HAL
open science

Caractérisation électrocinétique de cellules humaines

Clarisse Benoit

To cite this version:

Clarisse Benoit. Caractérisation électrocinétique de cellules humaines. Physique [physics]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAY029 . tel-01232396

HAL Id: tel-01232396

https://theses.hal.science/tel-01232396

Submitted on 23 Nov 2015

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 7 Août 2006

Présentée par

Clarisse BENOIT

Thèse dirigée par **David PEYRADE**

préparée au sein **du Laboratoire des Technologies de la Microélectronique**
et de **l'École Doctorale de Physique**

Caractérisation Électrocinétique de cellules humaines

Thèse soutenue publiquement le **16 Septembre 2015**,
devant le jury composé de :

DELABOUGLISE Didier
Grenoble-INP, Président
FERRIGNO Rosaria
UCBL, Rapporteur
RENAUD Philippe
EPFL, Rapporteur
CHARLOT Benoît
IES, Examinateur
GIDROL Xavier
CEA/iRSTV/Biomics, Examinateur
David Peyrade
LTM, Directeur de thèse
Thibault Honegger
LTM, Co-Encadrant

Remerciements

Je souhaiterais premièrement remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et pour leurs questions pertinentes le jour de la soutenance : Rosaria FERRIGNO, Philippe RENAUD, Benoît CHARLOT, Xavier GIDROL et M. le Président du Jury Didier DELABOUGLISE.

Après trois ans et demi au laboratoire des Technologies de la Microélectronique, mon travail touche à sa fin. L'équipe des Micro- et Nanotechnologies pour la Santé est une équipe un peu atypique au sein d'un laboratoire développant de nouveaux procédés technologiques pour la microélectronique. Le but de cette équipe s'éloigne des thématiques principales du laboratoire, en exploitant les moyens techniques de pointe à disposition sur le centre pour développer des technologies dans des axes parallèles (optique, structures colloïdales, santé). Cette synergie entre les domaines de recherche implique que chaque membre de l'équipe navigue entre plusieurs disciplines, à l'interface entre la technologie, la physique et la biologie. Cette pluridisciplinarité se retrouve tout à fait dans cette thèse, tout comme dans les salles d'expérimentation où la matière biologique côtoie aussi bien des nanoparticules que des prototypes électroniques.

Cette atmosphère si particulière a été instaurée par David Peyrade, et enrichie au cours des années par le passage de nombreux étudiants. Je tiens donc à remercier David de m'avoir permis de rejoindre l'équipe pour une thèse, qui s'est avérée formatrice dans des domaines variés. L'ouverture à de nouvelles thématiques lorsque l'on vient d'un cursus de biologiste et l'apprentissage de telles compétences ne s'est pas fait sans mal et sans travail. De nombreuses personnes sont donc à remercier pour l'aide qu'elles m'ont apportée tout au long de la thèse.

Tout d'abord, je remercie Olivier Joubert, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, ainsi que Jumana Boussey, directrice adjointe, qui a toujours été d'une grande aide, notamment pour les déplacements lors de conférences. L'équipe entière du secrétariat est aussi à remercier, pour sa disponibilité permanente au cours des (nombreuses !) procédures administratives : Stéphanie, Céline, Sylvaine et Malou !

Je souhaite adresser un remerciement particulier à mon encadrant, Thibault Honegger, qui m'a formée à la diélectrophorèse lorsque je suis arrivée en stage, et à de nombreuses autres facettes de la recherche tout au long de ces trois ans. Son dynamisme et sa pertinence scientifique ont grandement participé à la valorisation de ce travail.

Je remercie chaleureusement aussi les membres de l'équipe (de choc !). Merci à Julien, nous nous sommes suivis pendant les hauts et les bas de nos thèses, et sa bonne humeur et sa créativité ont allégé les longues journées d'expérimentation à Nanos. Merci à Kévin également, toujours présent et enjoué, et prodigue de bons conseils. Merci aux étudiants que j'ai pu avoir en stage, pour l'enseignement que cela apporte : Félix, et Antoine pour sa vivacité et son enthousiasme permanents. L'équipe s'est bien étoffée pendant mes derniers mois au laboratoire ; merci à Benoît pour son entrain quotidien, Olivier pour nos discussions variées autour des cafés, et à Timothée pour sa sympathie. Le flambeau est donné à Anthony et Tiphaine pour les prochaines thèses !

Je souhaite également remercier d'autres membres du laboratoire avec qui j'ai pu interagir : Alice Nicolas, pour nos discussions toujours enrichissantes et très "bio", ce qui aura été plus qu'appé-

ciable dans un environnement où la biologie cellulaire est plutôt marginale, Michel Moussus et Sophie Böhme pour nos fréquentes interactions professionnelles ou personnelles, Hélène, toujours avec le sourire, Marc Zelsmann et David Fuard. Ainsi que des membres du laboratoire Sinaps : Emmanuel Picard pour son expertise technique, Claude Renaut et Christophe Pin, pour leur aide dans le domaine de l'optique et nos échanges animés.

Ces travaux n'auraient pas pu être réalisés sans la collaboration étroite avec le laboratoire Biomics, qui m'a ouvert ses portes et donné une autonomie totale pour la culture cellulaire. Merci à Xavier Gidrol pour m'avoir fait confiance et accueillie dans ses locaux, Éric Sulpice pour son aide pour les transfections et ses remarques constructives, Patricia Obeid pour les tests myco, et Frédérique Kermarrec pour sa disponibilité, pour tous les conseils qu'elle m'a apportés et les nombreux échantillons qu'elle m'aura préparés. Merci également à Jérôme Prouvée, du laboratoire Dacle, pour m'avoir laissé l'accès à la plateforme haute-fréquence.

Un grand merci à tous mes amis, qui ont chacun influé sur ma vie au quotidien. Merci à Selma, que j'ai connue en Master. Avec une thèse aux particularités similaires (malgré la divergence de nos sujets), et son bureau à deux étages de la salle d'expérimentation, nous nous sommes suivies de près, jusqu'à nous marier (par hasard) le même jour ! Heureuse coïncidence, mais ces trois ans n'auraient pas été les mêmes sans son humour débordant pour égayer les semaines. Merci à Joséphine et Mélina, toujours présentes pour les midis-filles. Je remercie également Emma, mon amie de toujours, pour son soutien et sa présence au jour le jour malgré la distance, et à Kamel, pour tous nos moments de complicité et de rires. Je tiens aussi à remercier Thierry, pour sa patience à me guider à travers des notions de mathématiques qui me faisaient tant défaut au début, et pour nos longues discussions Skype. Je remercie enfin mes amies d'école, Jess, Aline, Marie-Sophie, Alex et Christelle, pour notre grande amitié depuis le lycée, et Idalie, qui est restée à mes côtés depuis le collège.

Pour terminer, je tiens à remercier ma famille, et plus particulièrement mes parents, même si mon père n'est plus là aujourd'hui, pour m'avoir permis d'atteindre ce niveau d'études. Merci à ma mère de n'avoir jamais douté de moi. Merci à mes frères Cyrille et Pep, pour leur fierté vis-à-vis de leur petite sœur, et à ma belle-sœur Alex, qui m'a vue grandir et m'épanouir. Je remercie également toute ma belle famille : Coline et Manon, mes sœurs de cœur, Thomas et Valérie, mon beau-père Thierry, pour m'avoir toujours entourée. Je ne peux citer tout le monde ici sans dresser une longue liste, mais leur intérêt pour mon travail m'a apporté la satisfaction d'avoir fait le bon choix et le courage de continuer dans les moments difficiles.

Enfin, merci à mon mari Nicolas, de m'avoir supportée, et de n'avoir jamais fléchi. Il a su me (re)donner confiance en moi, et sa présence dans les meilleurs comme les pires moments aura été un soutien inestimable.

Table des matières

Remerciements **i**

Introduction **1**

1 Etat de l'art **3**
1.1 Méthodes de caractérisation des propriétés intrinsèques des cellules 4
1.1.1 Morphologie 5
1.1.2 Susceptibilité magnétique 7
1.1.3 Propriétés optiques 7
1.1.4 Propriétés électrocinétiques 8
1.2 Théorie de l'électrocinétique de cellules humaines dans un champ non uniforme alternatif 8
1.2.1 Forces électro-hydrodynamiques 8
1.2.2 Forces spécifiques sur la cellule 11
1.2.3 Diélectrophorèse 11
1.2.4 Facteur de Clausius-Mossotti 14
1.2.5 Mesure de la capacité électrique de la membrane 16
1.3 Etat de l'art des méthodes de caractérisation des propriétés diélectriques des cellules par les champs électriques 18
1.3.1 Techniques de caractérisation 18
1.3.2 Application à la caractérisation de populations de cellules 23
1.4 Conclusion 28

2 Technologies électro-microfluidiques et protocoles biologiques **31**
2.1 Dispositif Expérimental 31
2.1.1 Fabrication des puces 32
2.1.2 Traitement de surface 35
2.1.3 Banc de diélectrophorèse 35
2.1.4 Illuminations et observation de la puce 36
2.2 Matériel Biologique 37
2.2.1 Choix des milieux de suspension pour la diélectrophorèse 37
2.2.2 Culture de cellules 38
2.2.3 Modification chimique de la membrane 40
2.2.4 Modification biologique de la membrane 41
2.3 Conclusion 42

3 Électrocinétique de cellules humaines **43**
3.1 Réponse de cellules humaines au champ électrique non uniforme en canal microfluidique 43
3.1.1 Plage 1 : 1-10 kHz - Électro-osmose AC 45
3.1.2 Plage 2 : $f < f_{x0}$ - diélectrophorèse négative 46
3.1.3 Plage 3 : Autour de la fréquence de coupure - Rotation des cellules 47
3.1.4 Plage 4 : $f_{x0} < f < f_{hx0}$ - diélectrophorèse positive 49

3.1.5 Plage 5 : f_{hx0} - Deuxième fréquence de coupure et diélectrophorèse négative 51
3.1.6 Explication du comportement des cellules par un modème de compétition de forces . . . 51
3.2 Méthode de détermination expérimentale du facteur de Clausius-Mossotti . . . 56
3.3 Méthode de détermination de la fréquence de coupure . . . 58
3.3.1 Développement d'une nouvelle méthode pour déterminer la fréquence de coupure . . . 58
3.3.2 Mesure de la vitesse de rotation par traitement vidéo . . . 58
3.3.3 Caractérisation de la méthode . . . 61
3.4 Conclusion . . . 63

4 Signature diélectrophorétique de cellules humaines et étude de l'influence de modifications membranaires 65
4.1 Présentation des types cellulaires étudiés . . . 65
4.2 Signature diélectrophorétique de cellules humaines cancéreuses et non cancéreuses 67
4.2.1 En fonction du type cellulaire . . . 68
4.2.2 En fonction de l'état cancéreux d'un type cellulaire . . . 69
4.2.3 En fonction de la progression cancéreuse . . . 73
4.3 Compréhension de l'origine de la fréquence de coupure . . . 76
4.3.1 Influence des canaux ioniques . . . 77
4.3.2 Influence des protéines membranaires . . . 80
4.4 Conclusion . . . 84

Conclusion 85

Publications 87

Annexes 87

A Fabrication des électrodes par lithographie 89
A.1 Dépôt métallique . . . 89

B Plateforme de diélectrophorèse 91
B.1 Module optique . . . 91
B.2 Module électrique . . . 91
B.3 Interface logicielle . . . 92
B.4 Module fluidique . . . 94

C Illuminations disponibles sur le banc de manipulation 95
C.1 Microscopie en champ sombre . . . 95
C.2 Microscopie par transmission (champ clair) . . . 96
C.3 Microscopie de fluorescence . . . 96

D Méthode expérimentale pour déterminer la capacité membranaire 99

E Extinction de gènes 103

F Mesure de la fréquence de coupure après modification de la membrane 105
F.1 Modification de la membrane par voie chimique 105
F.2 Modification de la membrane par voie biologique 106
F.2.1 Sur les cellules témoins HEK 106
F.2.2 Sur les cellules LnCap 107

Bibliographie 109

Introduction

Bien que les cancers demeurent la première cause de mortalité en France (150 000 décès chaque année), ils sont également la cause de décès la plus évitable, sous réserve d'un diagnostic suffisamment précoce. Les technologies de diagnostic et les stratégies thérapeutiques sont en pleine révolution avec l'arrivée d'une médecine personnalisée. Le traitement est d'autant plus efficace (et moins contraignant) que le diagnostic est précoce car la tumeur est encore petite et localisée. De plus en plus performantes, les techniques actuelles (imagerie médicale, palpation, analyse histologique) souffrent encore de limitations, qui entraînent parfois un diagnostic trop tardif.

De nouvelles approches de diagnostic sont développées afin d'améliorer la sensibilité de détection et de facilité d'analyse, comme la quantification de l'ADN tumoral ou des cellules tumorales circulant dans le sang. La présence de ce matériel biologique étant liée au développement de la tumeur, elle est un biomarqueur non seulement à but pronostic mais aussi de suivi de traitement. La détection de ces biomarqueurs émergents est devenue une voie de recherche activement explorée. La plus importante limitation reste la difficulté à détecter efficacement ces cellules, à cause de leur extrême rareté parmi les cellules sanguines (1 pour 1 milliard).

L'avènement de la microfluidique a permis le développement de nouvelles approches pour la détection des cellules cancéreuses. En se basant sur les propriétés intrinsèques des cellules, qui évoluent lors de la cancérisation, il est possible de caractériser, d'identifier et même d'isoler des cellules cancéreuses par rapport à celles non cancéreuses. Les propriétés électrocinétiques des cellules, mesurées avec des champs électriques appropriés, peuvent ainsi être utilisées de par leur capacité à détecter de faibles variations.

Pour exploiter au mieux les propriétés électrocinétiques des cellules, il faut comprendre leur origine et les facteurs les influençant. Ce manuscrit s'inscrit dans cette démarche, en étudiant la réponse des cellules lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique non uniforme. La membrane opposant une barrière au passage du courant dans la cellule, celle-ci a un rôle de première importance dans les propriétés électriques. Des variations dans sa composition ou son aspect impactent la réponse de la cellule au champ imposé.

L'objectif des travaux présentés dans ce manuscrit est d'analyser la réponse des cellules humaines, témoins ou modifiées, dans différents champs électriques. La compréhension des propriétés électrocinétiques des cellules ouvrirait la voie au développement de nouvelles méthodes de caractérisation ou de discrimination de types cellulaires différents.

Le premier chapitre présente en premier lieu un état de l'art des différentes méthodes de caractérisation et de discrimination des cellules, basées sur les propriétés intrinsèques des cellules. Dans un second temps y sont décrites les forces électro-hydrodynamiques présentes lors de l'application d'un champ électrique non uniforme et alternatif dans une suspension cellulaire. Enfin, les méthodologies de caractérisation des propriétés diélectriques des cellules sont présentées.

Le second chapitre explique tout d'abord les protocoles expérimentaux liés aux technologies de puces et de plateforme microfluidique. La deuxième partie se consacre à la dimension biologique, avec la culture de lignées cellulaires et les protocoles développés pour modifier la membrane cellulaire.

Le troisième chapitre aborde l'électrocinétique de cellules dans son ensemble. La réponse expérimentale des cellules à différentes conditions de champ électrique y est présentée, et est comparée à une modélisation théorique. Les deux autres parties du chapitre détaillent deux méthodes de caractérisation des cellules, en utilisant le comportement des cellules selon des conditions particulières de champ électrique. La première permet de mesurer les propriétés diélectrophorétiques des cellules, en mesurant les valeurs de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. La seconde se concentre sur la détermination de la fréquence de coupure par une méthode nouvelle, basée sur la rotation des cellules dans un champ non tournant.

Enfin, le quatrième chapitre exploite chacune de ces méthodes pour une caractérisation des cellules humaines témoins ou modifiées. La signature diélectrophorétique de cellules humaines est mesurée, via le facteur de Clausius-Mossotti, en fonction du type cellulaire. La dernière partie exploite la méthode de détermination de la fréquence de coupure pour mesurer l'impact sur la fréquence de coupure de la modification chimique de la membrane des cellules de degré de cancérisation progressif.

Chapitre 1

Etat de l'art

Sommaire

1.1 Méthodes de caractérisation des propriétés intrinsèques des cellules . . 4
1.1.1 Morphologie 5
1.1.2 Susceptibilité magnétique 7
1.1.3 Propriétés optiques 7
1.1.4 Propriétés électrocinétiques 8
1.2 Théorie de l'électrocinétique de cellules humaines dans un champ non uniforme alternatif 8
1.2.1 Forces électro-hydrodynamiques 8
1.2.2 Forces spécifiques sur la cellule 11
1.2.3 Diélectrophorèse 11
1.2.4 Facteur de Clausius-Mossotti 14
1.2.5 Mesure de la capacité électrique de la membrane 16
1.3 Etat de l'art des méthodes de caractérisation des propriétés diélectriques des cellules par les champs électriques 18
1.3.1 Techniques de caractérisation 18
1.3.2 Application à la caractérisation de populations de cellules 23
1.4 Conclusion 28

La cellule est la brique de base du vivant. Sa capacité à synthétiser et dégrader des molécules pour vivre et se reproduire fait de la cellule une véritable usine, où chaque compartiment remplit une fonction donnée (figure 1.1). L'intérieur de la cellule est délimité par la membrane plasmique, qui a pour fonction principale de réguler les échanges avec le milieu extra-cellulaire. Dans le cas d'une cellule eucaryote, l'information génétique est contenue dans le noyau.
Que ce soit pour mieux comprendre le fonctionnement des cellules, de manière fondamentale, ou pour développer de nouvelles technologies de diagnostic ou de thérapie, les propriétés des cellules sont étudiées depuis des décennies. Pour caractériser ces propriétés, différentes approches ont été développées.
Ce chapitre aborde en premier lieu les différentes propriétés des cellules, et les moyens existants pour les mesurer. Ce manuscrit étant orienté vers leurs propriétés diélectriques, la seconde partie de ce chapitre se focalisera sur les forces électrocinétiques employées pour manipuler et caractériser les cellules. Enfin, la dernière partie détaille l'état de l'art des applications développées autour de l'électrocinétique.

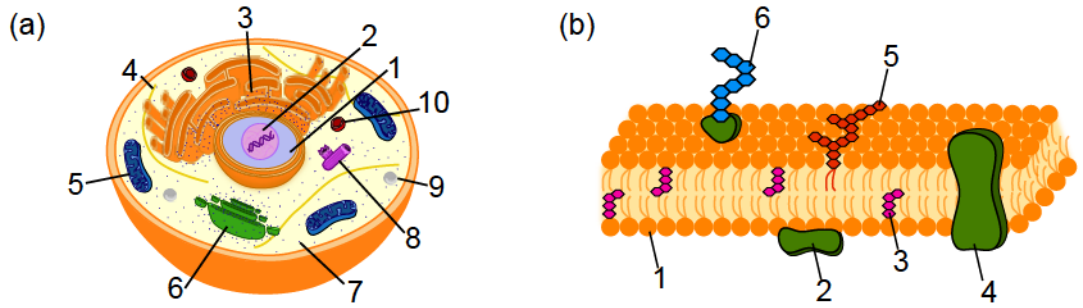


FIGURE 1.1 – **Schéma d'une cellule eucaryote.** (a) Vue globale : 1. Noyau, 2. Nucléole, 3. Reticulum endoplasmique rugueux et lisse, 4. Microtubule, 5. Mitochondrie, 6. Appareil de Golgi, 7. Ribosome, 8. Centrosome, 9. Vésicule, 10. Lysosome. (b) Membrane plasmique : 1. Phospholipide, 2. Protéine intracellulaire, 3. Cholestérol, 4. Protéine transmembranaire, 5. Glycolipide, 6. Glycoprotéine.

1.1 Méthodes de caractérisation des propriétés intrinsèques des cellules

Il existe différentes techniques de caractérisation des suspensions cellulaires, qui peuvent être classées en deux grandes catégories :

— les méthodes conventionnelles, où les cellules sont marquées spécifiquement.
— les méthodes **sans marquage**, dites *label-free*, permettant de manipuler les cellules directement, en s'affranchissant de l'étape de marquage.

Les techniques les plus connues de caractérisation de cellules avec marquage font intervenir une étiquette fluorescente [8] ou magnétique [91] (connues sous le nom de FACS et MACS, pour *Fluorescent-* ou *Magnetic-activated cell sorting*). Dans le cas de la cytométrie en flux, une protéine est marquée chez les cellules d'intérêt par un anticorps couplé à un fluorophore (figure 1.2(a)). Les cellules passent une par une devant un laser, et elles sont reconnues selon la fluorescence émise, mais aussi selon leur taille et leur granularité. La vitesse d'analyse est élevée, comptant de 10 à 1000 cellules par seconde [7].
Pour le MACS, les cellules d'intérêt sont couplées à des micro- ou nano-particules magnétiques. Des aimants sont placés le long du canal microfluidique, et seules les cellules non marquées s'écoulent avec le flux (figure 1.2(b)*i*), avec un débit de plusieurs centaines de cellules par seconde [2]. Par élution, les cellules d'intérêt sont récupérées en retirant le champ magnétique (figure 1.2(b)*ii*). Les différents échantillons sont ensuite analysés.
Ces deux techniques permettent surtout d'étudier l'état de surface des cellules, et la composition de la membrane externe. En effet, il est impossible de cibler des protéines du cytoplasme avec des anticorps sans solubiliser la membrane. Cette étape ne peut se faire que sur des cellules fixées (donc mortes). Bien que très utilisée en recherche fondamentale, cette méthode trouve ses limites dans l'étude sur cellules vivantes.

Plus récemment, de nouvelles techniques ont été développées, tirant parti des technologies microfluidiques pour traiter de petits volumes d'échantillon, en se basant sur les propriétés intrinsèques des cellules. De fait, ces techniques ne nécessitent pas de marquage préalable pour pouvoir caractériser et séparer les cellules.

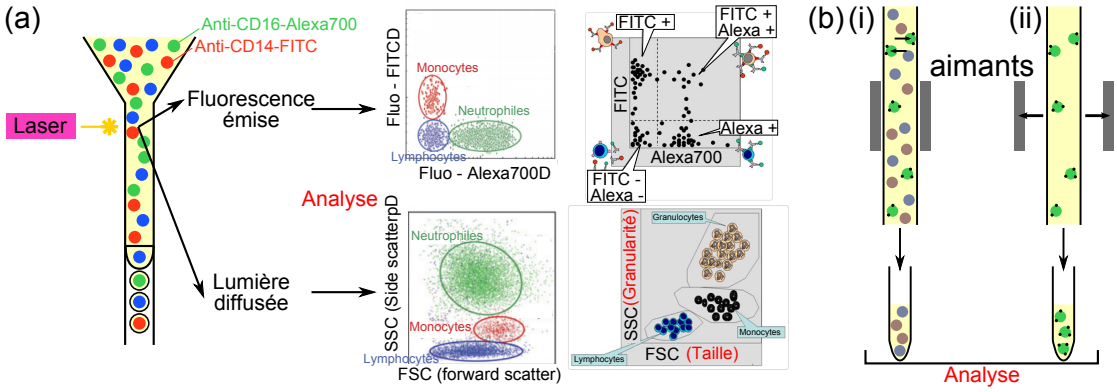


FIGURE 1.2 – **Tri de cellules avec marquage.** (a) *Fluorescent-activated cell sorting*, les cellules sont marquées par immunofluorescence. Adapté de [44]. (b) *Magnetic-activated cell sorting*, les cellules sont marquées par des particules magnétiques.

1.1.1 Morphologie

La morphologie de la cellule regroupe des propriétés telles que la masse, le volume mais aussi la déformabilité, ou la rugosité de la membrane cellulaire. Ces propriétés sont étudiées le plus souvent pour le suivi de croissance des cellules. La masse des cellules peut être par exemple mesurée dans des microcanaux fabriqués en surface de micro-leviers. La fluctuation de ce "plongeoir" est détectée optiquement, *via* sa fréquence de résonance, et reliée à la masse (figure 1.3(a)). *Son et al* ont utilisé cette méthode pour observer la croissance de cellules pendant 1000 heures de culture [92].
L'imagerie de phase quantitative permet l'estimation de la densité cellulaire (la masse "sèche"), en mesurant le décalage du chemin optique de la lumière transmise [102]. Une dernière technique pour évaluer la masse utilise des capteurs appelés *pedestal resonant sensors*, mieux adaptés pour des cellules adhérentes. La sensibilité des micro-leviers n'est pas uniforme et dépend de la localisation de la cellule. La migration de cellules adhérentes le long d'un micro-levier est interprété à tort comme une variation de masse. Les capteurs ici permettent de distinguer une variation de masse ou de localisation. *Park et al* ont utilisé ce système pour démontrer que les cellules ont un taux de croissance plus rapide si leur masse est plus élevée [79].

Le volume cellulaire quant à lui peut être mesuré par des techniques variées : via un compteur électronique (Coulter Counter [25]), par colorimétrie [38], par impédance [69], par vidéomicroscopie [21, 17] ou par mesure de pression contre les parois d'un capillaire [19].

Différents types de structure permettent d'étudier et de caractériser la déformabilité des cellules, paramètre important lors du processus de métastase des cancers. Le groupe de *Di Carlo* a mis au point une technique permettant un haut débit de caractérisation de cellules [22]. En utilisant des flux microfluidiques dans différentes directions, le stress hydrodynamique imposé sur la cellule entraîne sa déformation (figure 1.3(b)). D'autres techniques existent, comme la mesure du temps de passage à travers un canal constricteur [9, 1], l'aspiration par une micro-pipette

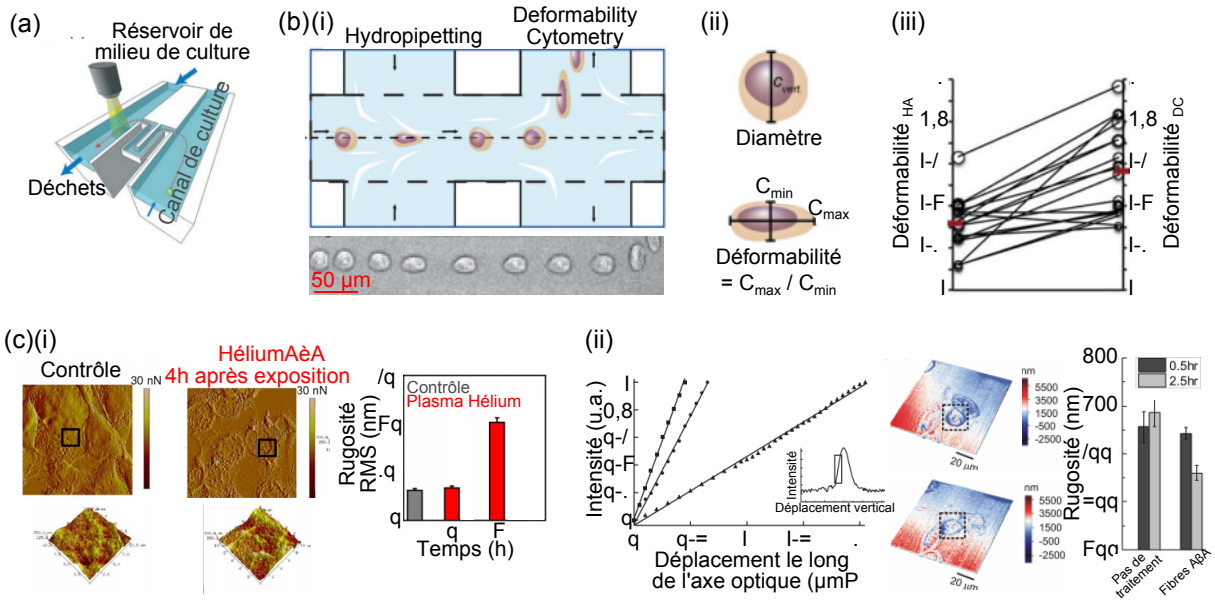


FIGURE 1.3 – **Mesure des propriétés mécaniques des cellules.** (a) Masse. Schéma de principe du micro-levier. (b) Déformabilité. (i) Principe et photographies de la déformation des cellules par les flux hydrodynamiques, (ii) Calcul de la déformabilité, (iii) Relation entre la déformabilité mesurée par le pipetage hydrodynamique (HA) ou à la jonction suivante (*Deformability Cytometry*, DC). (c) Morphologie de la membrane. (i) Images de microscopie à force atomique de la membrane après exposition à un plasma d'hélium et valeurs de la rugosité correspondantes, (ii) Mesures de l'intensité (en coupe) à différents objectifs avec la topographie et la rugosité de la membrane après traitement avec des fibres amyloïdes. Adapté de [92, 22, 68, 62, 78]

[43], la microscopie à force atomique [39], les pinces optiques [40] ou la microscopie acoustique [93]. Ces méthodes permettent de caractériser différents paramètres, comme la déformabilité, la friction ou l'élasticité (module d'Young) des cellules, mais n'atteignent pas les débits proposés par la technique de *Di Carlo*.

