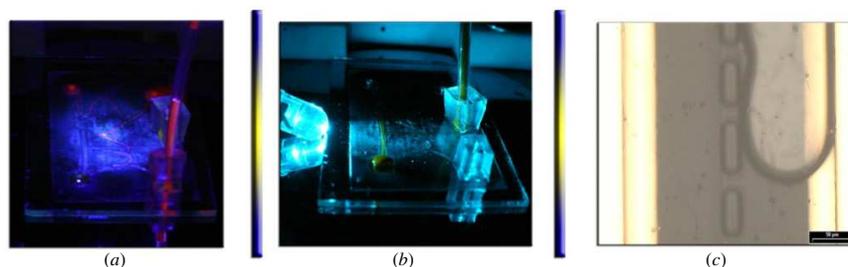


Figure 6. Hydraulic tests. (a) Injection of the DCM marker (fluorescence emission 620 nm) in the channel 'μAS'. (b) Injection of eosine marker (fluorescence emission at 555 nm) in the channel 'T'. (c) A bubble in the channel of the bio-LOC filled with water.

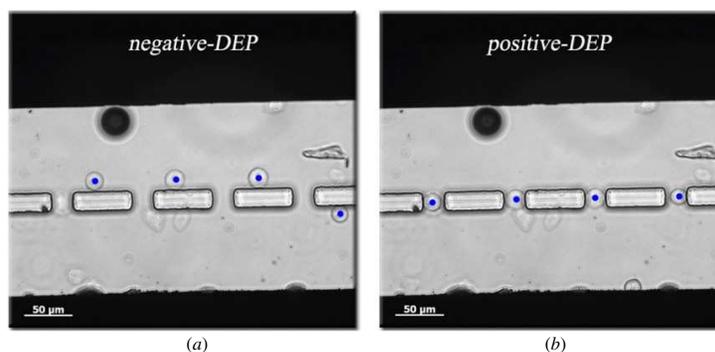


Figure 7. Dielectrophoresis experiment on B16 cells (we put blue points on cells to make them visible). (a) Negative dielectrophoresis on four cells (10 kHz, 10 Vpp). (b) Positive dielectrophoresis on the same four cells (1 MHz, 10 Vpp).

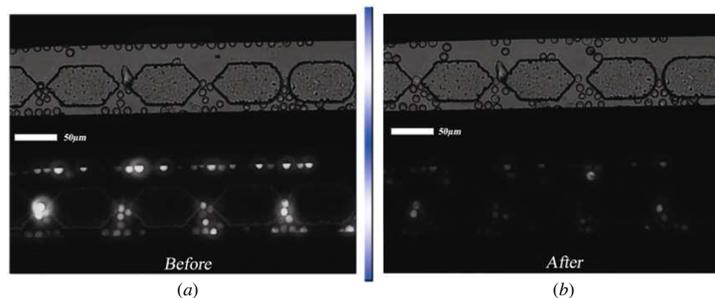


Figure 8. Electroporation experiment on DC3F cells. (a) Just before the electroporation (top: visible image; bottom: fluorescence image). (b) 5 min after two pulses (25 V, 80 μs), the fluorescence decreases drastically.

Figure 8 shows that after the application of cell permeabilizing electric pulses, the cells fluorescence decreases due to the leakage of calceine, demonstrating the proper functioning of our bio-LOC (see also videos 3 and 4, available at stacks.iop.org/JMM/20/047001/mmedia). During our tests, the importance of a good cleaning after the end of the experiment to preserve the LOC from obstruction was noted. Indeed, during biological experiments, a lot of cellular debris could clog the channels. To eliminate existing or potential clogging, the microfluidic system was cleaned with bleach, isopropanol and *deionized* water. This cleaning with corrosive products allowed us to reuse the microsystem until very big dust definitively clogged the microchannels.

5. Conclusions

A new, simple and efficient technique which enables the microfabrication of complex 3D microfluidic structures, involving multilevel fluidics, thin or thick electrodes, and the hard packaging with glass is proposed in this paper. In order to prove the feasibility of the method, two demonstrators have been elaborated: a 3D multilevel fluidic demonstrator which showed the functionality of flowing fluids at each level without leakages and a bio-LOC capable of handling and treating cells with the electrical field applied between thick electrodes embedded in the channel.

Acknowledgments

This work has been financially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), IGR, the French National Agency (ANR) through Nanoscience and Nanotechnology Program (nanopulsebiochip no ANR-08-NANO-024) and the PRES Universud. The devices were made in the clean room CTU MINERVE of IEF from the university Paris XI Orsay. The authors would like to thank V Mathet and D Bouville for their help in the clean room and V Joubert for her help in biology experiments. Finally, the authors thank M Maire, J Duquennoy and L Malaquin for proofreading.