La plupart des études de la morphologie des cellules sont basées sur l'immunofluorescence, ou la coloration (histologie, immunohistochimie) et ne sont pas détaillées ici. Les morphologies cellulaire et membranaire sont cependant étudiées pendant la migration cellulaire ou l'apoptose. L'imagerie par microscopie à champ clair est utilisée pour observer la forme des cellules et quantifier leur surface [14]. La déformation de la membrane peut être suivie par diffusion de la lumière [24] ou par la turbidité de la suspension cellulaire [105]. *Lunov et al* ont analysé la membrane par microscopie à force atomique après exposition à différents plasmas (figure 1.3(c)i, [68]). *Pan et al* se sont orientés vers l'utilisation de la profilométrie pour caractériser la rugosité de la membrane lorsque les cellules sont exposées à des peptides spécifiques des maladies neurodégénératives (figure 1.3(c)ii, [78]).

1.1.2 Susceptibilité magnétique

La susceptibilité magnétique des cellules est majoritairement étudiée chez les globules rouges, qui contiennent du fer lié à l'hémoglobine, et ont donc une susceptibilité magnétique supérieure au reste des cellules vivantes. Les études portent le plus souvent sur la variation de cette susceptibilité en fonction de l'état et la concentration de l'hémoglobine ou lors de l'infection par la malaria. La susceptibilité magnétique se mesure dans un spectromètre à résonance magnétique nucléaire. Lorsque les cellules sont soumises à un rayonnement électromagnétique, elles absorbent l'énergie du rayonnement, et la relâchent à une fréquence donnée. *Kuchel et al* ont ainsi mesuré la susceptibilité magnétique χ de globules rouges provenant d'échantillons avec des hématocrites différents [61]. Ils ont montré que les globules rouges sont généralement diamagnétiques ($\chi < 0$). Il existe cependant une condition pour les rendre paramagnétiques ($\chi > 0$), si l'hématocrite est au-dessus de 40 % et si la totalité de l'hémoglobine est oxydée sous forme de methémoglobine. *Kashevskii et al* ont également mesuré la susceptibilité magnétique de cellules tumorales, en mesurant leur déplacement près d'un électro-aimant [58]. La susceptibilité est calculée par rapport à celle du milieu utilisé.

1.1.3 Propriétés optiques

Les différentes propriétés optiques des cellules et tissus pouvant être mesurées sont le cœfficient d'absorption, le cœfficient de diffusion et l'indice de réfraction [53]. Ces propriétés peuvent être mesurées par microscopie de phase quantitative, ou par scattérométrie. Une autre technique de microscopie utilisée est la microscopie par défocalisation [74]. En analysant des motifs observés en contraste de phase lorsque l'objet est défocalisé, il est possible de détecter et de quantifier la courbure de la membrane.

1.1.4 Propriétés électrocinétiques

Les cellules possèdent aussi des propriétés électriques et diélectriques. Elles font l'objet de cette thèse et sont développées en détail dans le dernier paragraphe de ce chapitre (paragraphe 1.3).

> Différentes solutions existent pour caractériser les propriétés des cellules. Elles peuvent faire intervenir un marquage spécifique, le plus souvent avec des anticorps couplés à des fluorophores. Mais de plus en plus de techniques cherchent à caractériser des populations de cellules sans marquage, en étudiant leurs propriétés intrinsèques.
> Dans cette section, les principales méthodes de caractérisation des cellules ont été détaillées, qui permettent de mesurer la masse, la déformabilité, la morphologie ou les propriétés optiques et magnétiques des cellules.

1.2 Théorie de l'électrocinétique de cellules humaines dans un champ non uniforme alternatif

Dans ce manuscrit, les propriétés diélectriques des cellules sont mesurées en utilisant un champ électrique, plus particulièrement la force de diélectrophorèse. La réponse des cellules au champ va principalement dépendre des propriétés de leurs membranes et cytoplasmes, entre autres (tailles de la cellule, conductivité du milieu,...).
On distingue deux types de forces qui apparaissent lors de l'application d'un champ électrique : celles qui agissent sur le liquide de suspension, entraînant les cellules avec lui et celles qui agissent directement sur les cellules.
Cette section aborde les différents aspects de la théorie de l'électrocinétique, en commençant par la description des forces en jeu, puis en présentant l'exploitation de ces forces pour caractériser les cellules.

1.2.1 Forces électro-hydrodynamiques

➢ AC electro-osmose

Lorsqu'un solide est en contact avec un électrolyte, l'état chimique de surface du solide se modifie, en se ionisant, créant une double couche électrique. Comme l'illustre la figure 1.4(a), une première couche, dite de Stern, se forme en contact immédiat avec la surface, et est composée uniquement de contre-ions immobilisés sur quelques Angströms d'épaisseur.
Au-dessus de la couche de Stern se trouve une couche diffuse d'ions mobiles, appelée couche de Gouy-Chapman, dont l'épaisseur est plus connue sous le nom de longueur de Debye ($\lambda \sim$ 1 - 200 nm dans l'eau). Le déséquilibre local des charges dans le liquide génère un potentiel électrique, appelé potentiel ϕ, qui décroît exponentiellement dans la profondeur de la couche de Stern (figure 1.4(a)). Au niveau du plan de cisaillement présent à l'interface des deux couches, le potentiel atteint une valeur spécifique, appelée potentiel zêta. Ce potentiel représente la charge électrique qu'acquiert une particule lorsqu'elle est en solution.
Lorsqu'un champ électrique est appliqué dans un liquide, l'interaction entre le champ et les charges présentes dans le milieu crée une force appelée force de Coulomb, mettant en mouvement les charges libres. Cela crée un flux constant de charges si le champ est continu, mais le mouvement effectif est nul si le champ est alternatif. Les charges se déplaçant de manière égale dans une direction puis dans l'autre au cours d'un cycle, un équilibre est atteint si le champ

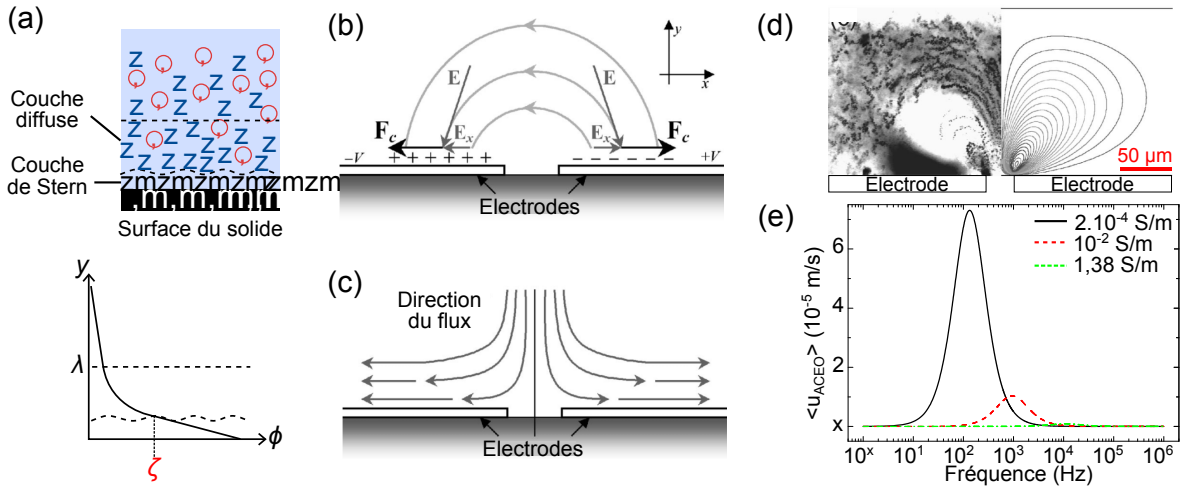


FIGURE 1.4 – **Principe de l'électro-osmose en champ alternatif.** (a) Double couche électrique formée entre une surface et un liquide électrolyte. (b) Champ électrique **E** et charges induites lors de l'application d'un champ alternatif non uniforme. E_x représente la tangente du champ électrique à la surface des électrodes, F_c la force appliquée. (c) Représentation schématique des mouvements du fluide. (d) Visualisation expérimentale des lignes de flux par superposition d'images du mouvement de particules ($f = 10^3\ Hz$, V_{pp}= 2V) et comparaison avec la simulation numérique des lignes de flux. (e) Modélisation de la vélocité moyenne du flux électro-osmotique selon la conductivité du milieu. Adapté de [72].

est uniforme. Dans le cas d'un champ non uniforme, il y a création d'un flux électro-osmotique de l'électrolyte au-dessus de la surface chargée (ici l'électrode). Des charges de signe opposé à l'électrode s'accumulent dans la couche diffuse, et sont soumises à l'action du champ tangent donnant lieu à une force (et donc un mouvement de liquide) allant en direction de l'électrode puis glissant sur sa surface, comme représenté dans la figure 1.4. L'électro-osmose produit donc un glissement du liquide, le long de la surface, générant des rouleaux de convection du fluide. *Morgan* et *Green* ont visualisé ces lignes de flux, avec des nanoparticules faisant office de marqueur (figure 1.4(d) [72]). La direction du mouvement n'est pas dirigée par le potentiel appliqué, les contre-ions suivant aussi le changement de potentiel.
L'électro-osmose ne se produit cependant pas dans toutes les conditions, sa force est dépendante de la taille et du type d'électrodes, mais aussi de la conductivité du milieu et surtout de la fréquence appliquée.
La vitesse de déplacement du liquide se calcule selon l'équation 1.1[77], et qui est fonction d'une fréquence adimensionnelle Ω (équation 1.2). Elle est la plus forte à faible fréquence ($< 10^3\ Hz$) et faible conductivité ($\sigma_m \approx 10^{-4}\ S/m$, figure 1.4(e))).

$$\langle u_{ACEO} \rangle = \left(\frac{\varepsilon_m\, \varphi_0^2\, \Omega^2}{8\, \eta\, d\, (1+\Omega^2)^2} \right) \tag{1.1}$$

$$\Omega = \frac{1}{2}\, \pi\, \kappa\, d \left(\frac{\varepsilon_m}{\sigma_m} \right) \omega \tag{1.2}$$

1.2. Théorie de l'électrocinétique de cellules humaines dans un champ non uniforme alternatif

ε_m : permittivité du milieu
φ_0 : potentiel initial
Ω : fréquence sans dimension, définie dans l'équation 1.2
η : viscosité dynamique
d : distance au centre du système
κ : inverse de la longueur de Debye
σ_m : conductivité du milieu

➢ **Effet électrothermique**

Le passage d'un courant dans un fluide conducteur génère un effet Joule, dépendant de la conductivité thermique du milieu κ, défini dans l'équation 1.3. Le flux de liquide provient du gradient de température ainsi créé dans la profondeur du milieu. Ce gradient entraîne la formation d'autres gradients locaux, notamment de conductivité ($\nabla\sigma_m$) et de permittivité ($\nabla\varepsilon_m$), représentés dans la figure 1.5a. Il en résulte une force volumique qui agit sur le fluide, selon l'équation 1.4.

$$\kappa\,\nabla T^2 + \sigma_m\,E^2 = 0 \tag{1.3}$$

$$\begin{aligned}\langle\overrightarrow{F_{ETE}}\rangle &= -0.5\left[\left(\frac{\nabla\sigma_m}{\sigma_m} - \frac{\nabla\varepsilon_m}{\varepsilon_m}\right)\overrightarrow{E}\,\frac{\varepsilon_m\,\overrightarrow{E}}{1+(\omega\,\tau)^2} + 0.5\,|\overrightarrow{E}^2|\,\nabla\varepsilon_m\right] \\ &= 0.5\,\varepsilon_m\,\nabla T\,\overrightarrow{E}^2\,\Pi\,(\omega)\end{aligned} \tag{1.4}$$

$$\Pi(\omega) = \left(\frac{\alpha-\beta}{1+(\omega\,\varepsilon_m/\sigma_m^2)} - \frac{\alpha}{2}\right) \tag{1.5}$$

où α et β représentent respectivement les gradients locaux de conductivité et de permittivité (équations 1.6 et 1.7).

$$\alpha = \frac{1}{\varepsilon_m}\,\frac{\nabla\varepsilon_m}{\nabla T} = -0.4\%K^{-1} \tag{1.6}$$

$$\beta = \frac{1}{\sigma_m}\,\frac{\nabla\sigma_m}{\nabla T} = 2\%K^{-1} \tag{1.7}$$

∇T : gradient de température
ω : fréquence angulaire, $\omega = 2\pi f$
τ : temps de relaxation des charges

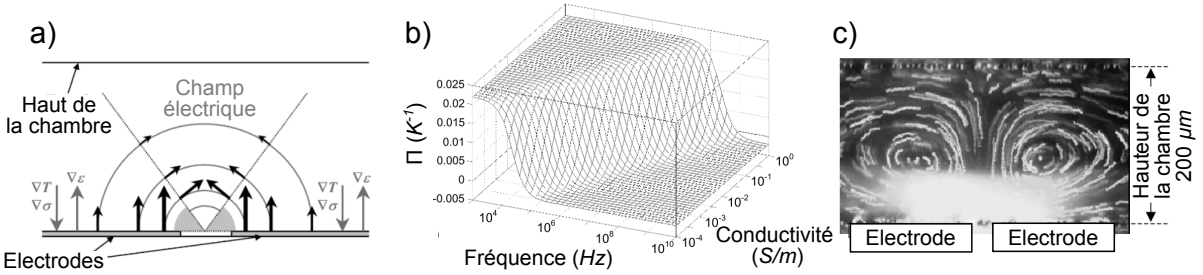


FIGURE 1.5 – **Principe de la force électrothermique.** (a) Représentation schématique du gradient de température ∇T généré par l'application d'un champ électrique non uniforme, et des gradients locaux de permittivité $\nabla\varepsilon$ et de conductivité $\nabla\sigma$ (b) Représentation graphique du facteur Π en fonction de la fréquence du signal et de la conductivité du milieu (c) Visualisation expérimentale des lignes de flux par superposition d'images du mouvement de particules. [72]

Le facteur Π représente la dépendance fréquentielle de l'électrothermie. Positif à basse fréquence, Π devient négatif à haute fréquence, traduisant un changement de sens des rouleaux de convection. L'ordre de grandeur de fréquence pour lequel le signe de Π s'inverse dépend de la conductivité du milieu, et se situe aux alentours de 10^5 Hz à $\sigma_m = 10^{-4}$ S/m, jusqu'à 10^9 Hz à $\sigma_m = 10$ S/m (figure 1.5(b)) [77].
De manière plus générale, la force électrothermique est faible à basse conductivité, pour des différences de potentiel faibles et augmente rapidement avec l'accroissement d'au moins un de ces deux paramètres. Il existe une dépendance linéaire entre la vitesse du flux et la conductivité, et une dépendance très forte par rapport à la différence de potentiel.

1.2.2 Forces spécifiques sur la cellule

➢ Gravité et poussée d'Archimède

Dans un canal microfluidique, la gravité a pour effet de faire sédimenter les cellules, selon l'équation 1.8.

$$F_g = \nu(\rho_p - \rho_m)g \tag{1.8}$$

ν : volume de la cellule
ρ_p : densité de la cellule
ρ_m : densité du milieu
g : accélération dûe à la gravité

A contrario, la poussée d'Archimède est une force dirigée vers le haut du canal microfluidique. Elle est exercée par le fluide sur les cellules, selon l'équation 1.9. Comme la pression du fluide sur la cellule étant dépendante de la profondeur d'immersion, celle-ci est toujours plus forte sur la moitié basse de la cellule que sur la moitié supérieure. Il en résulte donc une force dirigée vers le haut du canal. La flottabilité des cellules dépend donc de leur densité par rapport à celle du fluide.

$$\overrightarrow{p}_A = -\rho_m \nu \overrightarrow{g} \tag{1.9}$$

ρ_m : densité du fluide
ν : volume de la cellule
$\overrightarrow{g}$: pesanteur effective sur la cellule

1.2.3 Diélectrophorèse

La diélectrophorèse est une force qui apparaît lorsque l'on applique un champ électrique non uniforme, qu'il soit continu ou alternatif, sur une particule polarisable suspendue dans un milieu polarisable. Découverte par *Pohl* en 1951 [84], elle est depuis largement étudiée pour manipuler particules et cellules dans des domaines aussi variés que la purification de certains composés de l'environnement ou la caractérisation d'échantillons biologiques ([32]). *Morgan & Green* ont exploré les différentes facettes de la diélectrophorèse, tant au niveau de la dynamique de mouvement des particules, que de l'hydrodynamique du milieu ou de la fabrication des microsystèmes adaptés à son utilisation [71]. Pour bien comprendre l'origine de cette force, il est nécessaire de détailler le phénomène d'apparition de la polarisation lorsqu'un champ électrique (uniforme ou pas) est appliqué à une particule ou une cellule.

Lorsqu'un champ électrique, quelqu'il soit, est appliqué sur une particule non chargée, les charges vont se mouvoir et s'accumuler à la surface de celle-ci, en s'orientant par rapport au champ (figure 1.6(a)). Cette polarisation varie en fonction des propriétés diélectriques de la particule,

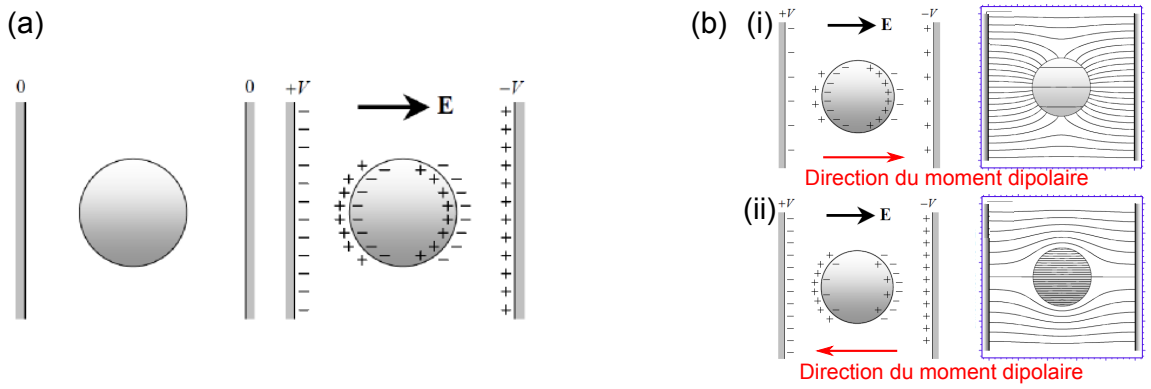


FIGURE 1.6 – **Polarisation d'une cellule lors de l'application d'un champ électrique uniforme.** (a) Schéma de répartition des charges. (b) Formation du moment dipolaire et simulation numérique des lignes de champ lorsque la cellule est (i) plus polarisable ou (ii) moins polarisable que le milieu.

comme la permittivité et la conductivité. Pour rappel, la permittivité représente la capacité du matériau à accumuler des charges à sa surface alors que la conductivité indique la facilité qu'ont les charges à circuler à l'intérieur du matériau.
Sur des particules organiques comme des cellules, qui sont composées de nombreux groupements chargés à leur surface, il existe une charge nette à la surface de la cellule globalement négative. Des ions de charge opposée sont attirés pour contrebalancer le déséquilibre des charges, et forment une double couche. Quand le champ est appliqué, les charges se déplacent autour de la cellule pour s'aligner dans le champ, entraînant la polarisation de la cellule.
L'accumulation de charges à l'interface particule/milieu prédomine la plupart du temps d'un côté de l'interface, selon la différence de polarisabilité entre les deux parties. Par exemple, si la particule est plus polarisable que le milieu, l'accumulation de charges se fait préférentiellement dans la particule, comme le montre la figure 1.6(b)i, et le moment dipolaire s'établit dans la direction du champ électrique (et inversement).

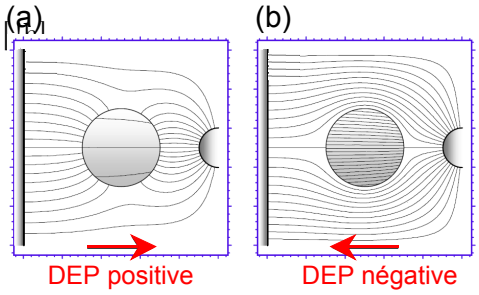


FIGURE 1.7 – **Cas d'un champ électrique non uniforme : diélectrophorèse.** Simulation numérique des lignes de champ lorsque la cellule est (a) plus polarisable ou (b) moins polarisable que le milieu.

Si le champ appliqué est alternatif, le dipôle s'établit dans une direction puis dans l'autre, en suivant le changement de sens du courant. Le déplacement des charges n'étant pas immédiat, il arrive une fréquence où le dipôle ne peut se stabiliser suffisamment rapidement avant que le sens du courant ne change. À basse fréquence, c'est la conductivité de la particule qui prédomine, et donc sa capacité à faire circuler des charges, alors qu'à plus haute fréquence, on observe une dominance de la permittivité (accumulation de charges à l'interface avec le milieu). Une particule inorganique sera donc plus polarisable que le milieu à basse fréquence (figure 1.6(b)i), mais devient moins polarisable à haute fréquence (figure 1.6(b)ii).

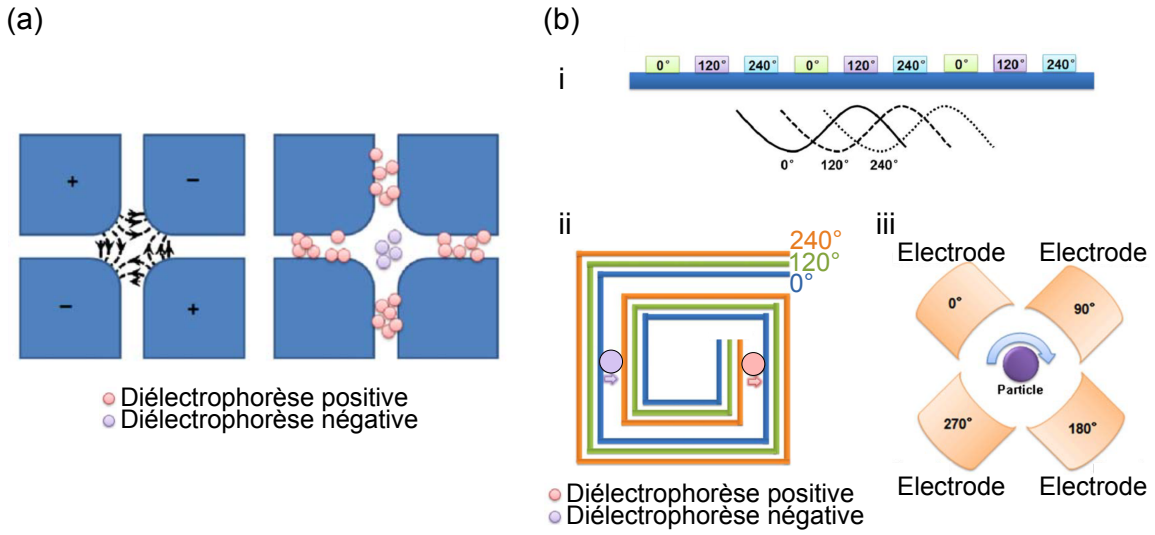


FIGURE 1.8 – **Modes d'application de la diélectrophorèse.** Schémas des électrodes et du champ électrique lors de (a) la diélectrophorèse, où la magnitude (le long des lignes de champ) varie spatialement. (b) la *twDEP* et l'électro-rotation, où la phase du champ varie. (i) Exemple de configuration de 3 signaux déphasés de 120 ° (ii) Schéma d'électrodes dédiées à la *twDEP*, avec 3 signaux déphasés de 60 ° pour produire un gradient de phase du champ électrique. (iii) Schéma d'électrodes dédiées à l'électro-rotation, avec 4 signaux déphasés de 90 ° pour créer un champ tournant. Adapté de [106]

Cependant, le champ électrique étant uniforme, le mouvement effectif est nul, le dipôle induit et les contre-ions présents dans le milieu s'équilibrent pour conserver l'électro-neutralité. Ce n'est que dans le cas d'un champ électrique **non uniforme**, continu ou alternatif, que l'on observe un mouvement de la particule, car les forces exercées par les charges d'un côté ou de l'autre de la particule sont en déséquilibre . La figure 1.7 démontre clairement que la densité des lignes de champ n'est pas identique de part et d'autre, entraînant une différence de pression électrostatique [85]. Cet effet génère un mouvement de la particule et est appelé **diélectrophorèse**.
Il existe plusieurs types de diélectrophorèse, selon la forme des électrodes choisies. Dans le cadre de la diélectrophorèse dite conventionnelle, le champ électrique s'étend des électrodes actives jusqu'à celles reliées à la masse. Il y a donc création d'un **gradient de champ**, avec une magnitude la plus élevée au bord de l'électrode active et la plus faible au niveau de la masse. La géométrie des électrodes est réalisée en fonction du but recherché (séparation, focalisation, *etc*).
Mais le champ peut aussi être appliqué avec un décalage de phase, comme le montre la figure 1.8(b)i, ce qui est le cas de la traveling-wave dielectrophoresis (*twDEP*) et de l'électro-rotation. Dans le cas de l'électro-rotation, un champ tournant est appliqué (non uniforme en phase), induisant un moment dipolaire circulant. Les tensions appliquées à deux électrodes adjacentes sont déphasées de 90 ° pour chaque point de fréquence. Des électrodes successives peuvent également permettre de transporter des cellules dans un canal microfluidique où il n'y a pas d'écoulement du milieu de suspension (d'où le nom de *travelling-wave dielectrophoresis*).
C'est le **gradient de phase** créé qui entraîne le mouvement des cellules, qui se déplacent dans (diélectrophorèse positive) ou contre (diélectrophorèse négative) le sens du décalage de la phase

(figure 1.8(b)ii).
La force et/ou le couple de diélectrophorèse dépendent de plusieurs facteurs, dont la taille (a), le gradient de champ électrique ($|E^2|$), ou la différence de polarisabilité entre la cellule et le milieu (équation 1.10). Ce dernier paramètre est exprimé par un facteur appelé facteur de Clausius-Mossotti, détaillé dans le paragraphe suivant.
Lors de la diélectrophorèse conventionnelle, la force appliquée sur la cellule suit l'équation 1.10.

$$\langle F_{DEP} \rangle = \pi \, \varepsilon_m \, a^3 \, Re(\omega) \, \nabla |E^2| \tag{1.10}$$

ε_m : permittivité relative du milieu
a : diamètre de la particule
$Re(\omega)$: partie réelle du FCM
ω : fréquence angulaire ($=2\pi f$)
$\nabla|E^2|$: norme du champ électrique

1.2.4 Facteur de Clausius-Mossotti

Le facteur de Clausius-Mossotti représente la différence de polarisabilité entre la cellule et le milieu dans lequel elle est plongée, calculé selon l'équation 1.11. Il est décomposé en une partie réelle et une partie imaginaire. La cellule est ici représentée par une particule équivalente *ep* (figure 1.9(b)).

$$[FCM(\omega)] = Re[FCM(\omega)] + i * Im[FCM(\omega)] = \varepsilon_{ep} + i\sigma_{ep} \tag{1.11}$$

ε_{ep} et σ_{ep} : permittivité et conductivité de la particule équivalente
Selon le champ électrique appliqué, les parties varient (figure 1.9(a)). La partie réelle est dominante lorsque la magnitude du champ électrique varie spatialement (donnant lieu à la diélectrophorèse, figure 1.8a), puisqu'elle est dépendante de la fréquence appliquée. La partie imaginaire, quant à elle, est différente de zéro lorsque c'est la phase du champ qui varie spatialement, dans le cas de la *twDEP* et de l'électro-rotation (figure 1.8b). En effet, le couple imposé à la cellule résulte de l'interaction de la partie déphasée du moment dipolaire induit avec le champ électrique. Par conséquent, le couple est proportionnel à la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti [35].
La mesure de $Im[FCM(\omega)]$ par électro-rotation a été réalisée par *Jones* en 1995, puis par de nombreuses équipes pour des particules [3] ou des cellules [36].

La partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est calculée à partir de l'équation 1.12 et peut être modélisée à partir des paramètres diélectriques. Elle est représentée sur la figure 1.10, pour des particules inorganiques et pour des cellules. On peut voir que la conductivité du milieu dans lequel les particules sont en suspension présente une grande influence sur la réponse de celles-ci à la diélectrophorèse.

$$Re(\omega) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \text{ où } \varepsilon^* = \varepsilon - i\frac{\sigma}{\omega} \tag{1.12}$$

$\varepsilon_{m/p}$: permittivité relative du milieu et de la particule
ω : fréquence angulaire ($=2\pi f$)
σ : conductivité

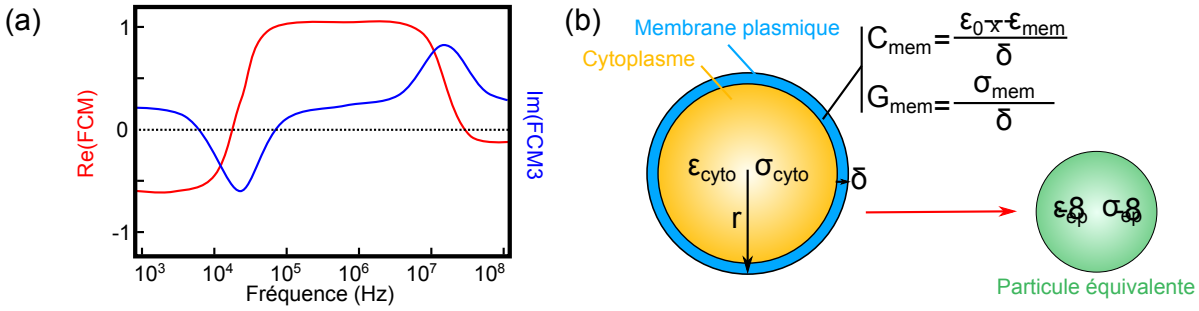


FIGURE 1.9 – **Facteur de Clausius-Mossotti et propriétés diélectriques.**(a) Modélisation des parties réelle (Re_{FCM}) et imaginaire (Im_{FCM}) du facteur de Clausius-Mossotti de cellules. (b) Modèle cœur-coquille et particule équivalente, et propriétés diélectriques correspondantes.

On distingue 3 régimes, dépendant de la fréquence :

— Lorsque Re(FCM) $>$ 0, les particules sont plus polarisables que le milieu et sont donc attirées vers les forts gradients de champ (*i.e.* le bord de l'électrode). Elles sont soumises à une diélectrophorèse positive (pDEP).

— Lorsque Re(FCM) $<$ 0, les particules sont moins polarisables que le milieu et sont repoussées des forts gradients de champ. Ce régime est appelé diélectrophorèse négative (nDEP).

— Losque Re(FCM) $=$ 0, les particules ne sont soumises à aucune force, et la fréquence pour laquelle ce régime apparaît est appelée fréquence de coupure f_{x0}.

L'allure de la courbe pour une particule inorganique et une cellule diffère. Une cellule est électriquement représentée en "couches", contrairement à une particule inorganique dont la composition est uniforme. Le modèle cœur-coquille est le plus utilisé, où la cellule est compartimentée en deux couches : le cytoplasme (cœur) et la membrane plasmique (coquille, figure 1.9(b)). Cette dernière joue un rôle important dans la formation du dipôle. Étant hautement résistive, à basse fréquence, les charges s'accumulent dans la membrane et le dipôle se forme de manière antiparallèle au champ (nDEP) [110]. La membrane oppose une "barrière" au champ électrique, qui ne permet pas la polarisation du cytoplasme.
En augmentant la fréquence, la membrane se comporte comme un isolant comportant des fuites, et le cytoplasme de la cellule commence à se polariser. Cette période correspond à la pente de la courbe avant la première fréquence de coupure. L'intérieur de la cellule étant hautement conducteur ($\approx 1\ S/m$), la cellule devient rapidement plus polarisable que le milieu, et est soumise à la diélectrophorèse positive (sauf si le milieu est lui-même très conducteur, comme les milieux de culture par exemple, représentés par la courbe verte dans la figure 1.10(b), σ_m = 1,38 S/m). Le passage de la diélectrophorèse négative à la diélectrophorèse positive est appelé **fréquence de coupure** (f_{x0}). Pour les hautes fréquences (de l'ordre de $10^8 Hz$), les porteurs de charges ne peuvent de nouveau pas se stabiliser avant le changement de sens du champ électrique et la cellule redevient moins polarisable que le milieu, en passant par une deuxième fréquence de coupure f_{hx0} [16].

> Finalement, à basse fréquence, le dipôle dépend majoritairement des propriétés électriques de la membrane, alors qu'il est plutôt dominé par la conductivité du cytoplasme à haute fréquence.

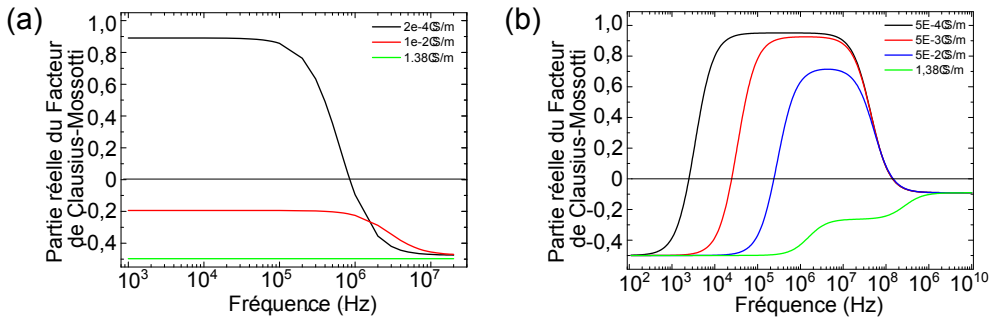


FIGURE 1.10 – **Partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti.** (a) Particules de polystyrène de 1 μm et (b) Cellules de la lignée HEK, en fonction de la conductivité du milieu.

Les propriétés diélectriques de la cellule, représentées dans la figure 1.9(b), peuvent être extraites par électro-rotation. Étant donné les faibles épaisseurs des membranes (quelques nm), la conductivité et la permittivité de la membrane sont exprimées en capacité et en conductance (équation 1.13). Comme précisé auparavant, la membrane plasmique est très faiblement conductrice par nature (dû à la forte teneur en phospho-lipides), et G_{mem} est négligeable devant C_{mem} [33]. C'est donc la valeur de la capacité électrique qui influe sur la première fréquence de coupure.

$$C_{mem} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{mem}}{\delta}, \quad G_{mem} = \frac{\sigma_m}{\delta} \tag{1.13}$$

ε_0 : permittivité du vide

ε_{mem} : permittivité relative de la membrane

σ_m : conductivité de la membrane

δ : épaisseur de la membrane

1.2.5 Mesure de la capacité électrique de la membrane

La membrane de la cellule se comporte comme un condensateur électrique. Elle peut être modélisée comme un isolant diélectrique entre deux conducteurs (le milieu et le cytoplasme). La propriété qui caractérise un condensateur est la capacité électrique : elle représente la quantité de charges qui peuvent être stockées lorsqu'un champ électrique donné est appliqué.
La différence de polarisation entre la cellule et le milieu environnant est dictée par C_{mem} et les propriétés électriques du milieu (σ_m, ε_m). Avec le modèle cœur-coquille, le facteur de Clausius-Mossotti d'une cellule, qui mesure cette différence de polarisabilité, s'exprime selon l'équation 1.14.

$$FCM[\omega] = \frac{\omega^2(\tau_m \tau_{mem} - \tau_{cyto}\tau^*_{mem}) - 1 + i\omega(\tau^*_{mem} - \tau_m - \tau_{mem})}{2 - \omega^2(\tau_{cyto}\tau^*_{mem} + 2\tau_m\tau_{mem}) + i\omega(\tau^*_{mem} + 2\tau_m + 2\tau_{mem})} \tag{1.14}$$

$$\tau_m = \frac{\varepsilon_m}{\sigma_m}, \tau_{cyto} = \frac{\varepsilon_{cyto}}{\sigma_{cyto}}, \tau_{mem} = \frac{R.C_{mem}}{\sigma_{cyto}}, \tau^*_{mem} = \frac{R.C_{mem}}{\sigma_m} \tag{1.15}$$

$$C_{mem} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{mem}}{\delta}, G_{mem} = \frac{\sigma_{mem}}{\delta} \tag{1.16}$$

ω : fréquence angulaire ($= 2\pi f$)

$\tau_{m,mem,cyto}$: taux de relaxation du milieu, de la membrane et du cytoplasme, respectivement

$\sigma_{m,mem,cyto}$: conductivité du milieu, de la membrane et du cytoplasme, respectivement

$\varepsilon_{m,mem,cyto}$: permittivité du milieu, de la membrane et du cytoplasme, respectivement

ε : permittivité du vide

C_{mem} : capacité électrique de la membrane

G_{mem} : conductance électrique de la membrane

Il est possible d'expliciter la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti pour obtenir l'équation 1.17.

$$Re[FCM(\omega)] = \frac{-a_1 a_2 \omega^4 + (b_1 b_2 + a_2 + a_1)\omega^2 - 2 + b_1 b_2}{(a_2)^2 \omega^4 + b_2 \omega^2 + 4} \tag{1.17}$$

où

$$\begin{aligned} a_1 &= \tau_m.\tau_{mem} - \tau_{cyto}.\tau_{mem^*} \\ a_2 &= 2.\tau_m.\tau_{mem} + \tau_{cyto}.\tau^*_{mem} \\ b_1 &= \tau^*_{mem} - \tau_m - \tau_{mem} \\ b_2 &= \tau^*_{mem} + 2.\tau_m + 2.\tau_{mem} \end{aligned} \tag{1.18}$$

On peut alors simplifier cette équation, si deux termes ont un écart d'au moins deux ordres de grandeur. Ici, $a_1 \approx 10^{-14}$, $a_2 \approx 10^{-13}$ et b_1 et $b_2 \approx 10^{-5}$. La forme finale de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est donnée par l'équation 1.19.

$$Re[FCM(\omega)] = \frac{-a_1 a_2 \omega^4 + b_1 b_2 \omega^2 - 2}{(a_2)^2 \omega^4 + b_2 \omega^2 + 4} \tag{1.19}$$

À la première fréquence de coupure f_{x0}, il faut résoudre l'équation 1.20, où $\omega_1 = 2.\pi.f_{x0}$. Pour terminer, il est donc possible de calculer expérimentalement la capacité de la membrane à partir de l'équation 1.21.

$$\begin{aligned} b_1 b_2 \omega_1^2 &= 0 \\ \omega_1 &= \sqrt{\frac{2}{b_1 b_2}} = \frac{\sigma_m \sqrt{2}}{r.C_{mem}} \end{aligned} \tag{1.20}$$

$$C_{mem} = \frac{\sigma_m \sqrt{2}}{r.\omega_1} \tag{1.21}$$

Lorsque f_{x0} est mesurée sur une même lignée pour des conductivités différentes, la capacité électrique est calculée selon l'équation 1.22, où α est le coefficient directeur de la droite obtenue en traçant $r.f_{x0} = \mathrm{f}(\sigma_m)$.

$$C_{mem} = \frac{1}{\pi.\sqrt{2}.\alpha} \tag{1.22}$$

Pethig et al ont par exemple utilisé cette méthode pour mesurer la capacité de la membrane sur des cellules pancréatiques [81].

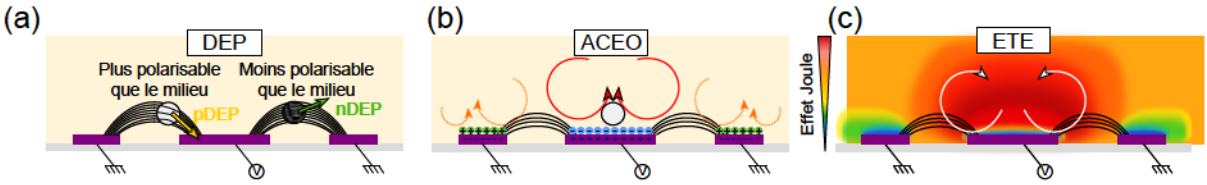


FIGURE 1.11 – **Récapitulatif des forces électrocinétiques et électro-hydrodynamiques**. Schémas récapitulatifs des déplacements induits par (a) diélectrophorèse (b) Électro-osmose et (c) Éffets électrothermiques.

En résumé, lorsqu'on applique un champ électrique non uniforme, différentes forces apparaissent et mettent en mouvement la cellule, résumées dans la figure 1.11.
La diélectrophorèse agit sur la cellule en l'attirant ou en la repoussant des zones de forts gradients de champ (*i.e.* le bord de l'électrode, figure 1.11a2). Le facteur de Clausius-Mossotti représente la différence de polarisabilité entre la cellule et le milieu, et est dépendant de la taille de la cellule, de la capacité électrique de la membrane et de la conductivité du milieu. Pour $\mathrm{Re}[\mathrm{CMF}(\omega)] < 0$, le milieu est plus polarisable que la cellule, et celle-ci présente une diélectrophorèse négative (et inversement). À deux reprises, $\mathrm{Re}[\mathrm{CMF}(\omega)]$ est égal à 0, moment où la force diélectrophorétique est nulle appelé fréquence de coupure. Les propriétés diélectriques des cellules peuvent être calculées à partir du facteur de Clausius-Mossotti grâce à un modèle cœur-coquille.

Les forces électro-hydrodynamiques, composées principalement de l'électro-osmose et des effets électrothermiques, agissent sur le milieu, et peuvent également entraîner la cellule. L'électro-osmose est prédominante à faible conductivité ($\sigma_m < 10^{-2}\ S/m$) et faible fréquence ($f < 5.10^3\ Hz$, figure 1.11b1 et b2). Les effets électrothermiques sont quant à eux dépendants de la conductivité du milieu et de la différence de potentiel appliquée, entraînant une élévation locale de température. Des rouleaux de convection se forment au-dessus des électrodes dûs au gradient de température généré. Le sens de rotation des rouleaux dépend du signe du facteur Π (le milieu se déplaçant du bord des électrodes vers le centre lorsque $\Pi > 0$, figure 1.11c1 et c2).

1.3 Etat de l'art des méthodes de caractérisation des propriétés diélectriques des cellules par les champs électriques

La littérature présente plusieurs approches pour mesurer les propriétés électriques (conductance de la membrane et conductivité du cytoplasme) et diélectriques (capacité de la membrane et permittivité du cytoplasme) des cellules. Cette partie détaille les différentes techniques de caractérisation, ainsi que leurs applications sur des populations de cellules.

1.3.1 Techniques de caractérisation

La modélisation à partir des propriétés extraites par électro-rotation, est la méthode la plus utilisée pour établir les parties réelle et/ou imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti. Couramment, le spectre d'électro-rotation est mesuré expérimentalement, puis les propriétés diélectriques en sont dérivées [6, 11]. La réponse à la diélectrophorèse est alors modélisée, à partir de C_{mem}

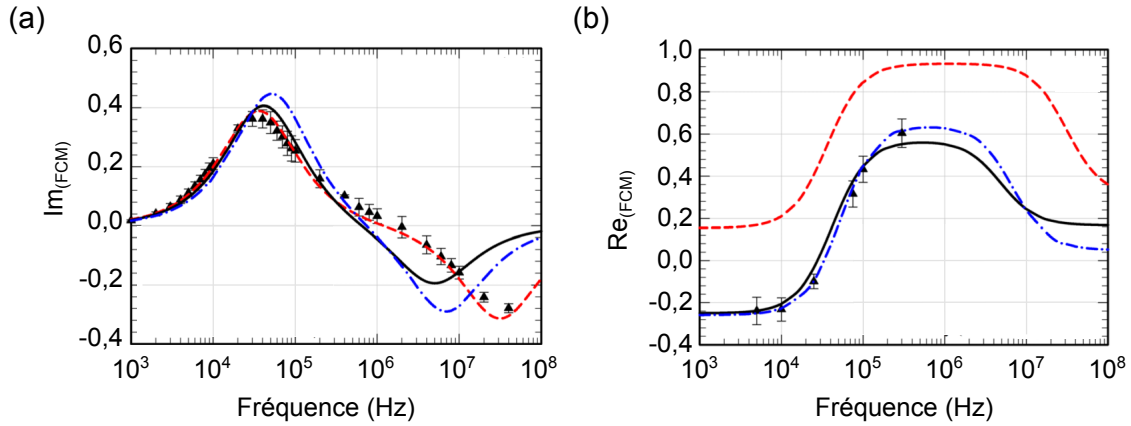


FIGURE 1.12 – **Simulation de facteur de Clausius-Mossotti et confrontation à la mesure expérimentale.** Les parties (a) imaginaire et (b) réelle du facteur de Clausius-Mossotti sont mesurées expérimentalement (triangles noirs). Des modélisations sont faites à partir de la partie imaginaire (tirets rouges), de la partie réelle (tirets bleus) ou des deux (ligne noire). Adapté de [66]

et G_{mem}, et la fréquence de coupure peut alors être lue sur la courbe tracée (où Re[FCM(ω)] = 0).
Cependant, il a été montré très récemment par *Lo et al* que la modélisation de la partie réelle à partir du spectre de la partie imaginaire (et inversement, même si cela est moins répandu) ne représente pas efficacement les valeurs attendues expérimentalement. En effet, lorsque la partie imaginaire est mesurée expérimentalement, la modélisation de celle-ci s'accorde parfaitement avec le tracé (triangles noirs et tirets rouges, figure 1.12(a)). Lorsque les propriétés diélectriques sont extraites à partir de Re_{FCM} et utilisées pour simuler Im_{FCM}, la courbe (tirets bleus) ne concorde pas avec les valeurs expérimentales.
Et inversement, pour la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (figure 1.12(b)). Les tracés de la modélisation de la partie réelle à partir des valeurs expérimentales (triangles noirs et tirets bleus) correspondent. Alors que la simulation à partir de valeurs extraites par électro-rotation (tirets rouges) n'arrive pas à prédire les résultats obtenus expérimentalement. Il est donc préférable de réaliser expérimentalement les mesures des propriétés diélectriques d'intérêt.

La mesure de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est une des techniques les plus pointues, qui permet d'évaluer directement la réponse des cellules à la diélectrophorèse. Bien que l'électrocinétique représente une méthode communément utilisée, elle montre ses limites pour mesurer les valeurs expérimentales de l'ensemble du facteur de Clausius-Mossotti. Plusieurs approches ont été développées pour mesurer $Re[FCM(\omega)]$, en équilibre avec des forces hydrodynamiques ou pendant une phase de diélectrophorèse pure.
Wu et al ont montré en 2012 qu'il était possible de calculer Re_{FCM} à partir du spectre de la tension de capture [104]. Des cellules sont entraînées dans le canal et passent au-dessus d'électrodes transversales, à une fréquence et un flux donnés. Il existe une tension critique, appelée "tension de capture", où les forces de diélectrophorèse et de Stokes s'équilibrent. Cette valeur est reliée directement à la valeur de $Re[FCM(\omega)]$ (figure 1.13(a)).

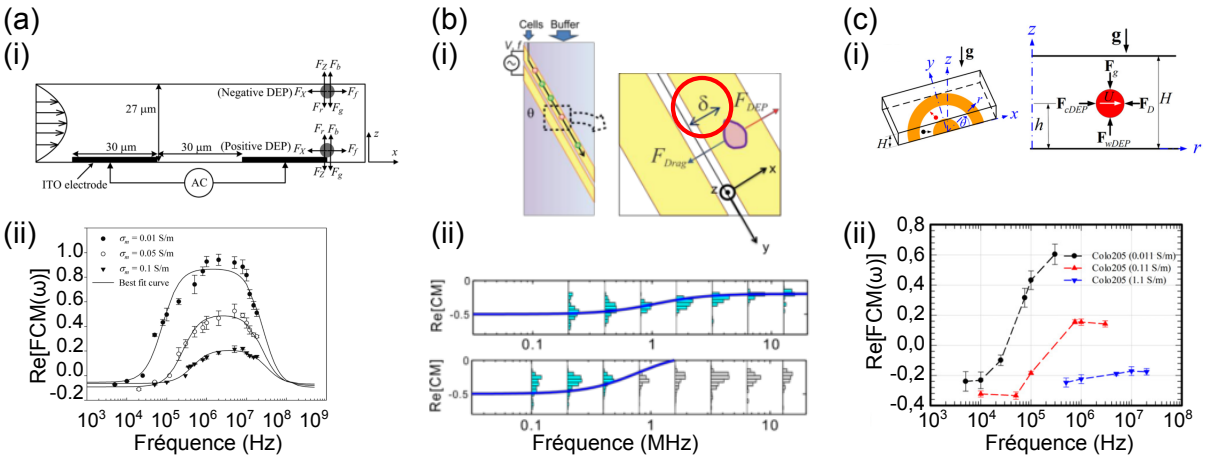


FIGURE 1.13 – **Mesures expérimentales de ReFCM.** (a) Tension de capture. (i) Schéma des différentes forces : $F_{x,z}$: diélectrophorèse dans l'axe X et Z ; F_f : force d'entraînement de Stokes ;$F_{b,g,r}$: poussée d'Archimède, force de gravité et de réaction, (iii) $Re[FCM(\omega)]$ de cellules HT-29. (b) Distance d'équilibration. (i) Schéma du système et des différentes forces : F_{drag} : force d'entraînement ; F_{DEP} : diélectrophorèse, (iii) $Re[FCM(\omega)]$ de cellules HL-60. (c) Champ radial. (i) Schéma du système et des différentes forces : F_{cDEP} : diélectrophorèse (négative ici) ; F_D : force d'entraînement ; F_{wDEP} : diélectrophorèse liée au substrat isolé ; F_g : gravité, (ii) $Re[FCM(\omega)]$ de cellules Colo205. Adapté de [104, 94, 67]

Su et al ont également utilisé une méthode basée sur la balance des forces hydrodynamiques et diélectrophorétique [94]. Cette fois, deux électrodes traversent le canal en diagonale (figure 1.13(b)). Lorsque les cellules passent au-dessus des électrodes, elles subissent une diélectrophorèse négative et sont donc à la fois repoussées des électrodes et poussées dans le canal par le flux, en se déplaçant au final le long de l'électrode sans la franchir. À flux et différence de potentiel constants, la distance d'équilibration δ mesurée entre la cellule et l'électrode est dépendante de $Re[FCM(\omega)]$.
La dernière méthode décrite dans la littérature a été publiée récemment par *Lo et al*, en utilisant un champ radial entre deux électrodes circulaires [67]. Les structures autres que les électrodes sont isolées électriquement et repoussent les cellules (diélectrophorèse à effet de bord, F_{wDEP}), les maintenant en "lévitation" dans le canal (figure 1.13(c)). Les électrodes génèrent, elles, un champ radial, avec une diélectrophorèse conventionnelle (F_{cDEP}), pouvant déplacer les cellules dans le sens du flux ou à l'inverse (en les attirant ou en les repoussant). Re_{FCM} est calculé à nouveau à partir de la balance entre la force d'entraînement et F_{cDEP}.

Au laboratoire, la méthode développée a été appliquée à l'origine à des particules inorganiques [46]. Elle n'est pas basée sur la compétition de forces entre le flux et la diélectrophorèse, mais sur la vitesse de déplacement des particules lorsqu'elles sont dans un régime de diélectrophorèse pure (figure 1.14). Cette vitesse est enregistrée juste après l'application de la fréquence d'intérêt, après avoir préalablement concentré les particules vers l'électrode.

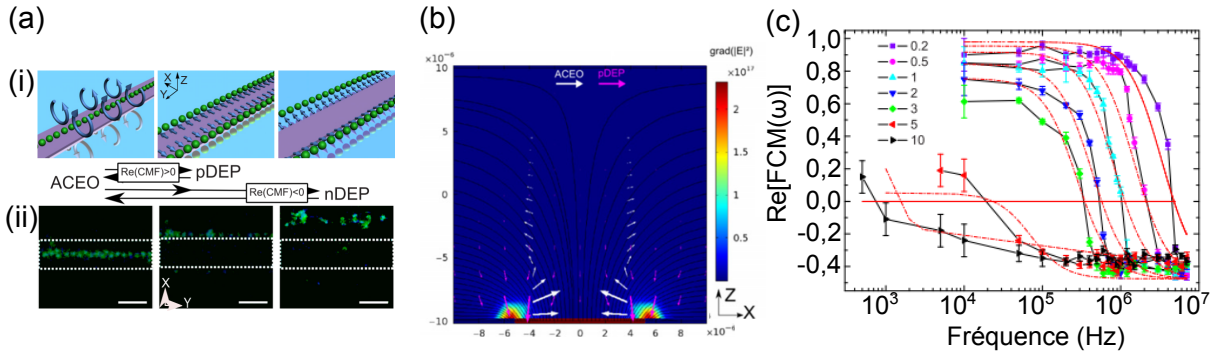


FIGURE 1.14 – **Mesure de ReFCM.** (a) Procédé expérimental avec des particules de polystyrène de 1 μm, (i) schéma (ii) photos en fluorescence. (b) Modélisation du gradient de champ au-dessus des électrodes. (c) Re_{FCM} de particules de polystyrène de différentes tailles (en μm) dans l'eau désionisée ($\sigma_m \approx 5.10^{-2}$ S/m). Adapté de [46].

La mesure du facteur de Clausius-Mossotti n'est pas la seule technique disponible pour déterminer les propriétés électriques ou diélectriques des cellules. Il existe de nombreuses approches dans la littérature, qui sont résumées dans la figure 1.15.
Au plus simple, la fréquence de coupure peut être expérimentalement observée comme le moment où la cellule n'est plus soumise à la diélectrophorèse, *ie* le moment où la cellule n'est ni repoussée ni attirée vers les électrodes en diélectrophorèse conventionnelle [64]. Sinon, en appliquant le champ depuis un bord du canal, la fréquence de coupure correspond à la fréquence où les cellules sont uniformément réparties dans la largeur du canal [90, 88].
La partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti peut être mesurée par électro-rotation, afin de calculer les propriétés diélectriques des cellules [55, 41]. Les cellules sont soumises à un champ tournant, et le couple induit sur les cellules (vitesse et sens de rotation) est dépendant de $Im[FCM(\omega)]$.
La force de diélectrophorèse peut aussi être mesurée par la différence d'intensité optique [50, 52, 73]. Avec une électrode annulaire, l'intensité optique transmise dépend de la localisation des cellules. Lorsque soumises à la diélectrophorèse positive, ces dernières sont attirées vers les parois de l'électrode, laissant la lumière passer à travers l'électrode.
Flanagan et al mesurent et comparent la fréquence de piégeage de différentes lignées [27]. Cette fréquence correspond au moment où 100 % des cellules sont en diélectrophorèse positive, ce qui se traduit par l'observation de l'arrêt de l'écoulement d'une suspension cellulaire dans un canal à flux constant, les cellules étant toutes attirées par les électrodes.
Vahey et al ont développé un système permettant de mesurer le point isodiélectrique d'une cellule, en plongeant celle-ci dans un canal microfluidique ayant une conductivité variable dans la largeur du canal [96, 97]. Une électrode à une fréquence constante parcourt le canal en diagonale, repoussant la cellule tant que celle-ci est en diélectrophorèse négative. Au lieu de mesurer la fréquence à laquelle le dipôle devient plus polarisable que le milieu, ce système mesure la conductivité à laquelle ce changement s'effectue (à une fréquence donnée).
Pour terminer, les propriétés diélectriques des cellules peuvent être mesurées par spectroscopie d'impédance, en mesurant la résistance des cellules à un courant alternatif [34].

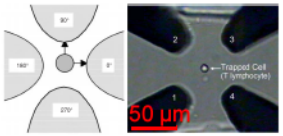
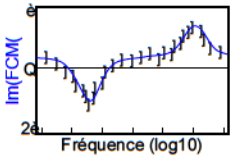
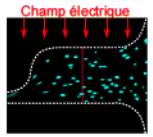
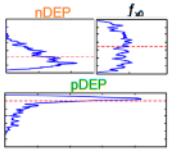
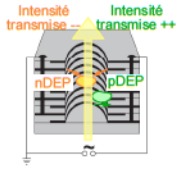
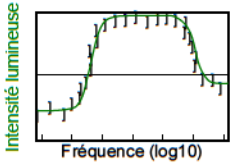
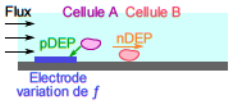
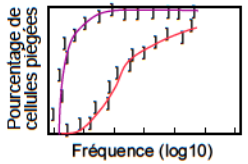
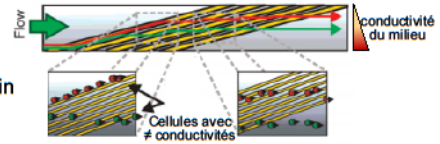
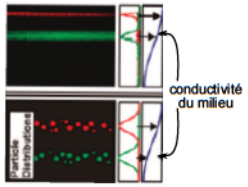
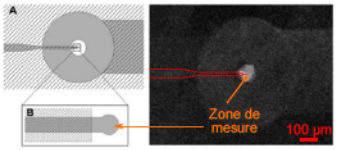
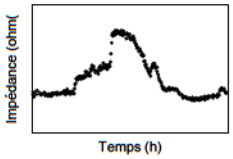
Méthode	Principe	Débit	Technique	Résultat	Ref
Électro-rotation	Rotation de la cellule induite par des électrodes disposées en quadrupole. Le champ non uniforme a un décalage de phase, appliquant un couple sur la cellule dépendant de Im[FCM(ω)]	~ 30 cellules / min			Jones, 2003 Han, 2013
Observation de la fréquence de coupure	2. Observation directe de la fréquence où les cellules ne sont ni attirées, ni repoussées des électrodes. 2. Mesure de la répartition des cellules dans un canal où le champ est appliqué depuis un bord. La fréquence de coupure correspond au moment où les cellules sont également réparties dans la largeur du canal.	~ 500 cellules / min			Lei, 2011 Sano, 2010 Salmanzadeh, 2012
Mesure optique de la DEP	Quantification de la lumière transmise à travers une électrode en anneau. La zone de gradient se trouvant au bord de l'anneau, une DEP positive entraîne une augmentation de l'intensité lumineuse au centre du puits.	~ 500 cellules / min			Hubner, 2010 Ismail, 2012 Mulhall, 2013
Fréquence de piégeage	Application d'un flux constant dans un canal, et piégeage des cellules lorsqu'elles sont en DEP positive. Mesure du pourcentage de cellules piégées en fonction de la fréquence.	~ 600 à 1200 cellules / min			Flanagan, 2008
Analyse isodiélectrique	Application d'un champ dans un canal avec un flux constant et un milieu de suspension dont la conductivité varie spatialement (dans la largeur du canal)	8 à 10 cellules / min			Vahey, 2010
Impédance	Mesure de la résistance des cellules à un courant sinusoïdal alternatif. La valeur d'impédance est reliée aux propriétés électriques et diélectriques des cellules.	- quelques cellules / électrode- jusqu'à 500 cellules / min si encapsulation en gouttes			Ghenim, 2010

FIGURE 1.15 – **Récapitulatif des différentes techniques de caractérisation des cellules.**

1.3.2 Application à la caractérisation de populations de cellules

Chacune de ces techniques a été utilisée pour caractériser et comparer des populations de cellules. Les conditions de comparaison ont été classées en trois groupes :

— si les cellules sont de type différent (lignées différentes, sous-populations de cellules sanguines, etc.)
— si les cellules sont de même type, à différents stades (différentiation de cellules souches, stades de cancérisation)
— si les cellules sont de même lignée, au cours de la vie cellulaire (mitose, apoptose, etc.)