References

- [1] Stephen T and Angell J 1979 A gas chromatographic air analyzer fabricated *IEEE Trans. Electron Devices* **12** 1880–6
- [2] Manz A, Graber N and Widmer H M 1990 Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing *Sensors Actuators B* **1** 244–8
- [3] Harrison D J, Fluri K, Seiler K, Fan Z, Effenhauser C S and Manz A 1993 Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip *Science* **261** 895–7
- [4] Becker H and Locascio L E 2002 Polymer microfluidic devices *Talanta* **56** 267–87
- [5] Duffy D C, McDonald J C, Schueller O J A and Whitesides G M 1998 Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) *Anal. Chem.* **70** 4974–84
- [6] Anderson J R, Chiu D T, Jackman R J, Cherniavskaya O, McDonald J C, Wu H, Whitesides S H and Whitesides G M 2000 Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping *Anal. Chem.* **72** 3158–64
- [7] Park S W, Lee J H, Yoon H C, Kim B W, Sim S J, Chae H and Yang S S 2008 Fabrication and testing of a PDMS multi-stacked hand-operated LOC for use in portable immunosensing systems *Biomed. Microdevices* **10** 859–68
- [8] del Campo A and Greiner C 2007 SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography *J. Micromech. Microeng.* **17** R81–95
- [9] Kotzara G, Freasa M, Abelb P, Fleischmanc A, Royc S, Zormand C, Morane J M and Melzak J 2002 Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices *Biomaterials* **23** 2737–50
- [10] Lu H, Cho S H, Lee J B, Romero-Ortega M, Cautler L and Hughes G 2006 SU8-based micro neural probe for enhanced chronic *in-vivo* recording of spike signals from regenerated axons *Proc. 5th IEEE Sensors Conf. (Daegu, South Korea: IEEE)*
- [11] Voskericiana G, Shivea M S, Shawgoc R S, von Recumd H, Andersona J M, Cimac M J and Langere R 2003 Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices *Biomaterials* **24** 1959–67
- [12] Alderman B E J, Mann C M, Steenson D P and Chamberlain J M 2001 Microfabrication of channels using an embedded mask in negative resist *J. Micromech. Microeng.* **11** 703–5
- [13] Chuang Y J, Tseng F G, Cheng J H and Lin W K 2003 A novel fabrication method of embedded micro-channels by using SU-8 thick-film photoresists *Sensors Actuators A* **103** 64–9
- [14] Ling Z and Lian K 2007 *In situ* fabrication of SU-8 movable parts by using PAG-diluted SU-8 as the sacrificial layer *Microsyst. Technol.* **13** 253–7
- [15] Metz S, Jiguet S, Bertsch A and Renaud P 2004 Polyimide and SU-8 microfluidic devices manufactured by heat-depolymerizable sacrificial material technique *Lab on a Chip* **4** 114–20
- [16] Abgrall P, Lattes C, Conedera V, Dollat X, Colin S and Gué A M 2006 A novel fabrication method of flexible and monolithic 3D microfluidic structures using lamination of SU-8 films *J. Micromech. Microeng.* **16** 113–21
- [17] Tuomikoski S and Franssila S 2005 Free-standing SU-8 microfluidic chips by adhesive bonding and release etching *Sensors Actuators A* **120** 408–15
- [18] Blanco F J, Agirregabiria M, Garcia J, Berganzo J, Tijero M, Arroyo M T, Ruano J M, Aramburu I and Mayora K 2004 Novel three-dimensional embedded SU-8 microchannels fabricated using a low temperature full wafer adhesive bonding *J. Micromech. Microeng.* **14** 1047–56
- [19] Ju J, Ko J-M, Cha H-C, Park J Y, Im C-H and Lee S-H 2009 An electrofusion chip with a cell delivery system driven by surface tension *J. Micromech. Microeng.* **19**
- [20] Pohl H A 1951 The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields *J. Appl. Phys.* **22** 869–71
- [21] Zimmermann U and Neil G A 1996 *Electromanipulation of Cells* (Boca Raton, FL: CRC Press)

Liste des communications et publications

Publications

Villemejjane J, Mir LM (2009). Physical methods of nucleic acids transfer : general concept and applications. *Br. J. Pharmacol.* **157** (2) : 207-19.

Mottet G, Villemejjane J, Mir LM, Le Pioufle B (2010). A technique to design complex 3D lab on a chip involving multilayered fluidics, embedded thick electrodes and hard packaging—application to dielectrophoresis and electroporation of cells. *J. Micromec. Microeng.* **20**. doi : 10.1088/0960-1317/20/4/047001.

Silve A, Villemejjane J, Joubert V, Ivorra A, Mir LM (2010). Nanosecond pulsed electric field delivery to biological samples : difficulties and potential solutions. In : *Advanced electroporation Techniques in Biology and Medicine*. AG Pakhomov, D Miklavcic, MS Markov, eds CRC Press. In press.

Communications avec acte (DOI)

Villemejjane J, Mottet G, Français O, Lefèvre JP, Woytasik M, Dufour-Gergam E, Mir LM, Le Pioufle B (2010). Nanomanipulation of living cells on a chip using electric field : general concepts and microdevices. *5th IEEE International Symposium on Electronic Design, Test and Applications*. DELTA 2010, Ho Chi Minh City, Vietnam, 13-15 January. doi : 10.1109/DELTA.2010.26.

Communications avec acte

Villemejjane J, Joubert V, Cima L, Packan D, Laux C, Mir LM (2007). Electrical characterization of electroporation cuvettes used for the application of nanosecond electric pulses on cells. *Electroporation Based Technologies and Treatments Workshop*, Ljubljana, Slovenia, 11-17 November.

Joubert V, Villemejjane J, Packan D, Laux C, Mir LM (2007). Enhancement of gene expression by nanosecond electric pulses. *Electroporation Based Technologies and Treatments Workshop*, Ljubljana, Slovenia, 11-17 November.

Joubert V, Villemejjane J, Packan D, Laux C, Mir LM (2008). Enhancement of gene expression by nanosecond electric pulses. *2nd Clinigene Anniversary meeting*, Annecy, France, 3-6 April.

Joubert V, Villemejjane J, Mir LM (2008). Enhancement of gene expression by nanosecond electric pulses. *11th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, Boston, MA, USA, 28 May-1 June.

Mir LM, Joubert V, Villemejjane J, Silve A (2008). Nanosecond electric pulses-induced enhancement of reporter gene expression after electrotransfer (in vitro and in vivo). *16th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy*, Brugge, Belgium, 13-16 November.

Joubert V, Villemejjane J, Mir LM (2008). Enhancement of the expression of reporter genes electrotransferred in cells in culture by nanosecond electric pulses. *16th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy*, Brugge, Belgium, 13-16 November.

Villemejjane J, Mottet G, Français O, Lefèvre JP, Mir LM, Le Pioufle B (2008). Insulated liquid

electrodes in a microfluidic chip for the electroporation of living cells. *1st European Conference on Microfluidics*, Bologna, Italy, 10-12 December.

Mottet G., Villemejjane J, Le Pioufle B (2008). A complete process to make a lab on a chip with complex fluidics and thick electrodes for biological applications. *1st European Conference on Microfluidics*, Bologna, Italy, 10-12 December.

Villemejjane J, Joubert V, Mir LM (2009). Nanosecond electric pulses-induced enhancement of reporter gene expression after electrotransfer in skeletal muscle in vivo. *20th International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Sibiu, Romania, 10-14 May.

Joubert V, Villemejjane J, Mir LM (2009). Enhancement of the expression of genes electrotransferred in cells in culture and in skeletal muscle by nanosecond electric pulses. *12th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy*, San Diego, CA, USA, 27-30 May.

Joubert V, Villemejjane J, Mir LM (2009). Enhancement of the expression of genes electrotransferred in cells in culture and in skeletal muscle by nanosecond electric pulses. *Joint Meeting of the Bioelectromagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association – BioEM 2009*, Davos, Switzerland, 14-19 June.

Villemejjane J, Joubert V, Français O, Le Pioufle B, Mir LM (2009). Nanosecond electric pulses-induced enhancement of reporter gene expression after electrotransfer in skeletal muscle in vivo. *Int. Bioelectric Symposium*, Columbia, MO, USA, 25-26 June.

Français O, Ayina A, Villemejjane J, Rousseau L, Mir LM, Le Pioufle B (2009). High density cell microarray based on dielectrophoresis traps induced by a matrix of singularities. *MicroTAS09*, Jeju, Korea, 28-31 October.

Communications sans acte

Villemejjane J, Joubert V, Mir LM (2008). Electrical characterization of electroporation cuvettes used for the application of nanosecond electric pulses on cells. *Gordon Research Conference, Bioelectrochemistry*, Biddeford, ME, USA, 20-25 July.

Joubert V, Villemejjane J, Mir LM (2008). Enhancement of reporter genes activity by nanosecond electric pulses. *Gordon Research Conference, Bioelectrochemistry*, Biddeford, ME, USA, 20-25 July.

Villemejjane J, Mottet G, Français O, Lefèvre JP, Mir LM, Le Pioufle B (2008). Insulated liquid electrodes in a microfluidic chip for the electroporation of living cells. *NAMIS Autumn School*, University of Tokyo, Tokyo, Japan, 28 September-4 October.

Villemejjane J, Joubert V, Français O, Le Pioufle B, Mir LM (2008). Insulated liquid electrodes in a microfluidic chip for the electroporation of living cells. *Seme Colloque Cancéropôle IDF*, Paris, France, 15-17 December.