➢ Entre différents types de cellules

Les méthodes de mesurer présentées précédemment ont été utilisées pour caractériser et séparer différents types de cellules. Seules quelques publications ont été sélectionnées pour représenter ce type d'étude. *Zhao et al* ont par exemple mesuré la capacité électrique de la membrane de cellules cancéreuses de poumon, provenant d'un carcinome non à petites cellules (CRL-5803) et d'un adénocarcinome (CCL-185) [107]. En faisant passer la cellule dans un canal constricteur, la mesure d'impédance peut être réalisée sur différentes portions de la membrane cellulaire. Ils ont montré que la capacité de la membrane et la conductivité diffèrent entre les deux lignées (figure 1.16(a)). Ces propriétés étant indépendantes de la taille de la cellule, la différence est basée sur la composition intrinsèque de chacune des lignées.

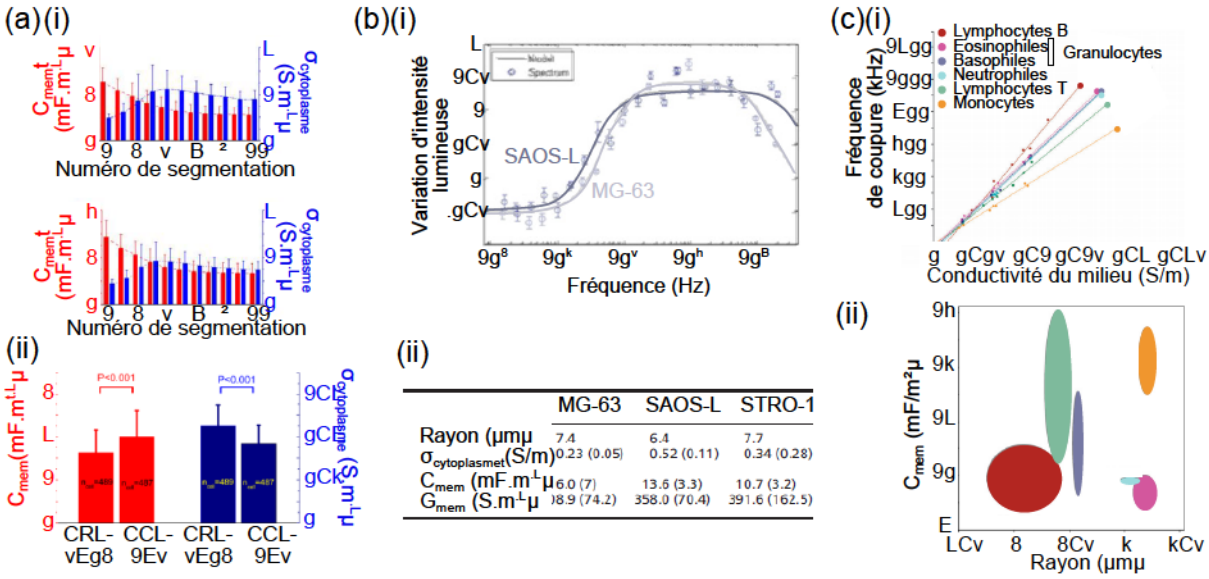


FIGURE 1.16 – **Caractérisation de cellules de lignées différentes.** (a) (i) Capacité de la membrane C_{mem} et conductivité du cytoplasme pour les lignées CRL-5803 (en haut) et CCL-185 (en bas) en fonction du segment de la membrane observé, (ii) Comparaison des deux lignées pour le segment 11. (b) (i) Courbe d'intensité lumineuse pour les lignées SAOS-2 et MG-63, (ii) propriétés correspondantes. (c) (i) fréquence de coupure à différentes conductivités pour chaque sous-catégorie de leucocytes, (ii) Capacités électriques des membranes correspondantes. Adapté de [107, 52, 100].

Ismail et al ont comparé deux lignées différentes d'ostéosarcomes (MG-63, SAOS-2) et d'une lignée isolée à partir de cellules souches osseuses primaires (STRO-1) [52]. En modélisant la courbe via un modèle cœur-coquille, ils ont dérivé les propriétés diélectriques à partir des valeurs moyennes obtenues sur trois mesures différentes. Les valeurs respectives de conductivité du cytoplasme, de conductance et de capacité de la membrane ont été calculées (figure 1.16(b)), ainsi que le pourcentage de différence entre chacune des lignées. Les lignées d'ostéosarcome ont une apparence distincte en culture : la lignée MG-63 a une morphologie caractéristique en polygones, par rapport aux cellules SAOS-2, qui ont une morphologie plus classique de cellules épithéliales. La morphologie de la lignée STRO-1 est proche de celle des cellules dont la lignée a été isolée (fibroblastes de moelle osseuse). Les cellules les plus petites (SAOS-2) ont la conductivité cytoplasmique la plus élevée, qui pourrait être expliquée par la concentration des électrolytes dans un volume plus petit. Mais chacune des lignées a des caractéristiques diélectriques qui lui sont propres. Il serait donc possible, par diélectrophorèse, de détecter et d'isoler une population dans un échantillon hétérogène, en l'occurrence un échantillon de moelle osseuse.
Vykoukal et al ont, eux, observé la fréquence de coupure des sous-populations de leucocytes à différentes conductivités afin de calculer la capacité électrique de la membrane [100]. Les différents groupes de cellules primaires ont été isolés par des techniques immunologiques et par tri magnétique avant d'être étudiés. Les globules blancs se divisent en trois grandes classes (lymphocytes, granulocytes et monocytes), structurellement distinctes et ayant un rôle immunologique précis. Les fréquences de coupure (et donc les propriétés diélectriques) de chacune de ces classes sont différentes (figure 1.16(c)). Ils ont également réussi à distinguer les lymphocytes T et B, qui présentent des propriétés clairement différentes. Les trois sous-classes des granulocytes (basophiles, neutrophiles et éosinophiles) ont été étudiées séparément. Elles ont des propriétés proches entre elles, mais distinctes des autres sous-populations de leucocytes. La diélectrophorèse permet donc d'identifier différents types de cellules au sein de la famille des globules blancs.

➢ Entre différents stades de différentiation ou cancérisation

Si l'étude des propriétés diélectriques sur des cellules de type différent existe depuis longtemps, ce n'est que plus récemment que des équipes ont suivi les propriétés des cellules au cours de la différentiation ou la cancérisation. Durant les vingt dernières années, le perfectionnement des techniques a permis de raffiner les mesures, et de tenter d'étudier les propriétés des cellules au cours d'évènements d'évolution de la cellule.
Flanagan et al ont par exemple étudié des cellules souches neuronales (NSPC, pour *neural stem / precursor cells*) et leur descendance, en mesurant leurs fréquences de piégeage respectives [27]. Ils ont montré que les cellules souches ont des propriétés diélectriques différentes des astrocytes et des neurones différenciés (figure 1.17(a)). Pour aller plus loin, il est possible de suivre les propriétés des cellules souches dans le temps. Leur évolution au cours de la différentiation permet de déterminer leur destin et de prédire le type de cellules différenciées vers lequel la cellule se dirige. Ils ont démontré que les cellules précurseurs ont non seulement des propriétés diélectriques différentes en fonction de leur voie de différentiation, mais aussi que ces propriétés coïncident avec le type de cellules obtenues après différentiation : les cellules E12 NSPC, qui se différencient préférentiellement en neurones ont une fréquence de piégeage plus élevée que les cellules E16 NSPC (qui se différencient préférentiellement en astrocytes), tout comme les neurones ont une fréquence de piégeage plus élevée que les astrocytes. De plus, ces cellules précurseurs ont des caractéristiques de culture similaires et ne présentent pas de différence dans l'expression de marqueurs classiquement suivis au cours de la différentiation.

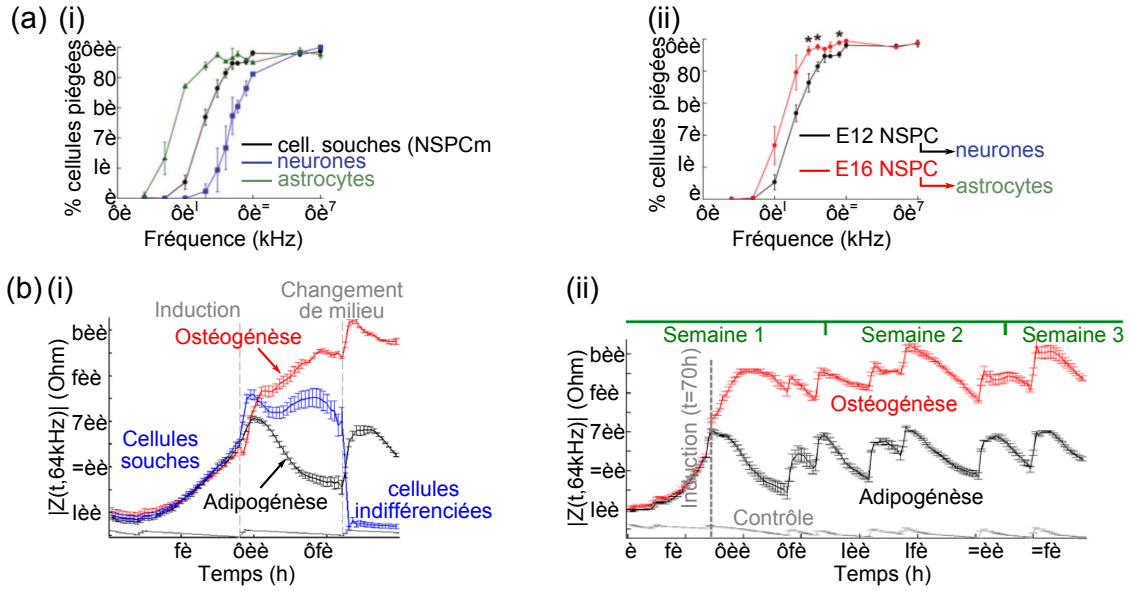


FIGURE 1.17 – **Caractérisation de cellules à des stades de différentiation différents.** (a) Cellules neuronales. Fréquences de piégeage de (i) les cellules souches (NSPC) et les cellules différenciées, (ii) les cellules précurseurs engagées dans des voies de différentiation différentes. (b) Cellules souches adipeuses. Courbes d'impédance lors de la différentiation à (i) court terme, (ii) long terme. Adapté de [27, 5].

La diélectrophorèse est donc suffisamment sensible pour détecter des changements mineurs dans le phénotype de la cellule, qui se reflètent dans ses propriétés diélectriques.
Bagnaninchi et al ont également suivi en temps réel la capacité de la membrane de cellules souches adipeuses au cours de leur différentiation en cellules adipeuses ou osseuses [5]. Après induction de la différentiation, les mesures d'impédance varient suivant la voie de différentiation suivie (figure 1.17(b)). Ils ont montré que la capacité électrique de la membrane est un marqueur de différentiation suffisamment précoce pour la détecter après 12h de stimulation. À plus long terme (17 jours), les deux types cellulaires conservent des propriétés différentes.

Sur le même principe, *Salmanzadeh et al* ont étudié une lignée de cellules de souris (MOSE, pour *mouse ovarian surface epithelial*) qui a la particularité de se transformer spontanément en cellules cancéreuses [88, 87]. Ce type cellulaire évolue de cellules tumorigéniques prémalignes en un phénotype hautement malin et agressif, en fonction de la durée du maintien des cultures cellulaires. En mesurant la fréquence de coupure à plusieurs stades de cancérisation, ils ont démontré que celle-ci diminue avec l'augmentation de l'agressivité et de la malignité des cellules (figure 1.18(a)). La capacité électrique de la membrane, inversement reliée à la fréquence de coupure, est la plus élevée chez les cellules les plus transformées. Ils ont également observé l'effet de sphingolipides, impliqués dans la croissance et la mort cellulaire, entre autres [29]. Ils ont montré l'effet de la sphingosine (So) et de la sphingosine-1-phosphate (S1P) sur des cellules ovariennes de souris peu cancéreuses (MOSE-E) ou très cancéreuses (MOSE-L)[87]. Les cellules les plus cancéreuses ont une fréquence de coupure plus basse, mais le traitement à la sphingosine leur permet de retrouver une fréquence de coupure similaire aux MOSE-E.

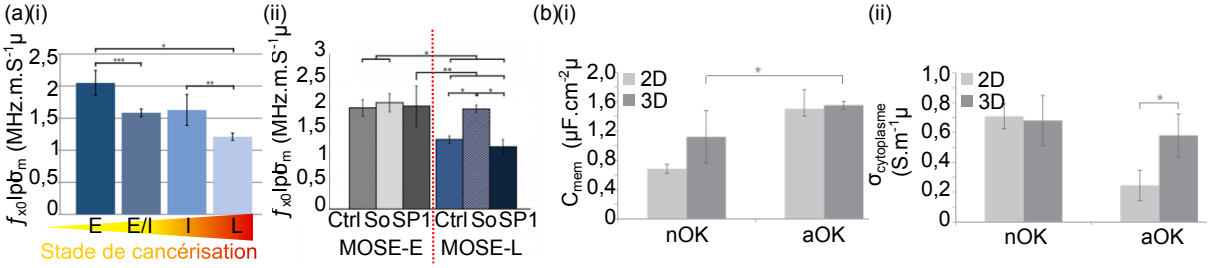
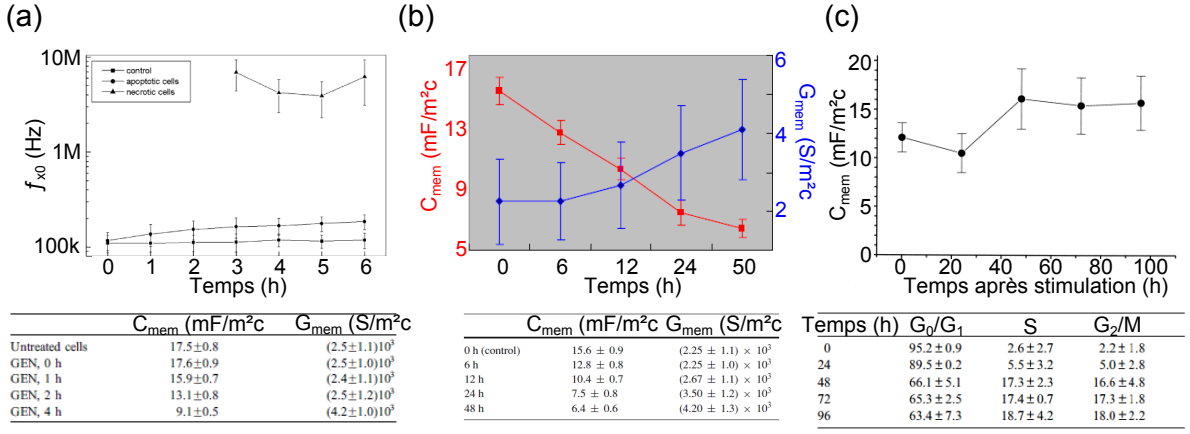


FIGURE 1.18 – **Caractérisation de cellules à des stades différents.** (a) Cancérisation. Ratio fréquence de coupure : conductivité cytoplasmique pour des cellules (i) à différents stades de cancérisation (E :early, I :intermediate, L :late), (ii) après traitement à la sphingosine (So) et sphingosine-1-phosphate (SP1). (b) Environnement de culture. (i) capacité électrique, (ii) conductivité cytoplasmique de kératinocytes normaux (nOK) ou cancéreux (aOK) après culture en 2D ou 3D. Adapté de [88, 87, 73].

Outre la différentiation et la cancérisation, l'environnement de culture influe sur le développement des cellules. *Mulhall et al* ont étudié les propriétés diélectriques des kératinocytes (cellules de la peau) en fonction de la géométrie de culture (en 2D ou 3D, [73]). En deux dimensions, ces cellules ne se différencient pas, et croissent en monocouches. Mais ces cellules épithéliales, nativement, sont organisées en organes en trois dimensions, où le stade de différentiation dépend de leur position dans la couche : les cellules du côté basal sont peu différenciées, proches d'un phénotype de cellules souches, alors que les cellules côté apical sont fortement différenciées (squames). Sans surprise, la capacité électrique diffère entre les cellules non cancéreuses et cancéreuses (figure 1.18(b)). Mais ils ont montré que, pour des cellules cancéreuses, l'environnement de culture influe sur la conductivité cytoplasmique. La taille n'ayant pas varié, ils supposent que la croissance des cellules de manière organotypique modifie la composition ionique du cytoplasme. Si leur étude est vouée à démontrer l'importance de bien choisir un modèle représentatif lors d'étude *in vitro*, elle permet ici d'appuyer l'utilisation des propriétés diélectriques comme marqueur sensible de la composition des cellules.

➢ Suivi de vie cellulaire

En mesurant les propriétés diélectriques des cellules au cours de la vie cellulaire, des études ont montré qu'il était possible de suivre des évènements comme la mitose ou l'apoptose.
Wang et al ont observé la fréquence de coupure à différentes conductivités de milieu après induction de l'apoptose par la génistéine [101]. Ils ont observé une augmentation de la fréquence de coupure dès la première heure de traitement, avant l'activation des caspases (enzymes impliquées dans le processus d'apoptose). Encore une fois, les propriétés diélectriques sont un marqueur précoce, et peuvent potentiellement servir de marqueur diagnostic de l'apoptose. Ils ont aussi démontré que les cellules nécrotiques ont une réponse à la diélectrophorèse typique, qui permet de les différencier des cellules apoptotiques.
Huang et al ont également étudié les changements des propriétés diélectriques de cellules cancéreuses lors de l'induction de l'apoptose [48]. En combinant la diélectrophorèse pour positionner les cellules et l'électro-rotation pour mesurer leurs spectres de rotation, ils ont observé la diminution de la capacité de la membrane (concordante avec l'augmentation de la fréquence de coupure rapportée par *Wang et al*), mais aussi l'augmentation de la conductivité membranaire.



	C_{mem} (mF/m²c	G_{mem} (S/m²c
Untreated cells	17.5±0.8	(2.5±1.1)10³
GEN, 0 h	17.6±0.9	(2.5±1.0)10³
GEN, 1 h	15.9±0.7	(2.4±1.1)10³
GEN, 2 h	13.1±0.8	(2.5±1.2)10³
GEN, 4 h	9.1±0.5	(4.2±1.0)10³

	C_{mem} (mF/m²c	G_{mem} (S/m²c
0 h (control)	15.6 ± 0.9	(2.25 ± 1.1) × 10³
6 h	12.8 ± 0.8	(2.25 ± 1.0) × 10³
12 h	10.4 ± 0.7	(2.67 ± 1.1) × 10³
24 h	7.5 ± 0.8	(3.50 ± 1.2) × 10³
48 h	6.4 ± 0.6	(4.20 ± 1.3) × 10³

Temps (h)	G_0/G_1	S	G_2/M
0	95.2±0.9	2.6±2.7	2.2±1.8
24	89.5±0.2	5.5±3.2	5.0±2.8
48	66.1±5.1	17.3±2.3	16.6±4.8
72	65.3±2.5	17.4±0.7	17.3±1.8
96	63.4±7.3	18.7±4.2	18.0±2.2

FIGURE 1.19 – **Caractérisation de cellules lors d'évènements de la vie cellulaire.** (a) Observation de la fréquence de coupure après induction de l'apoptose par génistéine sur des cellules HL-60. (b) Mesure de C_{mem} et G_{mem} après induction de l'apoptose par bufaline sur des cellules HL-60. (c) Mesure de C_{mem} après stimulation de lymphocytes T primaires. Adapté de [101, 48, 49].

Les caractéristiques diélectriques des cellules sont étroitement reliées à leurs fonctions biologiques et à leur état physiologique. Ils ont relié ces observations à des clichés de microscopie électronique montrant l'évolution de la morphologie de la membrane, qui devient plus lisse au cours de l'apoptose. Ils supposent que la diminution de la fréquence de coupure reflète cette perte des replis membranaires, entre autres choses (réduction de la surface de la membrane, diminution de l'eau liée à la membrane, etc), tout comme l'augmentation de la conductance membranaire est dûe à l'altération du transport d'ions à travers la membrane.

Le lien entre la morphologie de la membrane et les propriétés diélectriques a aussi été étudié par *Pethig et al* [83, 82]. En étudiant un plus grand nombre de cellules que *Wang et al* (~300 cellules contre 20), ils ont observé une diminution de la capacité électrique plus tardive et plus réduite. Les molécules induisant l'apoptose étant variées, elles agissent différemment sur le métabolisme cellulaire.
Outre l'apoptose, il est possible de suivre d'autres évènements de la vie cellulaire comme la mitose (mécanisme de division cellulaire). *Huang et al* ont stimulé des lymphocytes T primaires et suivi leurs paramètres diélectriques [49]. La capacité électrique de la membrane augmente après stimulation, phénomène qui n'est pas lié à la modification de la taille de la cellule. En effet, une augmentation de la surface de la membrane sans modification de la capacité totale de la membrane aurait plutôt entraîné une baisse de C_{mem}. Des images de microscopie ont montré l'augmentation de la complexité de la morphologie de la membrane, avec l'augmentation de la taille et de la densité des microvilli, ce qui corrobore les études précédentes sur l'impact de la morphologie de la membrane sur ses caractéristiques diélectriques. *Kim et al* ont montré qu'il était possible d'utiliser ses propriétés différentes au cours de la mitose pour sélectionner et séparer les cellules suivant leur phase dans le cycle [59].
Pour terminer, *Zhuang et al* ont suivi les propriétés électriques et diélectriques de la membrane avant et après électroporation [109]. Ils ont montré qu'après 5 minutes d'exposition à des champs pulsés, la conductivité et la permittivité de la membrane ont augmenté, et continuent de pro-

gresser 30 minutes après exposition. De plus, à dose égale, l'utilisation de champs micropulsés ou nanopulsés entraîne des effets différents. Dans leur cas, le suivi des propriétés diélectriques permet d'estimer la perméabilisation de la membrane, et donc la réussite de l'électroporation (largement utilisée pour faciliter le passage de larges molécules à travers la membrane, impossible lorsque l'intégrité de la membrane n'est pas compromise).

> Au cours de cette partie, les différentes méthodes de caractérisation des propriétés diélectriques ont été synthétisées. La mesure de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est réalisée en équilibre avec des forces hydrodynamiques ou dans des phases de diélectrophorèse pure. Les propriétés diélectriques peuvent également être reliées à d'autres paramètres mesurés expérimentalement, comme le spectre d'électrorotation, le point isodiélectrique ou la spectroscopie d'impédance, entre autres.
> Ces propriétés sont spécifiques du type cellulaire, ce qui permet de séparer deux types cellulaires différents [37], mais aussi d'identifier et d'isoler un type de cellules parmi un échantillon hétérogène [86, 15]. Les technologies basées sur l'électrocinétique sont suffisamment sensibles pour détecter un changement des propriétés diélectriques au cours de la cancérisation ou de la différentiation, mais aussi au cours de l'évolution de la vie cellulaire comme l'apoptose ou la mitose.
> L'utilisation de ces propriétés diélectriques comme marqueur de nombreux évènements au cours de la vie cellulaire fait d'elles un composant physique à part entière du phénotype cellulaire. Les technologies existantes permettant la mesure de ces propriétés étant sans marquage, rapides, et sans contact, elles ouvrent la voie à de nouvelles perspectives d'étude et de diagnostic.

1.4 Conclusion

Ce chapitre d'introduction a permis de présenter les différentes propriétés des cellules, et leurs méthodes de caractérisation respectives. Les technologies *label-free* permettent d'étudier ces propriétés sans étape préliminaire de marquage (immunologique ou magnétique).

Parmi l'ensemble des propriétés intrinsèques des cellules, nous avons choisi de traiter les propriétés diélectriques. Elles sont propres à chaque type cellulaire, et les technologies existantes permettent de les mesurer suffisamment finement pour détecter deux types cellulaires proches. La capacité des propriétés diélectriques à refléter l'état physiologique de la cellule en font un marqueur de choix pour le suivi de cancérisation, de différentiation, d'apoptose ou de mitose.

Ces propriétés diélectriques des cellules sont caractérisées lorsqu'elles sont soumises à la diélectrophorèse. L'application d'un champ électrique non uniforme sur une suspension cellulaire entraîne un mouvement des cellules, dépendant de leurs propriétés diélectriques. De nombreux travaux présentent la manipulation et la séparation de cellules par la diélectrophorèse. Mais l'application d'un champ électrique entraîne l'apparition de forces hydrodynamiques, qui induisent des mouvements de fluide. La compétition de forces existant entre la diélectrophorèse, l'électro-osmose en champ alternatif et l'électrothermie crée une large gamme de comportements cellulaires observables et rend parfois difficile la compréhension de l'implication des propriétés diélectriques.

Cette thèse a pour but d'étudier et d'expliquer la réponse des cellules à de tels champs électriques dans une puce microfluidique, afin de faciliter leur caractérisation. Basé sur des technologies développées pendant cette thèse, la réponse des cellules à la diélectrophorèse sera caractérisée. Une meilleure compréhension du comportement des cellules permetta ainsi d'ouvrir de nouvelles perspectives quant à l'implication de certains facteurs membranaires sur les propriétés diélectriques.

Chapitre 2

Technologies électro-microfluidiques et protocoles biologiques

Sommaire

2.1 Dispositif Expérimental 31
2.1.1 Fabrication des puces 32
2.1.2 Traitement de surface 35
2.1.3 Banc de diélectrophorèse 35
2.1.4 Illuminations et observation de la puce 36
2.2 Matériel Biologique 37
2.2.1 Choix des milieux de suspension pour la diélectrophorèse 37
2.2.2 Culture de cellules 38
2.2.3 Modification chimique de la membrane 40
2.2.4 Modification biologique de la membrane 41
2.3 Conclusion 42

Ce chapitre présente les matériels et protocoles utilisés au cours de cette thèse. Dans un premier temps, la fabrication des puces électro-microfluidiques est décrite, ainsi que le banc de diélectrophorèse sur lequel se sont déroulées les expérimentations.
Une deuxième partie de ce chapitre est consacrée au matériel biologique utilisé dans ce travail : lignées choisies, culture de cellules et milieu de suspension pour la diélectrophorèse. Les membranes plasmiques de certaines lignées cellulaires ont été modifiées par des agents chimiques ou biologiques. Le protocole de modification des membranes est présenté à la fin de ce chapitre.

2.1 Dispositif Expérimental

Cette première partie regroupe les différents protocoles liés aux puces et à la plateforme électro-microfluidiques.
Le procédé de fabrication des puces servant à la diélectrophorèse est présenté en premier lieu. Comme le montre la figure 2.1, les électrodes (en violet) peuvent être co- ou biplanaires. Dans le premier cas, les électrodes sont sur le même plan, et sont fabriquées sur une lame de verre standard. Le canal microfluidique qui apporte la suspension cellulaire au-dessus des électrodes est fermé en haut. Dans le second cas, les électrodes se trouvent sur deux niveaux, au-dessus et en-dessous du canal, ouvert sur chacun des niveaux.
Les puces microfluidiques sont ensuite traitées contre l'adsorption des cellules sur le verre. La plateforme d'expérimentation qui accueille les puces et permet d'appliquer un champ électrique et de visualiser la réponse des cellules est détaillée en dernière partie.

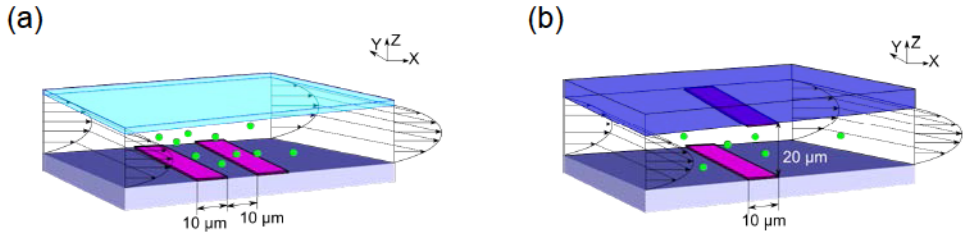


FIGURE 2.1 – **Schémas des puces microfluidiques.** (a) en 2D, avec des électrodes sur le même plan. (b) En 3D avec deux niveaux d'électrodes.

2.1.1 Fabrication des puces

➢ Puces 2D : électrodes coplanaires

Les puces électro-microfluidiques sont fabriquées selon des procédés standards de microfabrication, sur des lames de microscope en verre (76 x 26 x 1,1 mm, Fisher Scientific), comme schématisé dans la figure 2.2. Les puces 2D avec des électrodes coplanaires sont celles qui ont été majoritairement utilisées pour ces travaux.
La première étape correspond à la réalisation des électrodes. Ces dernières peuvent être composées d'or ou d'ITO (pour *Indium Tin Oxide*). L'ITO est un oxyde conducteur composé d' In_2O_3 et de SnO_2 (90 % - 10 %) et qui est transparent (figure 2.3). L'opacité de l'or peut poser problème au cours de certaines expériences, l'illumination de l'échantillon étant par transmission (comme décrit juste après dans le paragraphe 2.1.3). Les lames de microscopes standards sont couvertes d'or par dépôt métallique (135 nm, avec une couche d'accroche de Titane de 15 nm) dans le cas des électrodes d'or. Les lames couvertes d'ITO sont disponibles commercialement (150 nm, 12 $\Omega/\square$, VisionTek Systems Ltd). Les électrodes sont fabriquées par gravure ionique (*ion beam etching*, Plassys), à travers un masque en résine. Ce masque est réalisé en lithographie optique à l'aide d'un aligneur de masque (MJB4, SÜSS MicroTech) sur résine positive. Après gravure, la résine est ensuite retirée pour découvrir les électrodes et permettre le passage du champ électrique. Les électrodes utilisées au cours de ces travaux ont une largeur de 10 μm.
Le protocole détaillé des étapes de lithographie et de gravure est détaillé en annexe (Annexe A).

Un bassin en polydiméthyl-siloxane (PDMS) permet de contenir une goutte de suspension cellulaire au-dessus des électrodes. Le PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) est un polymère thermoréticulable, ce qui permet de lui imposer une forme avant durcissement. L'élastomère siliconé (monomère) est mélangé à un agent réticulant avec un ratio 10 :1 (en masse). Après mélange des deux composants, il est nécessaire d'éliminer les bulles d'air emprisonnées, en plaçant la solution sous vide pendant quelques minutes. Le mélange est ensuite coulé dans un moule en aluminium et chauffé à 110 °C pendant 5 min. La taille du puits est de 6 x 6 x 1,5 mm, soit environ 100 μL de suspension cellulaire.
Une fois réticulé, le carré de PDMS est scellé au niveau des électrodes d'intérêt sur la lame de verre. Après avoir déposé une goutte de suspension cellulaire, le bassin est refermé par une lamelle de verre (18*18 mm), en prenant garde de ne pas coincer de bulles d'air.

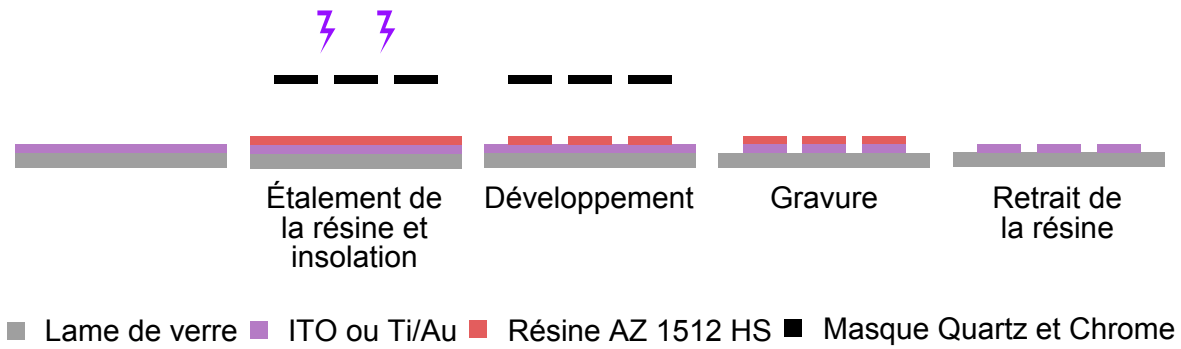


FIGURE 2.2 – **Schéma des étapes de fabrication des électrodes sur lame de verre.** La résine est déposée puis lithographiée sur la lame de verre couverte de métal (Or ou ITO). Les parties découvertes sont gravées par IBE puis la résine restante est retirée pour découvrir les électrodes.

➢ Puces 3D

Dans le cas des puces 2D, le champ s'établit entre les électrodes sur le même plan. Mais il est aussi possible de créer un champ électrique dans la profondeur du canal microfluidique, de manière verticale. Ces puces 3D possèdent des électrodes en haut et en bas du canal microfluidique. Ce dernier doit alors être ouvert (sans couche résiduelle) pour éviter des atténuations du champ électrique dans la suspension cellulaire.
Le même procédé que précédemment est utilisé pour les électrodes. Puis, un canal microfluidique de 50 μm de haut est fabriqué dans une résine par lithographie optique au-dessus des électrodes de la lame du bas. Après avoir préalablement percé la lame du dessus pour permettre l'entrée et la sortie du fluide, celle-ci est alignée et scellée sur la première (figure 2.4(a)).
Le scellement du canal microfluidique avec la lame du haut est une étape critique, pour permettre à la suspension de s'écouler dans le canal uniquement sans fuites qui causeraient des perturbations hydrodynamiques. La solution adoptée au cours de cette thèse a été d'apposer une fine couche de résine utilisée comme colle, déposée sur le canal microfluidique par transfert pour éviter de recouvrir les électrodes au centre du canal. Après alignement et mise en contact, le scellement est achevé par exposition de la totalité de la puce aux UVs et recuit.

Protocole détaillé :
Un promoteur d'adhésion est indispensable à la tenue de la SU8 50 sur du verre. De l'Omnicoat (MicroChem) est donc étalé sur la lame à 3000 rpm pendant 30 s, puis recuit à 200 $^\circ$C pendant 2 min. La SU8 50 est étalée lorsque la résine est à température ambiante à 500 rpm pendant 10 s puis 3000 rpm pendant 30 s. Un recuit pour évaporer le solvant est fait à 65 $^\circ$C pendant 5 min puis à 95 $^\circ$C pendant 20 min. Ce recuit à deux températures permet d'éviter que la résine ne craquelle sous l'effet d'une élévation de température trop rapide. La lame est ensuite alignée avec le masque grâce à des motifs de type "croix-carrés" présents sur le niveau d'électrodes et le masque puis exposée pendant 10 s à un flux de 18 $mW.cm^{-2}$ @365 nm et de 32.9 $mW.cm^{-2}$ @405 nm. La SU8 étant une résine très visqueuse, elle ne peut être mise en contact avec le masque. La lame est donc approchée manuellement au plus proche du masque. Étant une résine négative, l'exposition aux UVs va initier la polymérisation des chaînes époxy, dont la réticulation est accélérée par la chaleur. Un recuit post-insolation est nécessaire, en chauffant la lame 1 min à 65 $^\circ$C puis 5 min à 95 $^\circ$C. Les motifs sont révélés en plongeant la lame dans le dévelop-

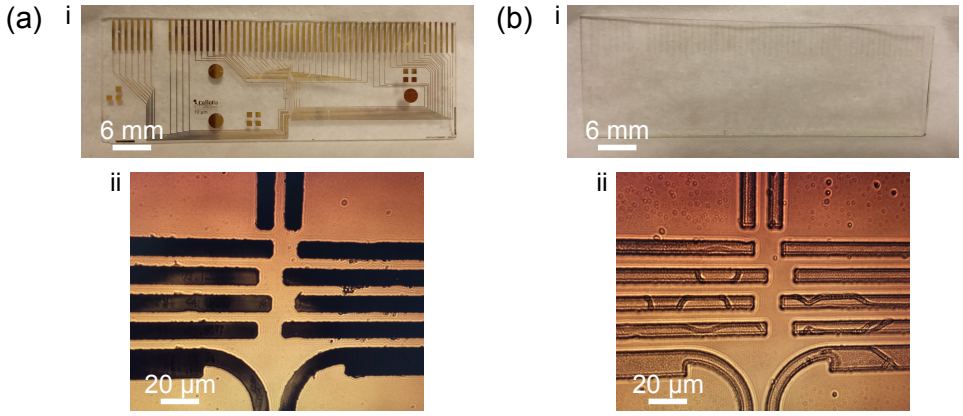


FIGURE 2.3 – **Observation des puces après gravure et retrait de la résine.** (a) Électrodes en or et (b) en ITO. Une photo globale de la puce est montrée (i) ainsi qu'une image sous microscope en illumination par transmission (ii). Les électrodes d'or apparaissent opaques (noires) tandis que seuls les contours sont observables pour les électrodes en ITO.

peur de la résine (SU8 developer, MicroChem) pendant 6 *min* sous agitation constante. La réaction est stoppée dans un bain d'isopropanol, puis l'échantillon est séché sous flux d'azote.

La lame du haut est percée par une fraiseuse numérique, qui permet un perçage fiable et précis à partir d'un fichier réalisé sur un logiciel de Conception Assistée par Ordinateur (SolidWorks, Dassault). Le protocole de transfert de la couche servant de glu entre les deux niveaux est basé sur les travaux de *Salvo et al*[89] et est illustré dans la figure 2.4(b).
Un échantillon de silicium est clivé à la taille du canal microfluidique. Une couche de polydiméthylsiloxane (*PDMS*) est étalée à 3000 *rpm* pendant 60 *s* puis recuite à 100 $^\circ$C pendant 2 *h* pour assurer une polymérisation totale. Une feuille de polyimide (film Kapton 75 μm, Dupont) est déposée avec précaution pour ne pas former de bulles sur le PDMS. Ce dernier assure une adhésion réversible du film. La hauteur visée de SU8 sur le polyimide est d'environ 15 μm, et est réalisée en étalant de la résine SU8 2050 diluée à 17 % dans du cyclopentanone (SU8 2000 Thinner, MicroChem) à 3000 *rpm* pendant 30 *s*. Le recuit est fait à 65 $^\circ$C pendant 50 *s*, pour évaporer partiellement le solvant. Le but ici est de pouvoir transférer la résine sur le canal, et donc qu'elle ne soit pas trop "sèche". Mais avoir une quantité de solvant trop importante rend la résine trop fluide et cette dernière a tendance à s'écouler dans le canal microfluidique et couvrir les électrodes lorsque les deux lames sont scellées ensemble. Il faut donc trouver l'équilibre optimal pour que la résine conserve ses propriétés adhésives tout en n'étant pas trop liquide.

L'alignement entre la lame du bas (composée des électrodes et du canal microfluidique couvert par la résine) et la lame du haut (percée) se fait sur l'aligneur de masque, en fixant par capillarité la lame du haut sur un masque de quartz vierge. Une fois les deux niveaux alignés (par des motifs croix-carrés), ils sont mis en contact (pression 1,5 *bar*), et la totalité de l'échantillon est soumise aux UVs pendant 3,5 *s*. Un recuit post-insolation est réalisé pour sceller définitivement les deux niveaux ensemble pendant 5 *min* à 65 $^\circ$C.

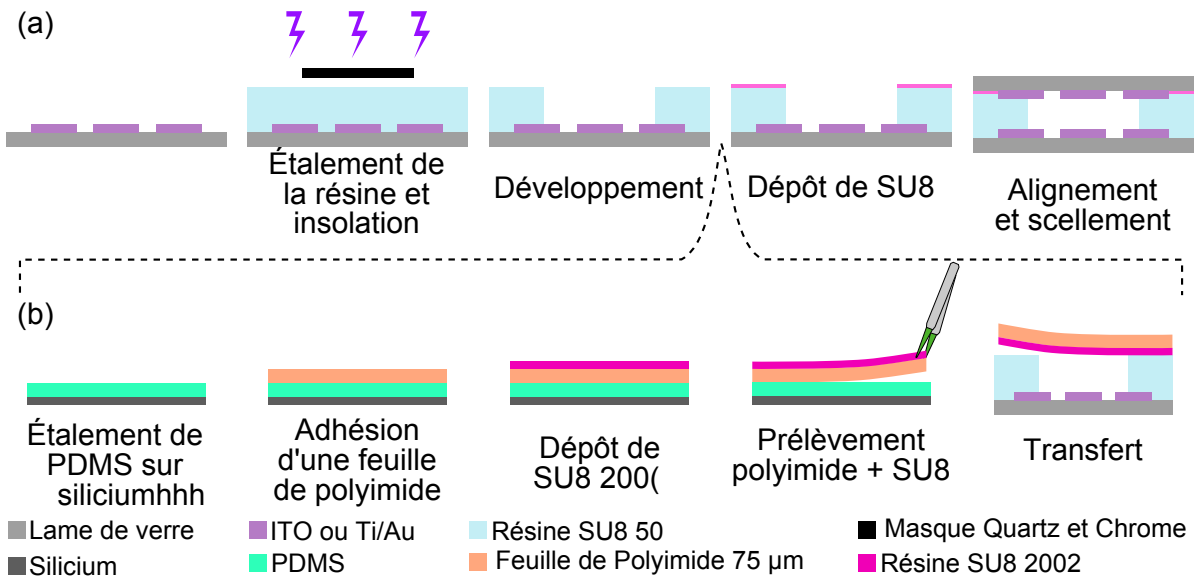


FIGURE 2.4 – **Schéma des étapes de fabrication d'une puce 3D.** (a) Fabrication et assemblage de la puce. (b) Détail du scellement de la puce entre le canal microfluidique et la lame du haut. Un canal microfluidique de 40-50 μm est fabriqué dans la résine SU8 50, puis la lame du haut préalablement percée est scellée grâce à la présence d'une fine couche de SU8 2002 déposée par transfert sur le canal microfluidique.

2.1.2 Traitement de surface

De par leur taille, les cellules tendent à sédimenter rapidement et à s'adsorber sur le verre qui compose la puce électro-microfluidique. Une fois en contact avec la surface, les forces d'adhésion sont plus fortes que celles imposées par le champ électrique généré par les électrodes, et il n'est plus possible de déplacer les cellules par diélectrophorèse. Il est donc important de prévenir l'adsorption en traitant la surface par une molécule anti-adhésive. Les puces sont donc plongées dans un bain d'albumine de sérum bovin à 0.1 % (BSA, pour *bovine serum albumin*) pendant une nuit, à température ambiante. Après un rinçage avec un tampon phosphate salin (PBS, pour *phosphate buffered saline*), les puces sont séchées sous flux d'azote et prêtes à être employées. Elles sont utilisées en diélectrophorèse entre une et trois fois avant d'être traitées de nouveau.

2.1.3 Banc de diélectrophorèse

La plateforme sur laquelle sont réalisées les expériences de cette thèse a été montée précédemment à mon arrivée [45]. Elle permet la connexion électrique avec la puce et l'observation de l'échantillon. Elle est composée de deux modules principaux (qui sont plus détaillés dans l'Annexe B) :

— Module électrique (Module 1, en rouge, sur la figure 2.5) : la puce électro-microfluidique est insérée dans un connecteur ZIF, qui assure le maintien mécanique d'une part et la connexion électrique d'autre part. Les connecteurs sont reliés aux générateurs par des nappes électriques, en passant par un boîtier électronique qui permet d'adresser de manière individuelle ou collective les électrodes.

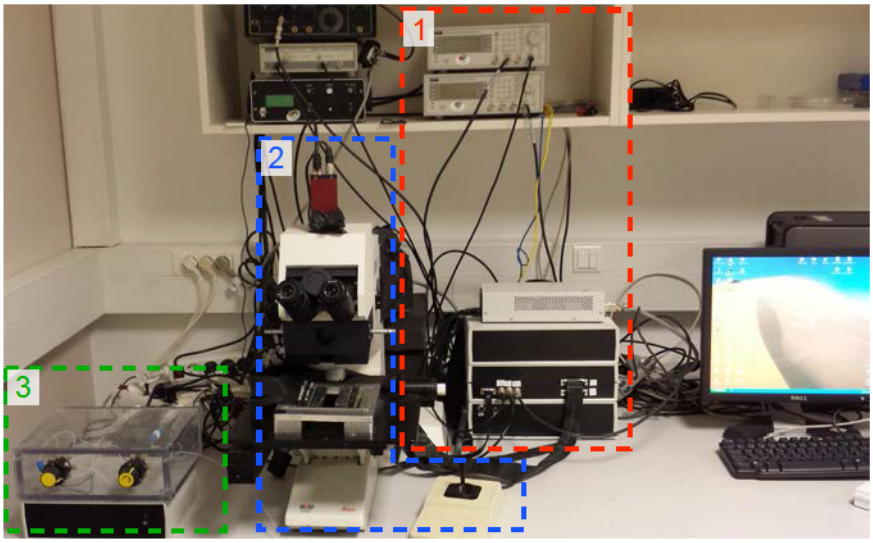


FIGURE 2.5 – **Vue d'ensemble de la plateforme.** 1- Modules électrique et de redirection du courant, 2- Connexion électrique, support et visualisation de l'échantillon et 3- Module microfluidique.

— Module de visualisation (Module 2, en bleu) : les connecteurs ZIF sont montés dans un support en aluminium, fixé à une platine motorisée (Markhauser) permettant de déplacer le champ d'observation lorsque l'échantillon est connecté électriquement. Une caméra CCD couleur (Manta G201C, Allied Vision Technologies) permet la capture d'images à une résolution de 1624*1234 *px* et une fréquence d'enregistrement de 14 images par seconde.

L'intégralité de la plateforme est pilotée par un logiciel développé sous Labview (National Instruments). Ce dernier permet le contrôle du module électrique, en choisissant le voltage et la fréquence de sortie de chaque générateur. Il est également possible d'entrer une séquence de potentiels sur une ou plusieurs électrode(s) dans un temps imparti, via un fichier texte écrit manuellement. L'activation des électrodes est également contrôlée via ce logiciel, avec pour chacune le choix d'être raccordée au premier ou au second générateur. Par défaut, toutes les électrodes non activées sont reliées à la masse.
L'interfaçage de la caméra avec Labview permet de visualiser et d'enregistrer des images ou des vidéos à partir de l'image totale ou d'une région d'intérêt. Le temps d'acquisition de la caméra peut être ajusté, en essayant d'obtenir l'équilibre optimal entre l'acquisition d'une image claire et une fréquence d'enregistrement correcte (au moins 10 *ips*, *ie* images par seconde).

2.1.4 Illuminations et observation de la puce

Sur le microscope du banc d'expérimentation, plusieurs types d'illuminations sont disponibles, et s'accordent plus ou moins bien à la visualisation de cellules en suspension. La plus utilisée est la microscopie en champ clair, par transmission. Elle permet de distinguer le contour des cellules et de superposer une deuxième illumination, par fluorescence notamment.

Le microscope est équipé pour visualiser de la fluorescence dans un seul spectre ou dans plusieurs (multi-fluorescence en direct). Le dernier type d'illumination est l'éclairage en champ sombre, mais qui est peu adapté à la visualisation de cellules, ces dernières étant peu réfringentes. Les différents principes d'illumination ainsi que l'observation des cellules sont détaillés en annexe (Annexe C).

2.2 Matériel Biologique

En première partie, nous traiterons le milieu de suspension utilisé pour la diélectrophorèse. Ensuite, nous détaillerons les lignées choisies, ainsi que leurs protocoles de culture respectifs. Pour terminer, nous présenterons les protocoles de modification des membranes plasmiques des cellules, que ce soit par voie chimique ou biologique.

2.2.1 Choix des milieux de suspension pour la diélectrophorèse

La diélectrophorèse s'applique ici sur des cellules en suspension. Comme il a été mentionné au chapitre 1, la conductivité du milieu a une grande importance sur la réponse des objets en suspension : plus faible est la conductivité, plus importante est la force de diélectrophorèse (à voltage égal). Les cellules doivent donc se trouver dans un milieu à faible conductivité, ce qui exclut les milieux de culture (σ = 1,38 S/m pour le DMEM).

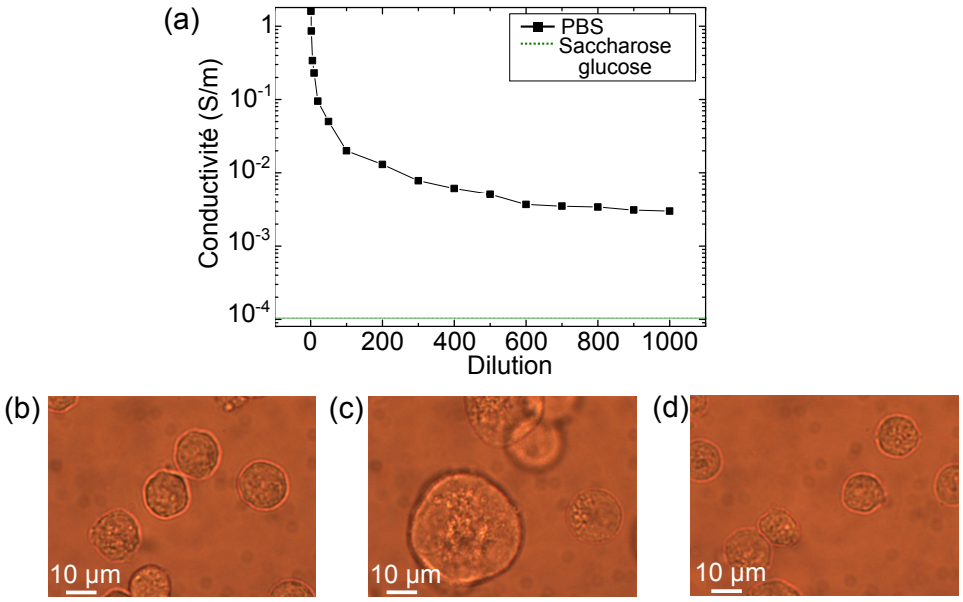


FIGURE 2.6 – **Évolution de la conductivité et de la pression osmotique en fonction du milieu.** (a) Conductivité du PBS après dilution. (b-d) Photos des cellules après une minute en suspension dans (b) du PBS, (c) du PBS dilué au $^1/_{5^e}$, (d) du saccharose-glucose à 8,5 - 0,3 % (p/v).

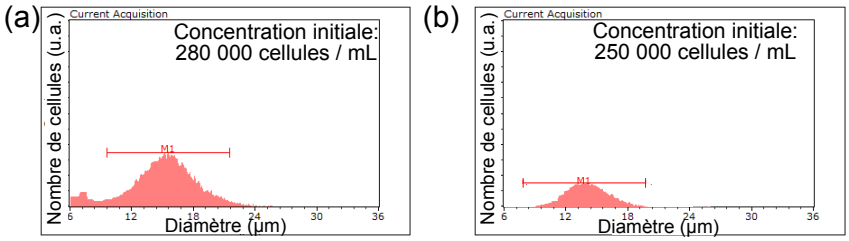


FIGURE 2.7 – **Viabilité cellulaire selon le milieu de suspension.** (a) Dans du DMEM. (b) Dans du saccharose-glucose à 8,5 - 0,3 % (p/v), après 5h à température ambiante.

Cependant, la pression osmotique doit être similaire au cytoplasme pour empêcher les cellules de gonfler ou de s'effondrer. Par exemple, en cas de pression osmotique du milieu plus faible que celle de la cellule, cette dernière va augmenter son volume (figure 2.6(c)) en faisant entrer du milieu, afin de diluer la salinité de son cytoplasme pour conserver un équilibre osmotique avec le milieu environnant (et inversement).
La dilution du PBS, tampon de conservation des cellules, même au $^1/_{1000^e}$, ne permet pas d'atteindre une conductivité inférieure à 10^{-2} S/m, et entraîne le gonflement systématique des cellules à partir de faibles dilutions (figure 2.6(a,c)). Un tampon composé de saccharose et glucose dans de l'eau déionisée a été préféré (8,5 et 0,3 %, respectivement, rapport poids/volume, [42]). Dans ce milieu, la pression osmotique est conservée, et donne accès à des conductivités de l'ordre de 10^{-4} S/m (figure 2.6(a,d)).
Afin de comparer la viabilité cellulaire, les cellules ont été placées à température ambiante dans du milieu de culture et dans le tampon saccharose-glucose pendant 5h. La concentration en cellules est mesurée avant et après grâce à une pipette électronique de comptage (Scepter^{TM}, Millipore, figure 2.7). Dans le milieu de culture, le nombre de cellules augmente, passant de 280 000 cellules/mL à 292 000. Le milieu de culture étant un milieu riche et parfaitement adapté, les cellules poursuivent leurs cycles de division cellulaire. Dans le tampon sucré, la concentration initiale est de 250 000 cellules/mL contre 135 500 cellules/mL après 5h, soit une diminution de 54 %. La pauvreté du milieu, composé uniquement de deux glucides, n'en fait pas un milieu optimal pour la vie cellulaire. Cependant, l'avantage apporté par une faible conductivité surpasse la survie moyenne des cellules dans ce milieu, d'autant que le temps d'expérience n'excèdera pas 30 minutes. La perte de cellules sera négligeable à l'échelle de notre temps de travail.

2.2.2 Culture de cellules

Une collaboration avec le laboratoire Biomics (CEA/iRTSV) a été établie tout au long de ces travaux pour l'approvisionnement et la culture de cellules. Celle-ci se fait au sein d'un laboratoire de sécurité biologique adapté (niveau L2). La température dans l'incubateur est régulée à 37 ° C, avec 5 % de CO_2 afin de maintenir le pH du milieu de culture. La manipulation des cellules durant les phases d'entretien des cultures et de prélèvement se fait en milieu stérile, sous un poste de sécurité microbiologique.
Les cellules adhérentes se cultivent en monocouches (figure 2.8(a-b)), sur une surface plastique traitée pour l'adhésion cellulaire jusqu'à couvrir entièrement la surface de la flasque (confluence). Lorsque les cellules couvrent 80 % de la surface ou plus, elles sont décollées puis diluées avant d'être remises en culture dans du milieu neuf (passage). Les cultures sont arrêtées au passage 20, pour limiter la dérive génétique.

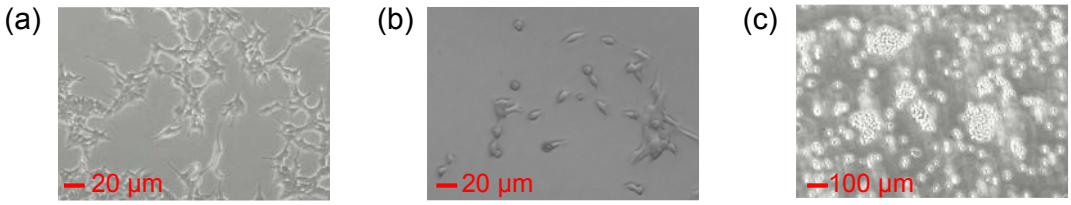


FIGURE 2.8 – **Culture cellulaire.** Photographies de cellules en culture : (a et b) Cellules adhérentes, de lignée HEK (a) ou LnCap (b). (c) Cellules en suspension de la lignée JURKAT. Les cellules adhérentes recouvrent la surface de la flasque en adoptant une forme aplatie et étirée, suivant les lignées, tandis que les cellules en suspension conservent leur forme sphérique, et se développent en amas tridimensionnels.

Les cellules JURKAT doivent être cultivées en suspension. En effet, étant des cellules circulantes dans le corps humain (cellules sanguines), elles ne s'ancrent pas sur un support pour croître. Le passage des cellules se fait lorsque celles-ci forment des amas de 15-20 cellules (figure 2.8(c)). Les amas sont cassés par pipetage dynamique, et les cellules sont remises en culture après dilution dans du milieu neuf.
Afin de pouvoir cultiver et conserver des cellules sur le long terme, des échantillons de culture sont congelés lors des premiers passages et conservés à -80 ° C(quelques mois) ou dans l'azote liquide (-200 ° C, plusieurs années). Les cellules sont congelées dans du sérum de veau fœtal auquel est ajouté un agent cryoconservateur (le diméthylsulfoxyde, DMSO, Sigma-Aldrich). Le protocole de congélation/décongélation est détaillé ci-après. Brièvement, pour une survie optimale des cellules, la descente en température doit se faire le plus lentement possible, et la remontée en température lors de la décongélation le plus rapidement possible.

➢ Lignées HEK, PC3, LnCap, PC3 et DU145

Tous les liquides utilisés pendant la culture cellulaire sont préalablement chauffés à 37 ° C pour éviter un choc thermique. Les cellules sont ensemencées à une concentration de 5.10^5 $cellules/mL$ dans une flasque de 25 cm^2 (Produit 353109, Corning Life Sciences) avec 5 mL de milieu : pour les HEK, dans du DMEM (pour *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco®) ; pour les autres lignées, le milieu est du RPMI 1640 GlutaMax™(Gibco®). Les deux sont supplémentés par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et des antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine, 1%) pour prévenir une contamination bactérienne.
Lorsque la confluence est égale ou supérieure à 80 % de la flasque (généralement atteinte en 2 jours), le milieu est retiré et la monocouche cellulaire est rincée deux fois avec du PBS (pour *Phosphate Buffered Saline*) sans calcium ni magnésium. 500 μL de Trypsine-EDTA (0,25 %, Sigma-Aldrich) sont ajoutés et la flasque est incubée à 37 ° C jusqu'à décollement total des cellules ($\approx$ 5 min). Les cellules sont ensuite resuspendues dans du DMEM ou du RPMI qsp 5 mL, comptées puis centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm. Le surnageant est éliminé et les cellules sont de nouveau resuspendues dans leur milieu indiqué avant d'être ensemencées à 5.10^5 $cellules/mL$.
Si 80 % de confluence ne sont pas atteints au bout de 2 jours, le milieu usagé est remplacé par du milieu neuf par simple pipetage, pour conserver un apport nutritif suffisant et éviter une éventuelle toxicité liée à une trop forte concentration de déchets relargués par les cellules.