Villemejjane J, Joubert V, Français O, Le Pioufle B, Mir LM (2009). A new method to apply nanosecond pulsed electric field in vitro and in vivo. *2nd Clinigene Training Course*, Barcelona, Spain, 22-23

January.

Villemejjane J, Mottet G, Français O, Lefèvre JP, Mir LM, Le Pioufle B (2009). Insulated liquid electrodes in a microfluidic chip for the nanomanipulation of living cells. *44th Winter Seminar*, Klosters, Switzerland, 25-31 January.

Villemejjane J, Mottet G, Français O, Lefèvre JP, Mir LM, Le Pioufle B (2009). Insulated liquid electrodes in a microfluidic chip for the nanomanipulation of living cells. *1st International Conference NEBO*, Cachan, France, 28 March-1 April.

Villemejjane J, Français O, Le Pioufle B, Mir LM (2009). Insulated liquid electrodes in a microfluidic chip for the nanomanipulation of living cells. *International Spring School – Biophysics and Bioelectrochemistry for Medicine*, Cisnadioara, Romania, 6-9 May.

Villemejjane J, Français O, Lefèvre JP, Woytasik M, Dufour-Gergam E, Mir LM, Le Pioufle B (2009). Microfluidic biochip for nanopulses exposure of cells and the real-time observation : design and prototypes. *NAMIS Autumn School*, LAAS, Toulouse, France, 14-19 September.



FIN

Résumé

ETUDE DES EFFETS D'IMPULSIONS ÉLECTRIQUES ULTRA-COURTES SUR DES CELLULES VIVANTES Mise au point de nouveaux outils, développement théorique et premières applications *in vivo*

La perméabilisation cellulaire par l'intermédiaire de champs électriques est une des méthodes les plus sûres pour le transfert de gènes et de molécules d'intérêt. La découverte des effets intra-cellulaires d'un nouveau type d'impulsions électriques - les nanopulses - a ouvert de nouvelles perspectives à l'application des impulsions électriques au vivant. La mise au point de nouveaux outils est indispensable avant de pouvoir appliquer ces techniques à l'homme. Aussi, notre but a été de mettre au point des systèmes d'exposition de cellules à ces impulsions et de montrer que de nouvelles applications thérapeutiques étaient possibles, en particulier en cancérologie.

Une nouvelle méthode d'exposition de cellules ou de tissus basée sur l'utilisation d'électrodes isolées a été proposée permettant d'éviter tout risque de contamination ou brûlure électrochimique. A l'aide de cette nouvelle méthode, des expériences *in vitro* puis *in vivo* ont pu être menées et confirment la possibilité d'augmenter d'un facteur 3 à 6 la production de luciférase après un électrotransfert de ce gène. Enfin, l'exposition de tumeurs à ces impulsions en présence de bléomycine a permis d'obtenir des régressions tumorales complètes. Nous avons aussi conçu un biomicrosystème permettant d'étudier les effets de telles impulsions à l'échelle cellulaire sous microscope s'intégrant comme terminaison adaptée dans la chaîne d'exposition. L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse montre qu'il est possible d'envisager l'utilisation de ces impulsions comme nouvel outil thérapeutique dans le traitement de cancers ou en thérapie génique.

Mots clefs : *électroperméabilisation, électrotransfert de gènes, électrochimiothérapie, impulsions nanoseconde, laboratoire-sur-puce, microfluidique.*

Abstract

STUDY OF THE EFFECTS OF NANOSECOND PULSED ELECTRIC FIELDS ON LIVING CELLS Development of new tools, theoretical study and first *in vivo* applications

Electropermeabilization is a safe and routinely used method to transfer genes or drugs in cells or tissues. Recent studies on intra-cellular effects of nanosecond pulsed electric fields opened new ways for cell manipulation. But before thinking to clinical applications, the development of new tools is necessary. In this context, we developed new exposition devices to ultra-short pulses and we showed potential therapeutic applications, especially for cancer treatment.

A new concept based on insulated electrodes was proposed to avoid any electrochemical contamination or burn of cells or tissues. The implementation of such method for *in vitro* and *in vivo* experiments permitted to increase the efficiency of luciferase production after conventionnal electrogenetransfer. Finally, the combination of bleomycin with nanosecond pulses gave complete tumor regressions. A biochip for the real-time observation of exposed cells under a microscope was also realized and included as the end element of the pulse transmission line. All the results presented in this thesis showed that it is possible to consider the use of such ultra-short pulsed electric fields as a new therapeutic tool for cancer treatment and gene therapy.

Keywords : *electropermeabilization, electrogenetransfer, electrochemotherapy, nanoseconds pulsed electric fields, lab-on-a-chip, microfluidics.*