➢ Lignée JURKAT

Les cellules sont ensemencées à une concentration de 5.10^5 $cellules/mL$ dans une flasque de 25 cm^2 dans 5 mL de RPMI 1640 GlutaMax™, supplémenté par 10 % de SVF et un mix d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine, 1%). Comme les cellules ne forment pas de tapis cellulaire mais des grappes, il est plus délicat de suivre leur division. Lorsque les agrégats atteignent environ 20 cellules, ils sont cassés par pipetage dynamique, puis les cellules sont comptées et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Le surnageant est éliminé et remplacé par du milieu neuf, puis les cellules sont réensemencées à une concentration de 5.10^5 $cellules/mL$.

➢ Lignées RWPE1 et dérivées (WPE1-NA22, WPE1-NB11, WPE1-NB26) Les lignées RWPE1 et ses dérivées sont cultivées dans une flasque T75 dans du milieu KSMF (Life Technologies), qui contient de la L-glutamine, de facteur de croissance (EGF, pour *epidermal growth factor*) et de l'extrait de glande pituitaire (BPE, pour *bovine pituitary extract*). Le milieu est complémenté avec 1% de pénicilline-streoptomycine. À 80% de confluence, le tapis cellulaire est rincé avec du PBS, et 1,5 mL de Trypsine-Lonza est ajouté. Après 10 min d'incubation à 37 °C, 3 mL de solution de neutralisation (TNS, pour *Trypsine Neutralisation Solution*) sont ajoutés pour stopper la réaction. Les cellules sont centrifugées 5 min à 1400 $tours/min$ maximum avant d'être réensemencées à une concentration de 8.10^5 à $1,2.10^6$ $cellules/mL$ (pour deux ou trois jours de culture sans passage).

➢ Congélation et décongélation de lignées

La décongélation des cellules avant la mise en culture doit se faire le plus rapidement possible, afin d'éviter une cytotoxicité induite par la concentration de DMSO. Le cryotube (Nunc) est immédiatement placé dans le bain-marie à 37 °C, pendant quelques minutes jusqu'à décongélation quasi-totale. Le contenu du tube (1 mL en général) est ensuite pipeté et placé dans 9 mL de milieu de culture, préalablement chauffé à 37 °C.
Les 10 mL sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 1500rpm. Le surnageant est éliminé et remplacé par du milieu neuf. Si les cellules sont sensibles, il est possible de répéter cette étape afin d'éliminer la totalité du DMSO. Les cellules sont ensuite comptées et ensemencées dans une flasque T25. Le milieu est changé après 24h pour être remplacé par du milieu neuf. Il est préférable de laisser les cellules se développer pendant 48 ou 72 h après décongélation, avant de les manipuler de nouveau, pour leur permettre de reprendre leur cycle de division normal.

Pour la congélation, les cellules sont décollées, comptées puis centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm. Les cellules sont resuspendues dans du SVF contenant 10% de DMSO à une concentration de 10^6 $cellules/mL$. L'ajout de DMSO doit se faire dans du SVF froid (5 °C), la réaction étant exothermique. Les échantillons sont ensuite aliquotés par 1 mL dans les cryotubes et placés dans une boîte de congélation. Cette boîte contient de l'isopropanol, et permet une descente graduelle en température lorsque celle-ci est placée à -80 °C. Quand les tubes sont congelés (après 24 ou 48h), ils peuvent être conservés à -80 °C pendant quelques mois ou placés dans l'azote liquide pour une conservation à plus long terme.

2.2.3 Modification chimique de la membrane

Des molécules affectant le fonctionnement des canaux ioniques ont été ajoutées aux suspensions cellulaires. Dans un cas, l'activité des canaux ioniques est augmentée (ionophore), dans l'autre elle est stoppée (bloqueurs des canaux ioniques). Les concentrations utilisées et le protocole de préparation est adapté à partir de publications scientifiques [18, 108, 70].
Les solutions de valinomycine, quinine et de vérapamil (Sigma-Aldrich) sont préparées dans l'éthanol absolu à des concentrations de 0.1, 200, et 70 mM, respectivement. 5 μL sont ensuite ajoutés à 5 mL de milieu de culture et incubés avec des cellules HEK pendant 1, 2 ou 8h, à

37 ° C, sous agitation légère. La concentration finale en éthanol ne doit pas excéder 0,1 % du milieu, afin de ne pas endommager les cellules.

2.2.4 Modification biologique de la membrane

La membrane des cellules a aussi été modifiée, par un processus d'extinction de gène via interférence ARN, sur des cellules HEK et des cellules LnCap. Les cellules sont cultivées dans des plaques 6 puits traitées pour la culture cellulaire (Falcon), dans un milieu sans antibiotiques. La transfection est réalisée 24 h après la mise en culture. Les ARN utilisés sont de petits ARN interférents, appelés siARN (pour *small interfering RNA*, FlexiTube®, Qiagen). Plusieurs ont été sélectionnés :

— témoin négatif de transfection : AllStars Negative Control
— témoin positif de transfection : AllStars Cell Death
— siARN SK3
— siARN TRPV6
— siARN TRPM8

Les ARN sont mélangés à un agent permettant le passage à travers la membrane plasmique (Lipofectamine®RNAiMax®, Life Technologies), dans un milieu optimal pour la transfection. Après incubation, les complexes ARN-Lipofectamine sont ajoutés à la culture cellulaire, à une concentration de 20 nM pour les ARN témoins et de 10 ou 20 nM pour les ARN d'intérêt. Après 72 h de transfection, les cellules sont collectées et analysées.
La transfection de siARN requiert un soin particulier de la part de l'expérimentateur. Les cellules étant cultivées sans antibiotiques, elles sont extrêmement sensibles aux contaminations (notamment bactériennes). De plus, les ARN sont dégradés par la ribonucléase (RNases), présente en abondance sur les surfaces et sur la peau. La préparation des cultures et des ARN doit donc se faire avec rigueur.

Le protocole détaillé de transfection est le suivant :
80 000 cellules sont ensemencées par puits dans une plaque 6 puits le jour 1, dans 2 mL de milieu dépourvu d'antibiotiques. (DMEM pour HEK, RPMI 1640 pour LnCap, complémentés par 10% de SVF). Un seul puits est rempli avec du milieu avec antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine, 1 %), afin de comparer la division des cellules dans les autres puits à partir d'un contrôle dans des conditions classiques de culture.
24 h plus tard, les ARN sont ajoutés dans chaque puits. Pour cela, ils sont au départ remis en solution dans 500 μL (ARN témoins, 5 nmol/tube) ou 100 μL (ARN d'intérêt, 1 nmol/tube) d'eau certifiée sans RNase (Qiagen), pour une concentration de 10 μM.
Des tubes A et B sont préparés et incubés séparément avant d'être mélangés. Le tube B peut être préparé dans un seul tube, en préparant un volume suffisant pour être réparti ensuite dans chaque puits.

La composition du tube A (pour chaque ARN) est :
— Pour les ARN témoins : 4 μL de solution mère d'ARN , pour une concentration dans le tube de 200 ou 400 $nmol/L$
— Pour les ARN d'intérêt : 2 ou 4 μL de solution mère d'ARN , pour une concentration dans le tube de 200 ou 400 $nmol/L$
— milieu OptiMEM qsp 100 μL

La composition du tube B (pour chaque ARN) est :
— 1,5 μL de Lipofectamine
— OptiMEM qsp 100 μL

Le milieu OptiMEM (Gibco) favorise la complexation des ARN avec l'agent de transfection. Les tubes A et B sont incubés séparément pendant 10 min à température ambiante. 100 μL du tube B sont ajoutés à chaque tube A, homégénéisés par aspiration/refoulement à la pipette. Le tube final est incubé 15 min à température ambiante pour laisser se former les complexes Lipofectamine-ARN.
Pour terminer, le milieu de culture des cellules est retiré et remplacé par les 200 μL de solution et 800 μL de milieu frais, toujours sans antibiotiques. La microplaque est agitée manuellement afin d'homogénéiser la composition de chaque puits et incubée à 37 $^\circ$ C.
Après 72 h de transfection, les puits sont observés au microscope, et les cellules sont décollées selon un protocole classique de passage : 2 rinçages au PBS, 5 min d'incubation avec 200 μL de Trypsine-EDTA à 37 $^\circ$ C, resuspension dans du milieu de culture et centrifugation avant resuspension finale dans le milieu désiré (milieu de culture ou de diélectrophorèse).

2.3 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons vu les différents matériels et protocoles utilisés tout au long de ce manuscrit.

La fabrication des puces électro-microfluidiques se fait par des procédés standards de photolithographie, sur des lames de verre couvertes d'or ou d'ITO, qui apporte l'avantage de la transparence des électrodes. Les puces subissent un traitement anti-adhésif pour éviter l'adsorption des cellules à leur surface. La plateforme d'expérimentation comporte un module électrique qui permet de rediriger le courant vers l'une des 56 électrodes disponibles, et un module de visualisation qui permet d'observer la réponse des cellules en temps réel. Leur forte réfringence empêche de les observer en champ sombre, illumination utilisée auparavant pour les études sur des microparticules. La visualisation se fait par transmission, et peut être doublée d'une illumination par fluorescence, si les cellules possèdent un marqueur fluorescent (protéine de fusion fluorescence, intercalant des acides nucléiques, etc).

Les cellules doivent également être placées en suspension dans un milieu de faible conductivité, conductivité qui ne peut être atteinte en diluant du milieu de culture ou du PBS. L'équilibre osmotique devant être préservé, les cellules sont placées dans un milieu composé de saccharose et glucose (8,5 et 0,3 %, respectivement). La conductivité du milieu est ajustée en ajoutant du milieu de culture (σ_{DMEM} = 1.36 S/m). Les lignées utilisées au cours de ce manuscrit sont diversifiées, allant de cellules non cancéreuses circulantes à des cellules mimant l'évolution du cancer de la prostate.

La culture de telles cellules se fait selon des protocoles standards, en respectant le rythme de passage selon la confluence de la monocouche cellulaire. Enfin, des modifications ont été apportées aux membranes plasmiques des cellules, par voie chimique (ionophores, agents bloqueurs des canaux ioniques) ou par voie biologique (extinction de gène par interférence ARN).

Chapitre 3

Électrocinétique de cellules humaines

Sommaire

3.1 Réponse de cellules humaines au champ électrique non uniforme en canal microfluidique . . . 43

3.1.1 Plage 1 : 1-10 kHz - Électro-osmose AC . . . 45

3.1.2 Plage 2 : $f < f_{x0}$ - diélectrophorèse négative . . . 46

3.1.3 Plage 3 : Autour de la fréquence de coupure - Rotation des cellules . . . 47

3.1.4 Plage 4 : $f_{x0} < f < f_{hx0}$ - diélectrophorèse positive . . . 49

3.1.5 Plage 5 : f_{hx0} - Deuxième fréquence de coupure et diélectrophorèse négative 51

3.1.6 Explication du comportement des cellules par un modème de compétition de forces . . . 51

3.2 Méthode de détermination expérimentale du facteur de Clausius-Mossotti 56

3.3 Méthode de détermination de la fréquence de coupure . . . 58

3.3.1 Développement d'une nouvelle méthode pour déterminer la fréquence de coupure . . . 58

3.3.2 Mesure de la vitesse de rotation par traitement vidéo . . . 58

3.3.3 Caractérisation de la méthode . . . 61

3.4 Conclusion . . . 63

Dans ce chapitre, des cellules humaines ont été soumises à un champ électrique alternatif dans une large gamme de fréquences, de différences de potentiel et de conductivités de milieu. Les différentes réponses des cellules en fonction du champ électrique appliqué sont rapportées. Un modèle de compétition de forces est développé pour expliquer ces comportements.

Dans une seconde partie, deux méthodes sont présentées pour caractériser les propriétés diélectriques des cellules. La première méthode est basée sur une caractérisation électrique dans l'intégralité de la gamme de fréquences, alors que la seconde se concentre autour de la fréquence de coupure. Les deux méthodes et leurs avantages et inconvénients respectifs sont caractérisés.

3.1 Réponse de cellules humaines au champ électrique non uniforme en canal microfluidique

Un champ électrique non uniforme appliqué dans une suspension génère plusieurs forces électrocinétiques (présentées au chapitre 1, paragraphe 1.2), qui vont agir sur le milieu et sur les cellules. Les forces électro-hydrodynamiques, comme l'électro-osmose et les forces électrothermiques, mettent en mouvement le liquide : les charges présentes dans la double couche électrique entre l'électrode et le milieu sont mises en mouvement par un champ électrique (électro-osmose) et/ou un gradient de température est formé par l'application d'un champ électrique (électrothermie). Dans les deux cas des rouleaux de convection se forment au-dessus de l'électrode, rouleaux

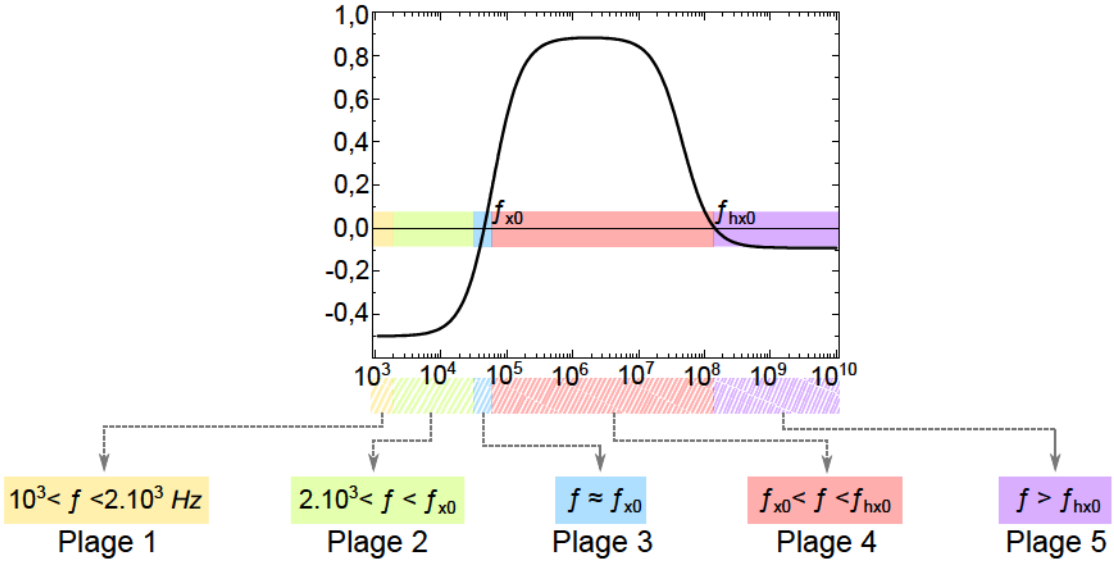


FIGURE 3.1 – **Plages de fréquences étudiées.** La réponse des cellules HEK est étudiée sur une gamme de fréquences allant de 10^3 à 10^9 Hz. Le comportement observé peut être décrit en 5 plages indépendantes.

dont la direction, la position et l'amplitude sont propres à chacune des forces. La diélectrophorèse est induite par la différence de pression électrostatique entre les cellules et le milieu, et met en mouvement les cellules elles-mêmes.
Le comportement des cellules soumises à un tel champ résulte de la compétition de ces trois forces. Pour les particules inorganiques, ces phénomènes ont été étudiés pour des champs électriques en 2D [77] ou en 3D [47]. Cependant, les cellules présentent des comportements qui leur sont propres, observés expérimentalement mais dont l'origine physique reste imprécise [13].
Dans cette partie, nous aborderons une étude complète de la réponse de cellules au champ électrique (figure 3.1). La gamme de fréquences étudiée varie entre 10^3 et 10^9 Hz. Elle peut se découper en 5 plages fréquentielles, où un comportement général différent peut être décrit pour chacune :

— $10^3 < f < 2.10^3$ Hz : basse fréquence,
— $2.10^3 < f < f_{x0}$ Hz : fréquences inférieures à la fréquence de coupure,
— $f \approx f_{x0}$: autour de la fréquence de coupure,
— $f_{x0} < f < f_{hx0}$: entre les deux fréquences de coupure,
— $f > f_{hx0}$: au-delà de la deuxième fréquence de coupure.

Les cellules utilisées sont des cellules HEK, qui sont des cellules épithéliales non cancéreuses classiquement utilisées pour tester l'efficacité et la reproductibilité de méthodes (*cf* la fiche ATCC^{TM} correspondante [1])

De manière générale, la réponse des cellules dépend de la fréquence, de la magnitude du champ appliqué et de la conductivité du milieu. Une magnitude plus grande (*ie* la différence de potentiel augmente et/ou si l'espace inter-électrodes diminue) tend à intensifier le résultat

1. www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx?$geo_country=$fr#generalinformation

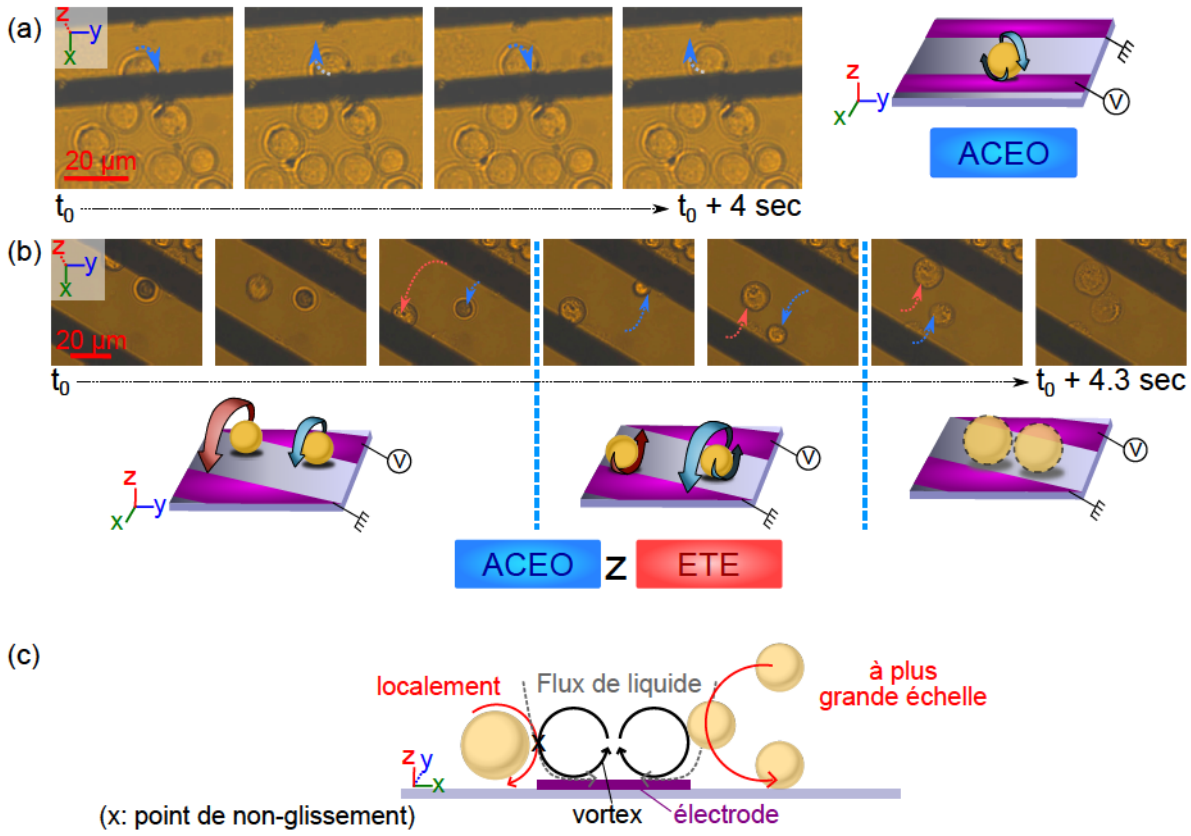


FIGURE 3.2 – **Observation de l'électro-osmose sur les cellules HEK.** Á basse fréquence ($f = 1 - 10.10^3\ Hz$, $\sigma_m = 2.10^{-4}\ S/m$), l'ACEO peut être couplée aux effets électrothermiques suivant la magnitude du champ : (a) magnitude modérée ($V = 2\ V_{pp}$) ou (b) magnitude forte ($V = 8\ V_{pp}$).

observé : si les cellules sont attirées par les électrodes, elles se déplaceront plus rapidement. Cependant, dans certains cas, comme à basse fréquence, l'augmentation de la magnitude modifie la réponse des cellules. C'est pourquoi, pour bien identifier l'impact de la magnitude, nous intégrerons donc l'influence des fortes différences de potentiel pour chaque gamme de fréquences.

3.1.1 Plage 1 : 1-10 kHz - Électro-osmose AC

À basse fréquence ($f = 10^3\ Hz$), les cellules tournent sur elles-mêmes autour de l'axe y, qu'elles soient isolées ou en contact avec d'autres cellules, pour toutes les conductivités testées ($2.10^{-4} < \sigma_m < 2.10^{-1}\ S/m$, figure 3.2(a)). L'électro-osmose est prédominante autour de ces fréquences, surtout à basse conductivité où les effets électrothermiques sont faibles (1.2). La figure 3.2(a) montre les cellules entraînées dans des rouleaux de convection, qui ont tendance à les rapprocher du centre de l'électrode. La largeur des électrodes et la taille des cellules sont du même ordre de grandeur ($\approx 10\ \mu m$), et ces dernières se retrouvent le plus souvent au bord de l'électrode plutôt qu'au centre. Les mouvements de convection du milieu entraînent les cellules, qui tournent sur elles-mêmes (autour de l'axe y) ou qui parfois se déplacent en suivant le rouleau.

Lorsque la différence de potentiel augmente (jusqu'à 8 V_{pp}), le déplacement des cellules devient plus anarchique et les cellules tendent à se détériorer, même à basse conductivité (σ_m = 2.10^{-4} S/m). En effet, à plus forte magnitude, les effets électrothermiques s'intensifient, causant la formation de rouleaux de convection dont le sens est donné par le facteur Π. Dans ces conditions d'expérimentation, Π est positif, et donc le milieu se déplace du centre de l'électrode vers le bord (paragraphe 1.2.1). Les rouleaux de convection tendent à repousser les cellules des électrodes, comme observé sur la figure 3.2(b). Ces déplacements rapides et brusques appliquent des contraintes de cisaillement sur la membrane de la cellule, qui finit par se déchirer. La destruction des cellules à σ_m = 2.10^{-4} S/m et V = 8 V_{pp} est observée en quelques secondes.

3.1.2 Plage 2 : $f < f_{x0}$ - diélectrophorèse négative

Dans les plages 2 et 4, la diélectrophorèse est la force dominante. Les cellules sont alors soit repoussées (plage 2), soit attirées (plage 4) des zones de forts gradients de champ (*i.e.* le bord de l'électrode). Ces deux plages couvrant presque 90 % des fréquences appliquées avec le générateur, l'attraction et la répulsion des cellules sont les mouvements les plus facilement observables.
Entre 10^3 Hz et f_{x0}, les cellules sont soumises à la diélectrophorèse négative. Pour rappel, la membrane des cellules se charge en réponse au champ appliqué et agit comme une barrière. Le dipole induit réagit en fonction de la différence de polarisabilité entre la membrane et le milieu. Même à faible conductivité, le milieu de suspension a une plus grande conductivité que la membrane, car il comporte plus de charges libres, et ce dernier est plus polarisable que la cellule. $Re[CMF(\omega)]$ est donc négatif et la cellule est moins polarisable que le milieu dans lequel elle est plongée. À basse fréquence, la membrane accumule les charges environnantes et le dipôle s'oriente dans le sens inverse au champ électrique. Lorsque la fréquence augmente, la membrane ne fait plus écran au champ électrique, permettant aux charges contenues dans le cytoplasme de réagir au champ appliqué. La cellule atteint alors la fréquence de coupure.

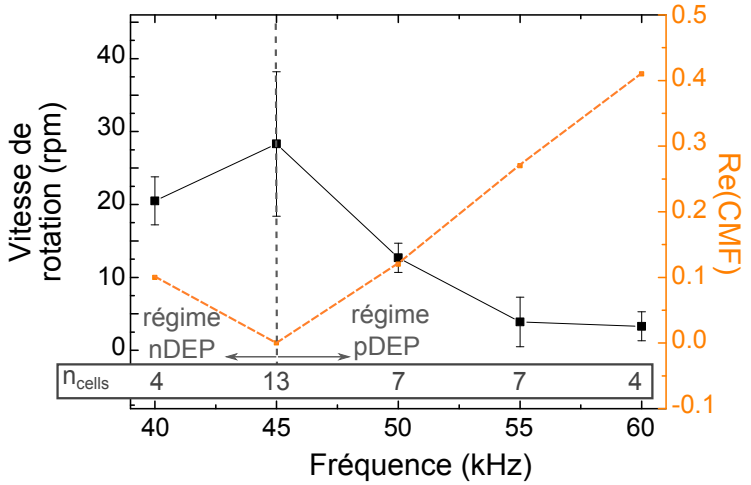


FIGURE 3.3 – **Évolution de la vitesse de rotation et de Re[FCM] des cellules HEK en fonction de la fréquence.** La vitesse de rotation est mesurée sur le nombre de cellules n_{cells} pour chaque point et le facteur de Clausius-Mossotti moyen est mesuré sur 10 cellules, à σ = 2.10^{-2} S/m pour des fréquences proches de la fréquence de coupure.

La réponse des cellules dans cette plage de fréquences est détaillée dans la figure 3.7, en même temps que la diélectrophorèse positive, les deux réponses étant homologues, seul le sens du mouvement est différent selon la plage de fréquences appliquée.

3.1.3 Plage 3 : Autour de la fréquence de coupure - Rotation des cellules

Dans la gamme de fréquences entourant la fréquence de coupure, le comportement des cellules dépend de la conductivité du milieu. On observe la rotation des cellules pour toute la gamme de conductivités testée. À basse conductivité ($\sigma_m \leq 2.10^{-4}\ S/m$), la fréquence de coupure est inférieure à $5.10^3\ Hz$ et la rotation des cellules est principalement due aux phénomènes d'électro-osmose, majoritaires à ces fréquences-là. Pour les conductivités plus élevées, lorsque la fréquence de coupure se situe hors du champ d'action de l'électro-osmose, la rotation des cellules semble induite par la compétition entre la diélectrophorèse et les forces électrothermiques.

À très basse conductivité ($\sigma_m \leq 2.10^{-4}\ S/m$), la fréquence de coupure se situe à basse fréquence ($< 5.10^3\ Hz$), pour les cellules eucaryotes avec une membrane plasmique sans paroi additionnelle. Les cellules ont alors une rotation similaire à celle détaillée dans le paragraphe 3.1.1. Dans cette gamme de fréquence, l'électro-osmose est dominante et il est difficile de discerner la fréquence exacte correspondant à la fréquence de coupure.
Pour des conductivités supérieures ($\sigma_m \geq 5.10^{-4}\ S/m$), la fréquence de coupure, qui varie avec la conductivité du milieu, se trouve au-delà de la fourchette d'électro-osmose. À $\sigma_m = 5.10^{-4}\ S/m$, les cellules ne présentent pas de rotation, ou alors très faible ($< 5\ rpm$, 3.5(b)). Dans cette gamme de conductivités, il est possible de déterminer visuellement la fréquence de coupure, en observant le moment où la cellule n'est ni attirée ni repoussée par les électrodes. Même si cette technique est subjective et applicable uniquement cellule par cellule, elle permet tout de même de déterminer approximativement la fréquence de coupure et est souvent utilisée pour séparer ensuite différents types cellulaires avec une fréquence de coupure statistiquement différente [20, 99, 63].

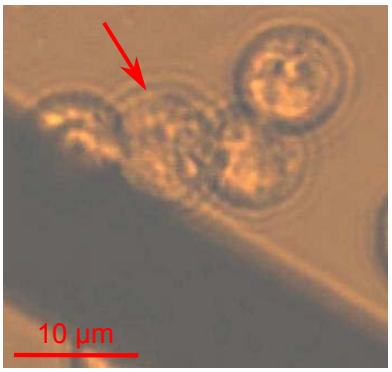


FIGURE 3.4 – Photographies de cellules au bord d'une électrode (en noir). Mise en évidence d'une cellule après détérioration (flèche rouge).

Pour les conductivités comprises entre $10^{-3}\ S/m$ et $10^{-1}\ S/m$, les cellules ont tendance à tourner sur elles-mêmes autour de l'axe y (selon la figure 3.5) pour les fréquences entourant la fréquence de coupure pour des différences de potentiel supérieures à 2 V_{pp}, comme décrit dans la figure 3.5(a). La vitesse de rotation a été mesurée en fonction de la fréquence et de la différence de potentiel à $\sigma_m = 10^{-2}\ S/m$ dont les valeurs sont tracées sur le graphique 3.5(c). La vitesse de rotation augmente avec la différence de potentiel, allant de 3 rpm à 2 V ($f = 45.10^3\ Hz$) jusqu'à 28 rpm à 10 V. Il existe une différence de potentiel optimale où les cellules ont une vitesse de rotation maximum sans être endommagées (ici, 10 V_{pp}). Pour des différences de potentiel supérieures (15 V_{pp}), la vitesse de rotation diminue à nouveau. Sans observer la destruction de la cellule, on peut observer une détérioration de la membrane, comme présenté dans la figure 3.4.

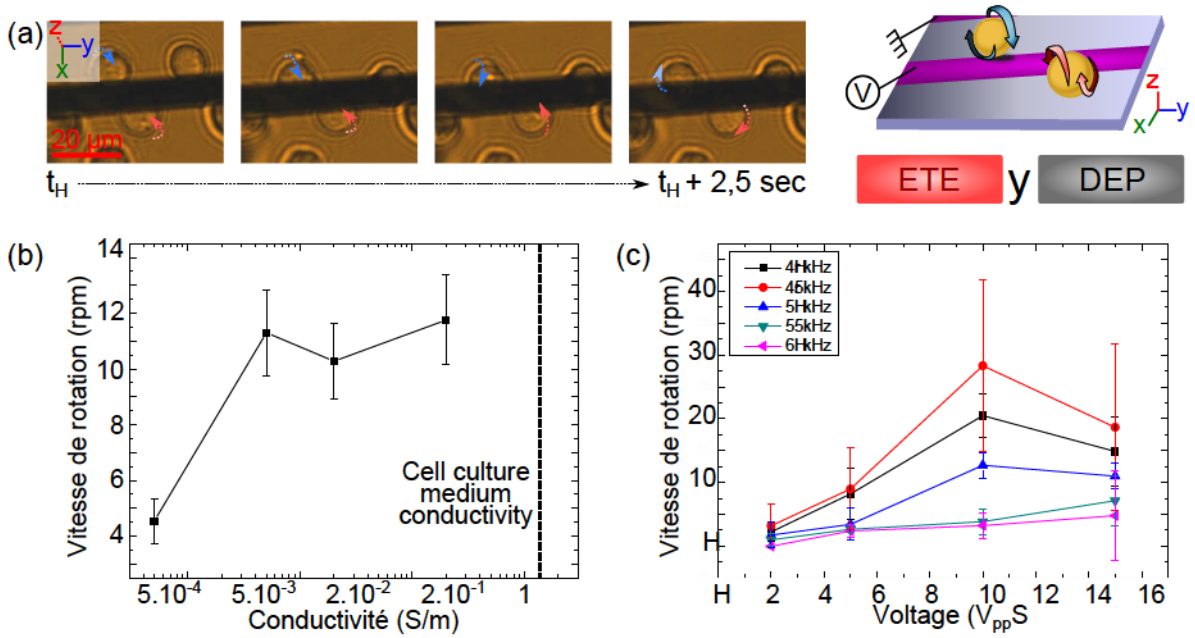


FIGURE 3.5 – **Rotation des cellules HEK.** (a) Photos de la rotation des cellules. La cellule effectue un tour complet en environ deux secondes, à $\sigma = 2.10^{-2}$ S/m, $f = 45.10^3$ Hz, et $V = 10$ V_{pp}. (b et c) Vitesses de rotation en fonction de (b) la conductivité du milieu, à $f \approx f_{x0}$, V = 3 V_{pp} et (c) la fréquence et la tension, à $\sigma = 10^{-2}$ S/m.

La fréquence est également un paramètre modifiant la vitesse de rotation. En observant la vitesse de rotation à 10 V_{pp}, la vitesse est maximale à 45.10^3 Hz puis de plus en plus faible pour les fréquences suivantes, respectivement : 40, 50 et 55-60 $.10^3$ Hz. Dans ces conditions d'expérimentation, la fréquence de coupure a été déterminée expérimentalement en observant la fréquence pour laquelle la cellule n'est ni attirée ni repoussée, en appliquant une différence de potentiel inférieure à 2 V_{pp} pour éviter l'apparition de la rotation induite par les effets électrothermiques. Ici, la fréquence de coupure est estimée à 45.10^3 Hz, fréquence à laquelle les cellules tournent le plus vite. En mesurant la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (1.3.1) des cellules HEK, il apparaît évident que la force de diélectrophorèse a une influence sur la vitesse de rotation des cellules. Comme le montre la figure 3.3, plus la force de DEP est faible (*ie* plus Re[FCM] est proche de 0), plus la rotation est importante.

Des particules de polystyrène fluorescentes de 1 μm et des cellules ont été soumises au champ électrique, afin de visualiser les mouvements du milieu dûs à des forces électro-hydrodynamiques, les particules agissant comme un traceur du fluide. Lorsque la cellule est en rotation, les colloïdes de polystyrène sont entraînés dans des vortex plus petits formés au-dessus du bord de l'électrode (figure 3.6). La présence de tels vortex indique la présence d'effets électrothermiques. Les particules suivent le mouvement de rouleaux de convection attractifs.
L'hypothèse concernant la rotation des cellules dans ces conditions est la compétition entre la diélectrophorèse et les effets électrothermiques, dûe à la dépendance en fréquence et en différence de potentiel, respectivement. En effet, les effets électrothermiques créent des vortex locaux centrés aux bords des électrodes et ont une vitesse de rotation d'autant plus importante que la

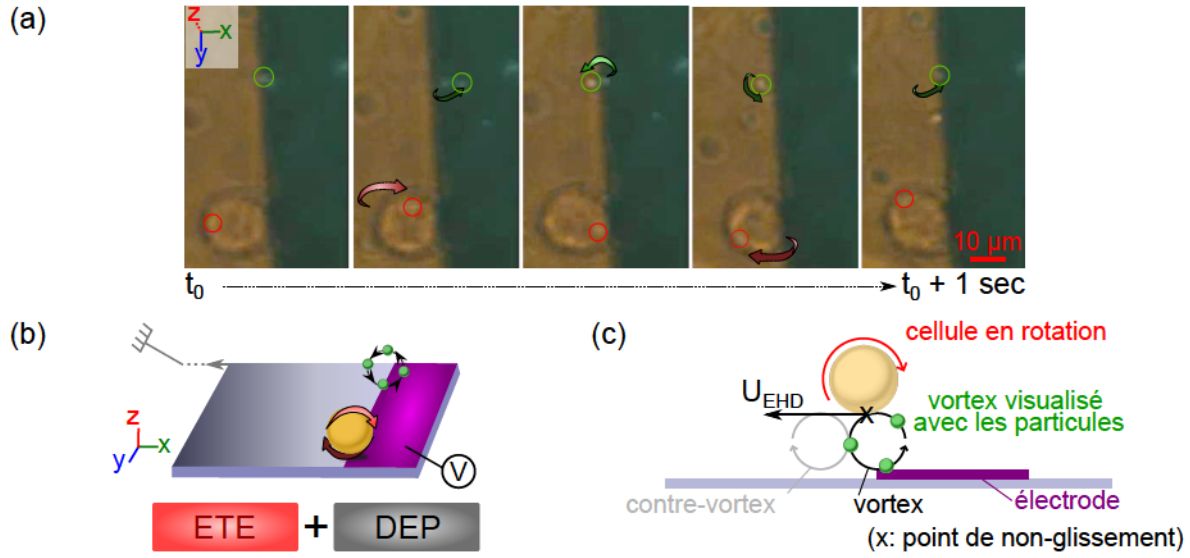


FIGURE 3.6 – **Observation des lignes de champ pendant la rotation des cellules.** (a) Photos de la rotation des cellules (en rouge) et des particules de polystyrène 1 μm (en vert) (f = 45 kHz, V = 3 V_{pp} σ = 2.10^{-2} S/m. (b) Représentation schématique de la rotation de la cellule (qui tourne sur elle-même) et des particules (qui sont entraînées dans des rouleaux de convection au-dessus de l'électrode. (c) Représentation schématique en coupe.

différence de potentiel est grande. Les vortex apparaissent clairement lorsque des particules de plus petite taille que les cellules sont ajoutées au milieu. De plus, la diélectrophorèse reste une force rapidement prédominante par rapport aux effets électrothermiques, expliquant pourquoi la rotation n'apparaît qu'autour de la fréquence de coupure, là où la force diélectrophorétique chute (démontrée par une modélisation mathématique, paragraphe 3.1.6). D'ailleurs, la vitesse de rotation est maximale à $f = f_{x0}$, lorsque Re(FCM) est minimal. Cette compétition de forces est développée plus loin dans un modèle, explicité au paragraphe 3.1.6.

3.1.4 Plage 4 : $f_{x0} < f < f_{hx0}$ - diélectrophorèse positive

Après la fréquence de coupure, l'intérieur de la cellule se polarise en réponse au champ appliqué. La conductivité du cytoplasme étant plus élevée que celle du milieu de suspension, la cellule devient plus polarisable que le milieu et est soumise à la diélectrophorèse positive.
Comme on peut le voir sur la figure 3.7, la force de diélectrophorèse dépend de la conductivité du milieu. À basse conductivité, les forces électro-hydrodynamiques, et plus particulièrement les effets électrothermiques, sont faibles (pour des différences de potentiel inférieures à 5 V_{pp}) et n'ont pas d'influence sur le mouvement de la cellule.
Lorsque σ_m augmente, la vitesse de déplacement de la cellule diminue dans les mêmes conditions de fréquence et différence de potentiel. La vitesse passe par exemple de 21,5 $\mu m/sec$ à σ_m = 2.10^{-4} à 13,2 $\mu m/sec$ à 2.10^{-3} S/m. (Figure 3.7$(a)_i$ et $(a)_{ii}$). La valeur du facteur de Clausius-Mossotti pour une même fréquence est plus basse à conductivité croissante, ce qui traduit une force diélectrophorétique plus faible.

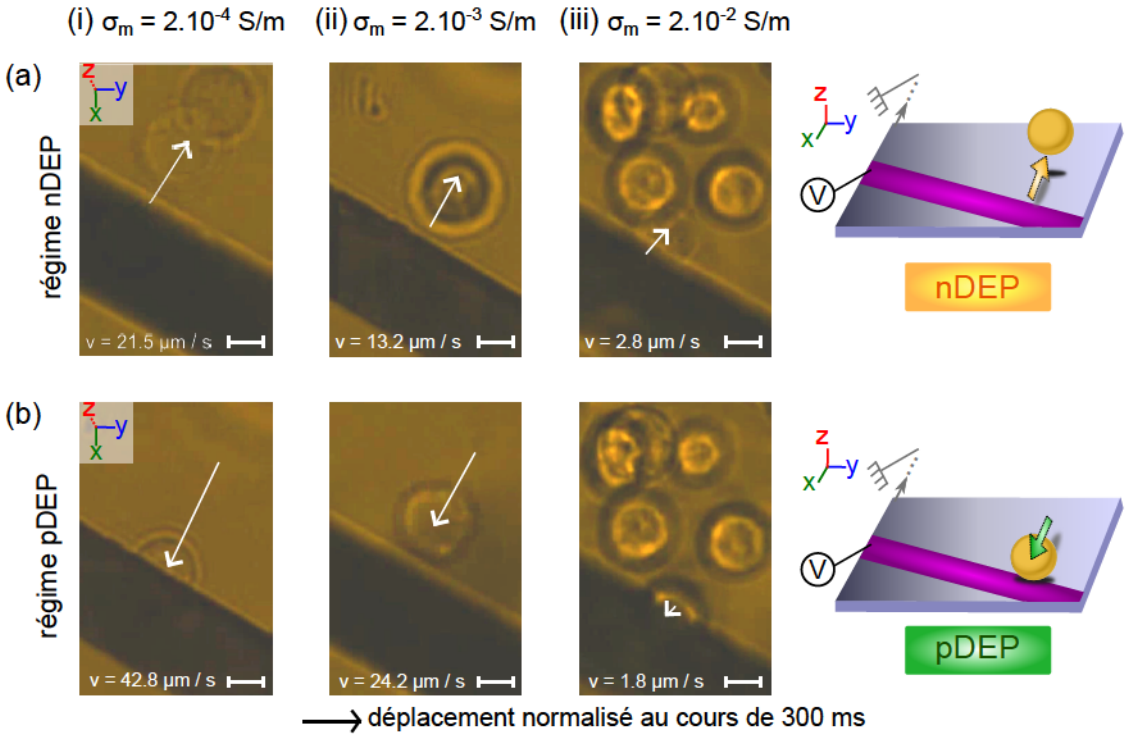


FIGURE 3.7 – **Réponse de cellules HEK à la diélectrophorèse.** Pour différentes conductivités de milieu : (i) ($\sigma_m = 2.10^{-4}\ S/m$), (ii) ($2.10^{-3}$), (iii) ($2.10^{-2}$). (a) Régime de diélectrophorèse négative, $f = 10^3\ Hz$. (b) Régime de diélectrophorèse positive, $f = 200.10^3\ Hz$. La flèche représente le déplacement de la cellule en 0.3 seconde, la photo étant la position finale. La barre d'échelle vaut 10 μm.

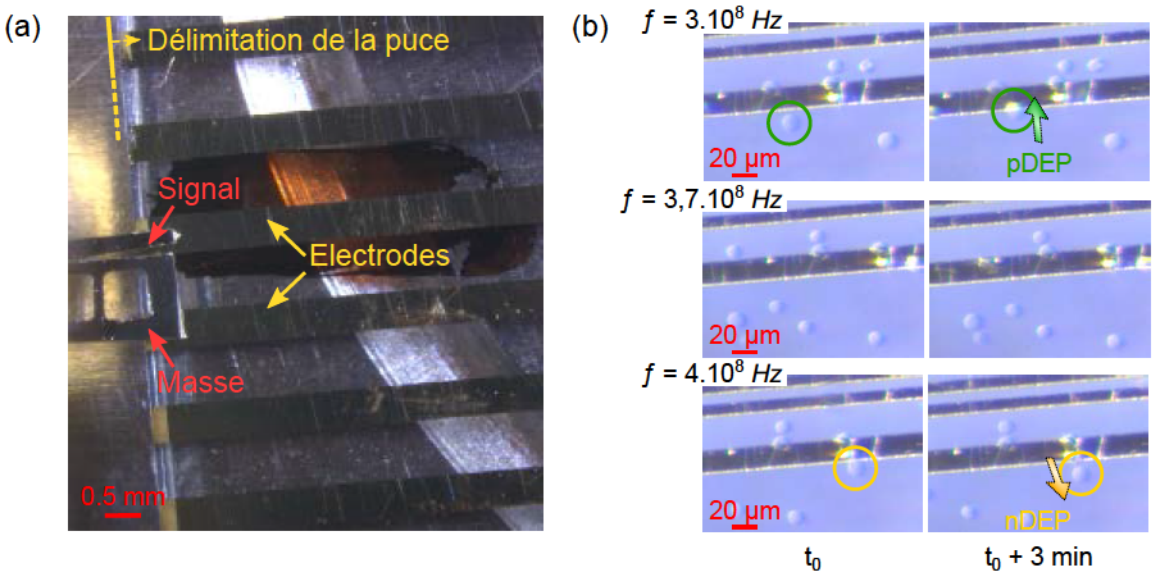


FIGURE 3.8 – **Réponse des cellules aux hautes fréquences.** (a) Photo de la connexion électrique de la puce sur la plateforme radio-fréquences associée. (b) Réponse des cellules à des fréquences de 3, 3.7 et 4.10^8 Hz ($\sigma_m = 2.10^{-2}$ S/m) après 3 minutes d'application du champ.

3.1.5 Plage 5 : f_{hx0} - Deuxième fréquence de coupure et diélectrophorèse négative

Lorsque $f > 100$ MHz, la polarisation du cytoplasme des cellules, malgré une conductivité élevée (de l'ordre du S/m), ne peut se stabiliser avant le changement de sens du courant. La cellule devient donc moins polarisable que le milieu qui l'entoure, et connaît une deuxième fréquence de coupure f_{hx0}.
Les cellules ont été soumises à un champ haute fréquence sur un équipement particulier, permettant l'application de champs radio-fréquences (en collaboration avec le laboratoire DACLE, du CEA-LETI). Cette fréquence de coupure a été simplement observée sur les cellules HEK, à la fréquence où les cellules ne sont ni attirées ni repoussées par l'électrode. À $\sigma_m = 2.10^{-2}$ S/m, cette fréquence se trouve à $3,7.10^8$ Hz, comme le montre la figure 3.8(b). La vitesse de déplacement des cellules est plus lente que pour les fréquences testées auparavant. Il faut attendre plusieurs minutes avant de pouvoir observer le déplacement des cellules par rapport à leur position initiale. À $f = 3.10^8$ Hz, les cellules sont attirées par l'électrode (diélectrophorèse positive), et elles sont repoussées à partir de $f = 4.10^8$ Hz(diélectrophorèse négative).

3.1.6 Explication du comportement des cellules par un modème de compétition de forces

À partir du modèle de *Castellanos et al.*,qui décrit la compétition de forces entre la diélectrophorèse et les forces électro-hydrodynamiques pour la modélisation du mouvement de particules colloïdales [10], un nouveau modèle a été établi pour les cellules.
Pour cela, différentes hypothèses de départ sont posées :

— Le champ électrique s'établit de façon semi-circulaire entre l'électrode active et les électrodes à la masse. La longueur des électrodes étant considérablement plus grande que

leur largeur (et l'espace inter-électrodes), cette dimension peut être négligée pour ne considérer qu'une représentation en deux dimensions (en coupe).

— Lorsque les cellules sont en suspension, elles adoptent une forme globale ronde (comme le montrent les figures précédentes), malgré les formes variées qu'elles adoptent en étant adhérées sur un support. Le modèle est donc valide pour des cellules de forme sphérique, mais pour des objets de géométrie différente, comme des bactéries, il doit être adapté, selon des principes abordés par *Gagnon et al.* [28].

— Pour permettre l'approximation des dipôles, l'ordre de grandeur du gradient doit être plus grand que celui des cellules, *ie* l'espace entre les électrodes doit être plus grand que la taille des cellules. Pourtant, dans la plupart des cas, cette hypothèse ne peut être validée, puisque l'intervalle est du même ordre de grandeur que la taille de la cellule ; par exemple, l'espace inter-électrodes peut être de 10 ou 20 μm, et les cellules ont un diamètre entre 15 et 30 μm. Il faudrait donc utiliser un modèle à multipôles pour prendre en compte la polarisation réelle de la cellule, modèle décrit par *Jones et al.* Cependant, ce modèle n'a pas d'influence sur la fréquence de coupure ni sur le comportement global observé [54]. Il n'est donc pas nécessaire de complexifier le modèle, puisque les paramètres d'intérêt ici n'en seront pas modifiés.

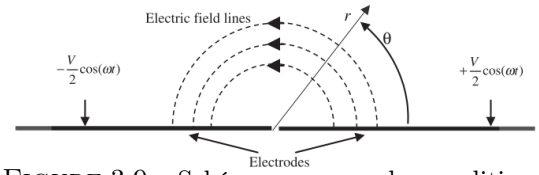


FIGURE 3.9 – Schéma en coupe des conditions du modèle, r étant la distance entre la cellule modélisée et le centre du système [10].

On ne tiendra compte ici que du modèle cœur-coquille présenté dans le chapitre 1 (paragraphe 1.2.4). La cellule est représentée comme une particule de conductivité σ_{cyto} et de permittivité ε_{cyto}, entourée d'une membrane de permittivité ε_{mem} et de capacité électrique C_{mem}. Finalement, la vitesse de déplacement d'une cellule soumise à la diélectrophorèse peut s'exprimer comme suit [57] :

$$u_{DEP} = \frac{\varepsilon_m a^2}{6\pi^2 \eta d^3} Re[CMF(\omega)] \, (cV)^2 \, t \tag{3.1}$$

a : diamètre de la cellule
$c = \Omega/\sqrt{1+\Omega^2}$
V : différence de potentiel crête-à-crête
t : durée de l'expérience

où

$$Re[CMF(\omega)] = Re\left[\frac{w^2(\tau_m\tau_1 - \tau_m^*\tau_3) - 1 + iw(\tau_m^* - \tau_1 - \tau_m)}{2 - w^2(\tau_m^*\tau_3 - 2\tau_1\tau_m) + iw(\tau_m^* + 2\tau_1 + \tau_m)}\right] \tag{3.2}$$

C_{mem} : capacité de la membrane plasmique,
$= \varepsilon_0\varepsilon_{mem}/\delta$
$\tau_1 = \varepsilon_m/\sigma_m$
$\tau_3 = \varepsilon_{cyto}/\sigma_{cyto}$
$\tau_m = aC_{mem}/\sigma_{cyto}$
$\tau_m^* = aC_{mem}/\sigma_m$

Il faut également prendre en compte le déplacement de milieu dû aux forces électro-hydrodynamiques. En effet, l'électro-osmose et les effets électrothermiques influent sur le milieu, et donc sur le déplacement de la particule. Ces forces hydrodynamiques s'ajoutent ou s'opposent avec la force de diélectrophorèse, perturbant le déplacement des cellules.

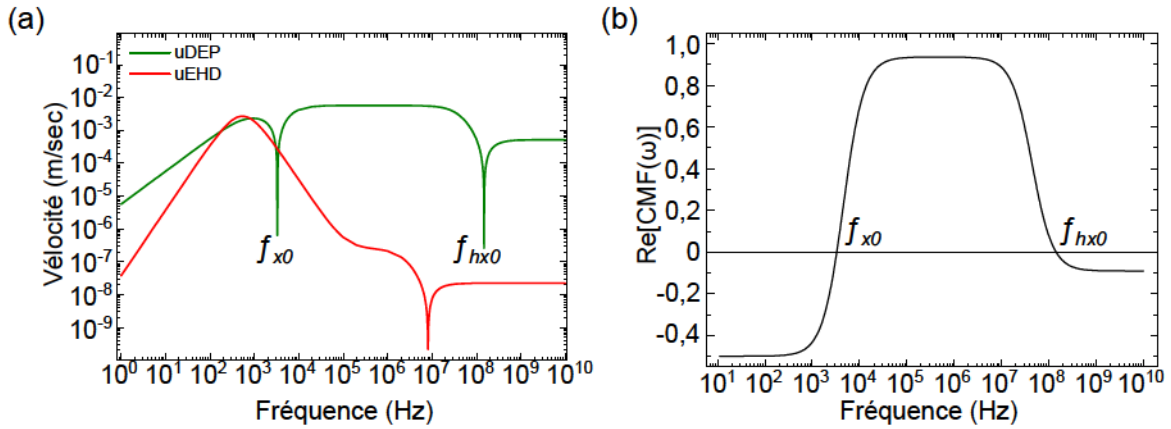


FIGURE 3.10 – Réponse théorique de cellules HEK à l'application d'un champ électrique non uniforme pour $\sigma_m = 5.10^{-4}\ S/m$ et $V_{pp} = 3\ V$. (a) Vitesse de déplacement de la cellule dû à la diélectrophorèse (en vert) ou aux forces électro-hydrodynamiques (en rouge) (b) Partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti.

Dans le modèle, la vitesse de déplacement globale du milieu correspond à la somme des déplacements induits par l'électro-osmose (équation 3.4) et l'électrothermie (équation 3.6).

$$u_{EHD} = u_{ACEO} + u_{ETE} \tag{3.3}$$

$$u_{ACEO} = 0.1\Lambda \frac{\varepsilon_m V^2}{\eta r} \frac{\Omega^2}{(1+\Omega^2)^2}\, t \tag{3.4}$$

$$\Omega = \Lambda \frac{w \varepsilon_m \pi r}{2\sigma_m \lambda_D},\ where\ \Lambda = \frac{C_S}{C_S + C_D}, C_D = \frac{\varepsilon_m}{\lambda_D}, \lambda_D = \sqrt{D\frac{\varepsilon_m}{\sigma_m}} \tag{3.5}$$

$$u_{ETE} = \frac{\varepsilon_m \sigma_m}{3a\pi\kappa\eta(\pi r)^3}\, \Pi(\omega)\, (cV)^4\, t \tag{3.6}$$

Ω : fréquence non dimensionnelle
t : temps d'observation
C_S : capacité de la couche de Stern, $C_S \sim 0.007 F.m^{-1}$
C_D : capacité de la couche diffuse

Le comportement du fluide soumis à l'électro-osmose peut être prédit en introduisant une fréquence non dimensionnelle Ω. Il dépend également du facteur Λ, qui décroît lorsque la conductivité augmente (la capacité de la couche diffuse C_D augmentant). Les effets électrothermiques sont quant à eux dépendants du facteur Π, (comme expliqué dans le paragraphe 1.2.1).
Le comportement théorique de cellules HEK, en fonction de la fréquence est présenté sur la figure 3.10(a). La vitesse de la cellule soumise à la diélectrophorèse (figure 3.10, en vert) s'effondre à deux endroits, correspondant aux fréquences de coupure f_{x0} et f_{hx0} que l'on retrouve sur la figure 3.10(b).

Globalement, les forces électro-hydrodynamiques (en rouge) sont toujours plus faibles que la diélectrophorèse (en vert), mais on peut tout de même identifier trois zones d'intérêt. Aux alentours de $5.10^2\ Hz$, les forces électro-hydrodynamiques surpassent la diélectrophorèse. La force prédominante est l'électro-osmose qui induit des rouleaux de convection qui attirent la cellule au bord de l'électrode. Dans cette étude, les fréquences inférieures à $10^3\ Hz$ ne sont jamais

appliquées pour ne pas endommager les cellules. À 10^3 Hz, les vélocités induites par la diélectrophorèse et les forces électro-hydrodynamiques sont très proches ($6,5.10^{-3}$ et $5,2.10^{-3}$ $m.sec^{-1}$, respectivement), ce qui montre une compétition de forces à ces fréquences. L'électro-osmose est toujours la force dominante des forces électro-hydrodynamiques, même si l'électrothermie s'intensifie avec la différence de potentiel.
Le second point d'intérêt se trouve au niveau de la première fréquence de coupure f_{x0}, où la vélocité induite par la diélectrophorèse diminue de 3 ordres de grandeurs (passant de 10^{-3} à 10^{-6} $m.sec^{-1}$). Les forces électro-hydrodynamiques deviennent à nouveau prédominantes devant la diélectrophorèse. L'électro-osmose est très faible après 10^3 Hz à ces conductivités-ci (paragraphe 1.2.1, figure 1.11(b)).
Finalement, le dernier point à soulever se trouve à 10^7 Hz, avec une chute de la vélocité. Après 10^5 Hz déjà, la vélocité induite par les forces électro-hydrodynamiques est 10000 fois plus faible que celle induite par la diélectrophorèse. Ce pic n'a donc pas d'effet direct sur le mouvement des cellules, mais il correspond au moment où les rouleaux de convection induits par les effets électrothermiques changent de sens (changement de signe du facteur Π). Les rouleaux de convection formés par les effets électrothermiques qui étaient attractifs lorsque $\Pi < 0$ (c'est-à-dire que le fluide se déplace de l'extérieur des électrodes vers le centre) deviennent répulsifs. On peut voir l'effet de ces rouleaux attractifs ou répulsifs lorsque des particules de polystyrène de 1 μm par exemple sont en suspension [47].

> La réponse des cellules à un champ électrique non uniforme résulte d'une compétition de forces entre la diélectrophorèse et les forces électro-hydrodynamiques (ACEO, ETE). Elle dépend donc très fortement des paramètres influençant ces forces, à savoir la fréquence et la différence de potentiel du champ appliqué, mais aussi la conductivité du milieu.
>
> À basse fréquence, l'électro-osmose est la force prédominante, entraînant la cellule dans des rouleaux de convection qui tendent à l'attirer vers le centre de l'électrode. À différence de potentiel élevée (V = 8 V_{pp}), les effets électrothermiques s'ajoutent de manière significative à l'électro-osmose et contribuent à la destruction des cellules.
>
> Autour de la première fréquence de coupure f_{x0}, la cellule présente une rotation pour des conductivités supérieures à 10^{-3} S/m. La vitesse de rotation dépend de la fréquence et de la différence de potentiel, laissant supposer une compétition entre la diélectrophorèse et les effets électrothermiques.
>
> Pour toutes les autres fréquences (2.10^3 et 2.10^7 Hz), la cellule est en diélectrophorèse négative, (*ie* repoussée des forts gradients de champ), quand Re[FCM(ω)] < 0, et en diélectrophorèse positive (attirée) quand Re[FCM(ω)] > 0. La vitesse de déplacement de la cellule dépend de la différence de potentiel et de la conductivité du milieu, avec une vitesse plus élevée à basse conductivité (2.10^{-4} S/m). Les forces électro-hydrodynamiques ne sont pas prédominantes, et ne perturbent pas le comportement des cellules, dans la gamme de différences de potentiel étudiée.

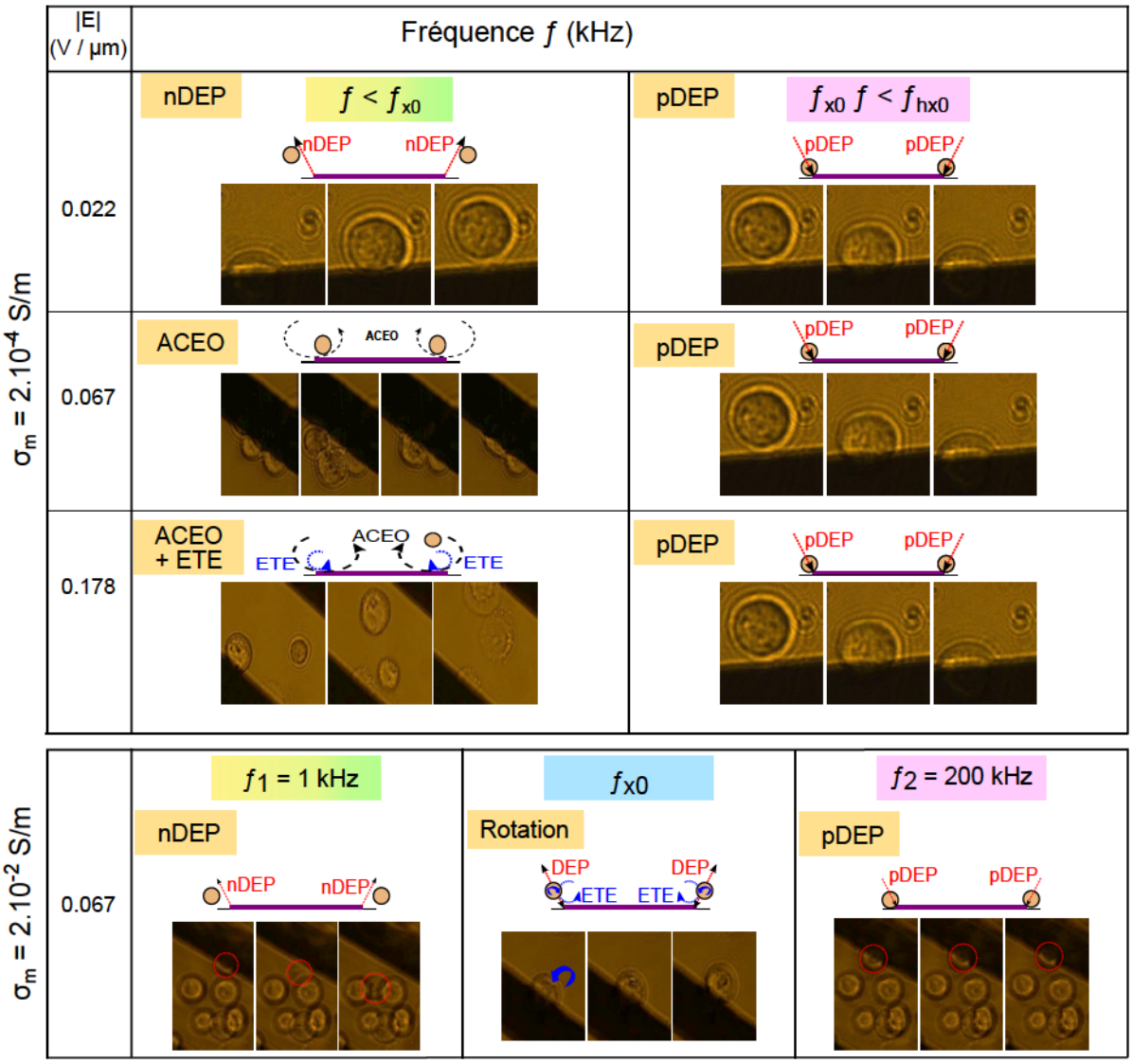


FIGURE 3.11 – **Tableau récapitulatif des réponses cellulaires sur la gamme de fréquences étudiée.** Photographies et schémas des comportements observés en fonction de la fréquence, de la magnitude et de la conductivité du milieu.

Un modèle a été établi pour calculer et comparer la vélocité de cellules HEK induite par la diélectrophorèse et par les forces électro-hydrodynamiques. La diélectrophorèse est la force majoritaire dans tous les cas sauf dans deux gammes de fréquences où les forces électro-hydrodynamiques surpassent la diélectrophorèse :

— Autour de 10^3 Hz : dans cette gamme de fréquences, l'électro-osmose est prédominante, formant des rouleaux de convection au-dessus de l'électrode. Les expériences confirment le modèle prédit.

— Autour de f_{x0} :les forces électrothermiques dominent. Des rouleaux de convection locaux sont formés, confirmant l'hypothèse émise dans le paragraphe 3.1.3 selon laquelle la rotation des cellules est dûe à une compétition entre la diélectrophorèse et les effets électrothermiques.

La figure 3.11 reprend les différents comportements observés ainsi que les forces en jeu pour chaque condition.

3.2 Méthode de détermination expérimentale du facteur de Clausius-Mossotti

Deux nouvelles techniques ont été développées à partir de l'analyse du comportement des cellules pour caractériser leurs propriétés diélectriques.
La première méthode est basée sur la mesure de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en exploitant la diélectrophorèse sur l'intégralité de la gamme de fréquences du champ appliqué disponible (10^3 – 5.10^6 Hz).
La mesure de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est basée sur l'équilibre des forces hydrodynamiques (paragraphe 1.3.1). Dans cette thèse, une nouvelle méthode a été élaborée, pour mesurer $Re[FCM(\omega)]$ sur des cellules, lorsque celles-ci se trouvent dans un régime de diélectrophorèse pure (sans interférence avec des forces hydrodynamiques). La valeur de $Re[FCM(\omega)]$ est alors reliée à la vitesse de déplacement de la cellule, selon l'équation 3.7.La norme du champ électrique est modélisée sous Comsol 4.0a, et la valeur est injectée dans l'équation 3.7.

$$Re[FCM(\omega)] = \alpha.U_{part} \text{ où } U_{part} = \frac{3\eta}{a^2\varepsilon_m\nabla|E|^2} \tag{3.7}$$

η : viscosité du milieu de suspension
ε_m : permittivité du milieu
a : diamètre de la cellule
$\nabla|E|$: norme du champ électrique

Pour atteindre ce régime particulier, la différence de potentiel appliqué ne dépasse pas 3 V_{pp} et la conductivité du milieu est faible pour limiter les effets électrothermiques. Les cellules sont suspendues dans du milieu saccharose-glucose (σ_m = 2.10^{-4} - 5.10^{-1} S/m). La fréquence de coupure est déterminée approximativement, puis les fréquences sont appliquées depuis les fréquences extrêmes vers la fréquence de coupure, alternativement entre nDEP et pDEP : de 10^3 Hz à 5.10^6 Hz, le plus souvent (figure 3.12(a). Ainsi, le déplacement des cellules est enregistré à chaque changement de fréquence, lorsque les cellules sont soumises uniquement à la diélectrophorèse.

Le traitement vidéo est réalisé avec ImageJ, grâce au module Mosaic dédié à la détection et au suivi de particules. Avec l'objectif utilisé sur le microscope, les cellules apparaissent trop grandes pour être détectées à part entière par ImageJ. Mais il est possible de venir détecter une partie de la cellule (souvent

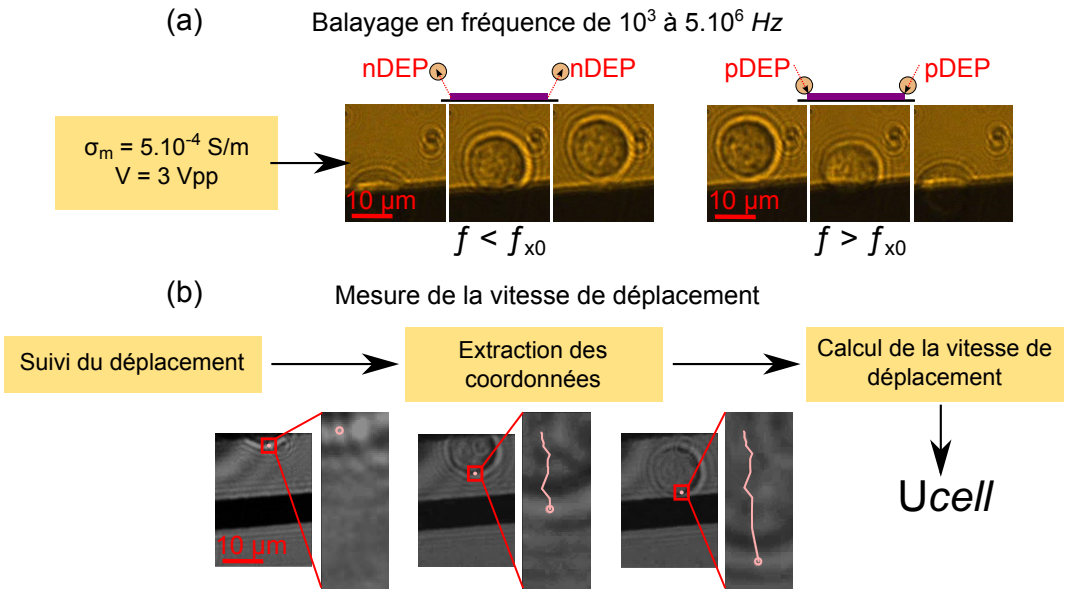


FIGURE 3.12 – **Protocole de mesure de** $Re[FCM(\omega)]$ **pour des cellules.** (a) Schémas et photographies de cellules HEK assujetties à différentes fréquences pour la mesure du facteur de Clausius-Mossotti. (b) Mesure de la vitesse de déplacement via ImageJ. (c) Calcul de $Re[FCM(\omega)]$.

au niveau de la membrane), partie qui est suivie tout au long de la vidéo (figure 3.12(b)). Les coordonnées de déplacement sont récupérées, et la vitesse de déplacement est mesurée en fonction de la distance parcourue sur le nombre d'images étudiées. Selon la fréquence d'enregistrement du film, la vitesse est au final ramenée en $\mu m/sec$ (dans l'exemple donné ici, U_{cell} = $4,58$ $\mu m/sec$).
Le facteur de Clausius-Mossotti est mesuré ainsi pour chaque fréquence d'intérêt, pour une même cellule, et l'opération est répétée sur 5 ou 10 cellules d'une même lignée pour obtenir une valeur moyenne (figure 3.13). La répartition des fréquences de coupure est tracée sur la figure 3.13(c). On obtient la valeur moyenne, mais également l'écart-type (SD, pour *standard deviation*). Les cellules présentent une réponse diélectrophorétique classique, négative à basse fréquence et positive à haute fréquence. La réponse des cellules, et principalement la fréquence de coupure, étant très sensible à la conductivité du milieu, cette dernière est maintenue faible et constante pour toutes les mesures (σ_m = 5.10^{-4} S/m). Le milieu est composé de saccharose-glucose (8,5 - 0,3 %, p/v) dans l'eau déionisée ($\sigma_{eauDI} \approx 2.10^{-4}$ S/m). La conductivité est ajustée en ajoutant du milieu de culture RPMI (σ_{RPMI} = $1,38$ S/m) et mesurée précautionneusement avec un conductimètre.

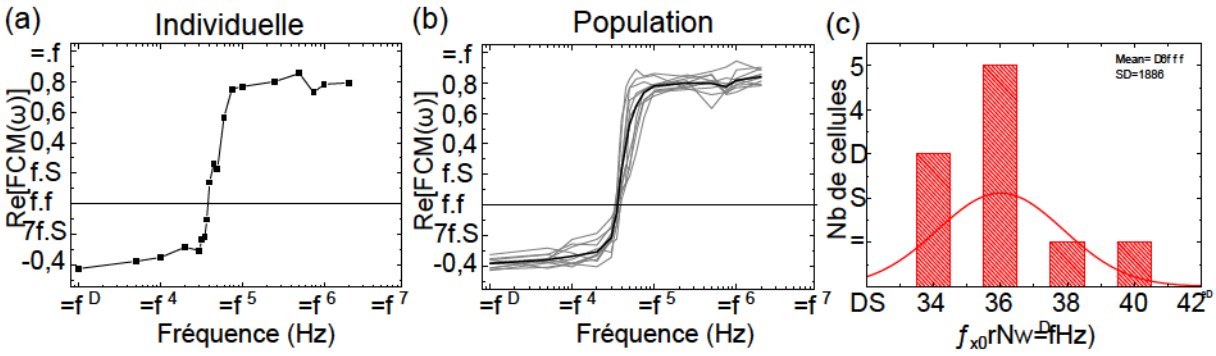


FIGURE 3.13 – **Facteur Clausius-Mossotti de cellules HEK.** (a) Mesuré pour une seule cellule, de 10^3 à 2.10^6 Hz. (b) Dispersion des facteurs de Clausius-Mossotti pour 10 cellules HEK (en gris clair) et moyenne (en noir, en gras), à $\sigma_m = 5.10^{-4}$ S/m. (c) Répartition des fréquences de coupure, calcul de la moyenne et de la déviation standard.

> En se basant sur la totalité de la gamme de fréquences, la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti des cellules a été mesurée, en exploitant la diélectrophorèse et plus particulièrement pendant des phases de diélectrophorèse pure, sans interférence avec les forces hydrodynamiques. La mesure est faite pour chaque cellule et permet d'obtenir un facteur de Clausius-Mossotti moyen pour une population donnée, dans des conditions établies de conductivité du milieu.
> Après attraction ou répulsion des cellules pour chaque fréquence d'intérêt, le facteur de Clausius-Mossotti pour chaque fréquence est calculé à partir de la vitesse de déplacement des cellules (mesurée par traitement vidéo) et reporté sur une courbe. La fréquence de coupure correspond à la fréquence où $Re[FCM] = 0$.

3.3 Méthode de détermination de la fréquence de coupure

3.3.1 Développement d'une nouvelle méthode pour déterminer la fréquence de coupure

La seconde méthode développée est basée sur la rotation des cellules observée autour de la fréquence de coupure. Les mesures se concentrent donc autour de la fréquence de coupure. De plus, cette méthode fait intervenir un équilibre entre la diélectrophorèse et les forces électro-hydrodynamiques.
Brièvement, la rotation des cellules est observée autour de la fréquence de coupure à $\sigma_m = 2.10^2$ S/m, et la vitesse de rotation est mesurée par traitement vidéo (figure 3.14). Les paramètres pour la détermination de la fréquence de coupure par rotation des cellules seront aussi décrits, et ses performances évaluées.

3.3.2 Mesure de la vitesse de rotation par traitement vidéo

La rotation des cellules est enregistrée pour chaque différence de potentiel et conductivité. Le champ de vision du microscope à l'objectif 20x permet d'acquérir la rotation de plusieurs cellules en même temps (une dizaine) à une résolution suffisante. Pour mesurer leur vitesse de rotation, un traitement d'images automatisé a été développé sous Matlab (MathWorks).

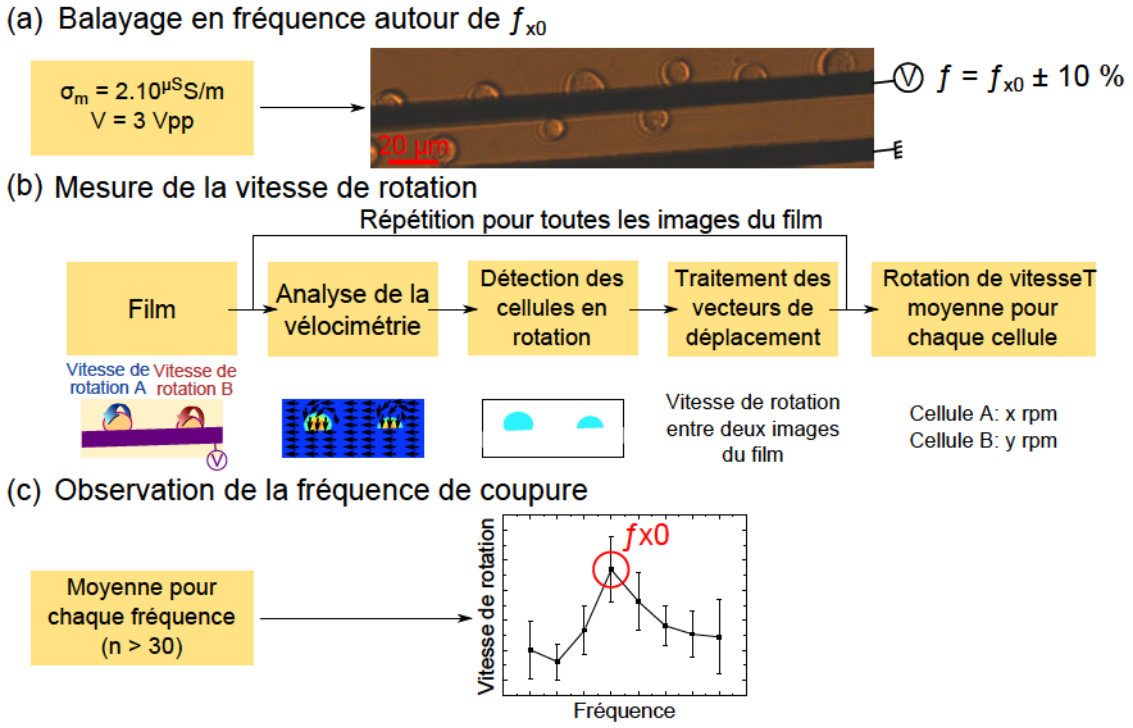


FIGURE 3.14 – **Détermination de la fréquence de coupure par la rotation des cellules.** La rotation des cellules est enregistrée autour de la fréquence de coupure (a), la vitesse de rotation est ensuite mesurée par traitement vidéo (b), la fréquence de coupure correspondant à la fréquence où la vitesse de rotation est la plus élevée (c).

Le déroulement du traitement de la vidéo se fait par étapes successives :

— Calcul des vecteurs de déplacement de chaque pixel par rapport à l'image précédente
— Détection des cellules en rotation et segmentation de chaque cellule
— Traitement des vecteurs de déplacement pour chaque cellule détectée

À la fin de cette boucle, la vitesse de rotation pour chaque cellule a été calculée entre deux images. Ces étapes sont donc répétées pour toute la vidéo, pour au final calculer la vitesse moyenne de rotation des cellules pour chaque condition expérimentée.

➢ Tracé des vecteurs de déplacement

La première tâche du programme est de détecter le déplacement des cellules en rotation, en effectuant un suivi du déplacement des organites de la cellule. Pour cela, la vidéo est convertie en niveaux de gris et la totalité du champ de vision du film est analysée image par image. Le déplacement des motifs est calculé à partir des différences locales entre deux images successives. Les vecteurs de déplacements sont affichés par-dessus l'image de départ, comme sur l'image 3.15(a).
Un filtre peut être appliqué pour augmenter le ratio signal-sur-bruit, si celui-ci est en-dessous d'un seuil donné. D'autres filtres permettent d'éliminer les valeurs aberrantes. Ce module s'appuie sur des algorithmes de détection et de suivi de particules existants (MatPIV).

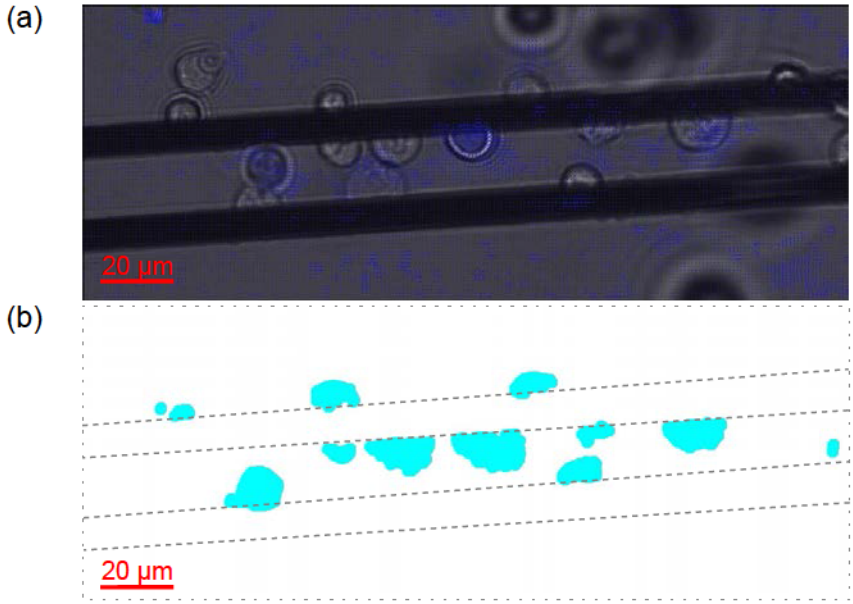


FIGURE 3.15 – **Traitement d'image sur les cellules en rotation.** (a) Calcul et affichage des vecteurs de déplacement en bleu, l'intensité est proportionnelle à la longueur des flèches (en bleu). (b) Détection des bords des cellules et conversion de l'image.

Plus localement, sur une zone de quelques pixels de côté, chaque vecteur significativement différent de ces voisins est également exclu (différence ajustable également).

➢ Détection des bords des cellules

Après avoir enregistré la trajectoire des vecteurs de déplacement, le programme segmente les cellules en rotation. Un algorithme dédié permet la détection du contour des cellules en localisant des transitions d'intensité dans l'image. Selon la méthode Sobel, utilisée ici, le gradient d'intensité est mesuré selon un masque vertical et un masque horizontal, pour finalement donner une image où seules les valeurs dépassant un seuil d'intensité sont affichées. La combinaison des images verticale et horizontale permet la reconstitution des bords de l'image originale.
L'image est ensuite affichée en bleu pour les cellules sur un fond blanc, comme le montre la figure 3.15(b).

➢ Calcul de la vitesse de rotation

Lorsque les cellules sont correctement délimitées, le centroïde de chaque cellule est calculé et suivi temporellement. La vitesse de rotation moyenne est mesurée, pour chaque centroïde détecté, sur l'ensemble du film. Plusieurs paramètres peuvent être ajustés pour éviter l'obtention de valeurs aberrantes.
La taille maximale de la zone à délimiter ne peut être

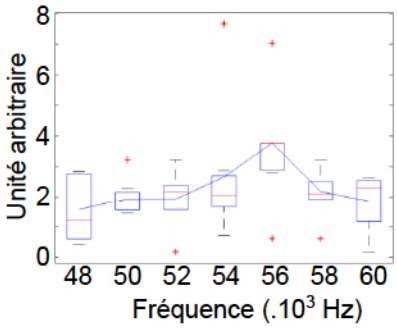


FIGURE 3.16 – Exemple de la représentation graphique de la rotation des cellules après traitement vidéo.

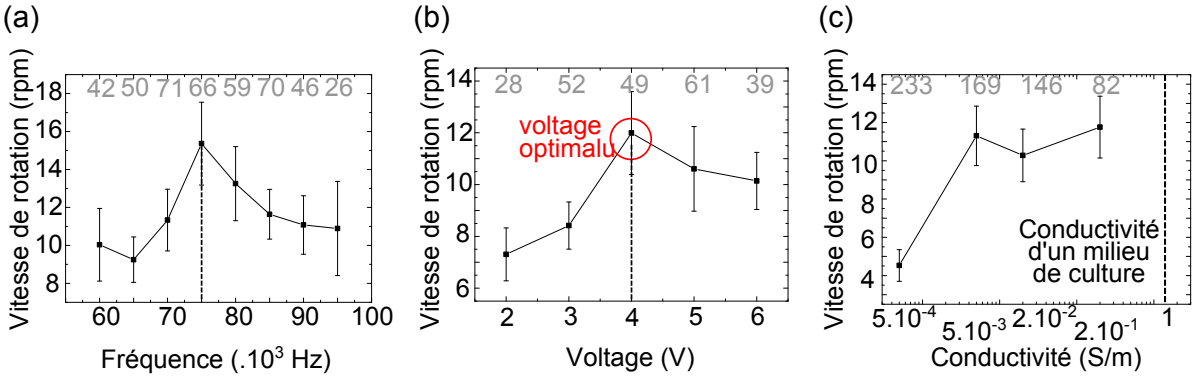


FIGURE 3.17 – **Évaluation de la rotation des cellules HEK.** En fonction (a) de la fréquence (V = 3 V_{pp}, σ_m = 2.10^{-2} S/m) , (b) de la différence de potentiel (f = 80 kHz, σ_m = 2.10^{-2} S/m) et (c) de la conductivité du milieu (f_{x0}, V = 3 V_{pp}). Les nombres en gris indiquent le nombre de cellules testées par point.

supérieure ou inférieure à un nombre de pixels définissant la taille moyenne des cellules (par la mesure d'une cellule représentatrice de l'échantillon testé). Généralement, la zone délimitée ne peut excéder/être inférieure à 10 % de la valeur entrée.
Si le déplacement d'un centroïde d'une image à la suivante est trop important, le programme considère alors que ce sont deux centroïdes différents qui sont détectés. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un déplacement maximal autorisé entre deux images correspondant à 60 % de la taille des cellules (même valeur que celle utilisée dans le paragraphe précédent).

Après toutes ces opérations, il est possible de visualiser graphiquement la vitesse de rotation en fonction de la condition (fréquence, différence de potentiel, conductivité). Le graphique représente la valeur pour une ou plusieurs cellules, avec la valeur médiane en rouge. Les valeurs aberrantes sont exclues du calcul de la valeur médiane, mais apparaissent sous forme de croix rouge (figure 3.16).

3.3.3 Caractérisation de la méthode

Cette méthode pouvant être réalisée dans une plus grande gamme de conductivités et de différences de potentiel, la rotation des cellules a été évaluée dans différentes conditions afin de déterminer les vitesses limites dans lesquelles la méthode peut être appliquée, ainsi que les conditions optimales.

Tout d'abord, la vitesse de rotation des cellules est influencée par la différence de potentiel appliquée. Ici, l'espace inter-électrodes est conservé tout au long de l'expérience (10 μm). La rotation des cellules s'accélère avec une différence de potentiel croissante jusqu'à atteindre une différence de potentiel optimale (4 V_{pp}) qui ne détériore pas l'intégrité de la membrane. On observe une vitesse de rotation de 7 rpm à V_{pp} = 2 V jusqu'à 12 rpm à V_{pp} = 4 V (figure 3.17(b)). Ensuite, la conductivité du milieu ayant une influence sur les effets électrothermiques, le graphique 3.17(c) montre que la vitesse de rotation est dépendante de la conductivité. À σ_m = 5.10^{-4} S/m, les cellules tournent à moins de 5 rpm, alors que la vitesse de rotation dépasse toujours 10 rpm pour les trois autres conductivités testées.

Cependant, pour des milieux de suspension de conductivité de l'ordre des milieux de culture ($\sigma_m \approx 1\ S/m$), les cellules ne présentent qu'une réponse en diélectrophorèse négative et pas de fréquence de coupure (paragraphe 1.2.4). La méthode ne peut donc être appliquée que dans une gamme de conductivités comprise entre 5.10^{-4} et $10^{-1}\ S/m$.
La rotation des cellules étant induite par les effets électrothermiques et la diélectrophorèse, la vitesse de rotation est dépendante de la fréquence appliquée. On retrouve la courbe en cloche observée dans la figure 3.5(c), avec un pic de la rotation à f = 75 kHz (vitesse de rotation de 15,4 rpm).
La valeur théorique de la fréquence de coupure a été calculée à partir d'un modèle cœur-coquille, pour confronter la valeur trouvée expérimentalement par la méthode de rotation. La cellule théorique a été modélisée avec un diamètre de 11 μm et une capacité membranaire de 11,1 mF/m^2 (voir Annexe D). La fréquence de coupure modélisée est à $73.10^3\ Hz$, tout à fait concordante avec la valeur expérimentale ($75.10^3\ Hz$).
Au cours de l'expérience, la discrétisation en fréquence est fixée à $5.10^3\ Hz$, et la fréquence où la vitesse de rotation est la plus élevée ($75.10^3\ Hz$) correspond à la fréquence qui se rapproche le plus de la valeur théorique ($73.10^3\ Hz$).

> Une nouvelle méthode pour caractériser la rotation des cellules a été mise en place à partir des connaissances sur le comportement des cellules, détaillé au paragraphe 3.1. Afin de permettre l'analyse d'un nombre de cellules statistiquement important, un programme de traitement vidéo a été élaboré. Après isolation des cellules en rotation, la vitesse de rotation de chacune est mesurée et la vitesse moyenne des cellules de l'échantillon est obtenue pour chaque condition.
> La rotation des cellules a été mesurée en fonction de la fréquence, de la conductivité et de la différence de potentiel. Chacun de ces paramètres a une influence sur la présence/absence de la rotation, mais aussi sur la vitesse. Il existe une différence de potentiel optimale où les cellules tournent le plus rapidement sans dommage sur la membrane plasmique, mais aussi une gamme de conductivité (10^{-3} – $10^{-1}\ S/m$) où la rotation est observable.

3.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, le comportement des cellules dans différentes conditions de fréquences, différences de potentiel et conductivités a été étudié. La réponse des cellules a été observée et expliquée dans chaque condition testée. Un modèle théorique a été construit afin d'étayer les hypothèses émises quant aux forces impliquées dans les comportement observés.

Ensuite, deux méthodes ont été mises au point et caractérisées pour mesurer les propriétés diélectriques des cellules à partir de comportements différents. La première est basée sur un régime de diélectrophorèse pure, et permet de mesurer la signature électrique des cellules sur une gamme de fréquences allant de 10^3 à 5.10^6 Hz. La mesure expérimentale du facteur de Clausius-Mossotti des cellules est reliée à leur vitesse de déplacement lorsque la fréquence d'intérêt est appliquée. En mesurant cette vitesse de déplacement, la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est calculée selon une équation faisant intervenir la taille de la cellule et le champ électrique appliqué, notamment.

La deuxième méthode utilise la rotation observée autour de la fréquence de coupure dans certaines conditions de conductivité du milieu. Elle permet de mesurer la fréquence de coupure sur un nombre plus important de cellules que la mesure complète du facteur de Clausius-Mossotti dans un temps plus court, mais n'apporte des informations qu'à propos des fréquences proches de la fréquence de coupure. Un programme de suivi de particules a été développé afin d'optimiser le traitement vidéo et de permettre l'extraction des données expérimentales de manière informatique. La méthode a été caractérisée dans différentes conditions de différence de potentiel et de conductivité pour trouver les paramètres optimaux.

	Mesure du FCM	Mesure de la fréquence de coupure
Forces en jeu	Diélectrophorèse pure	Diélectrophorèse et effets électrothermiques
Spectre d'analyse	Totalité de la gamme de fréquences	Autour de la fréquence de coupure
Conductivités optimales	2-5 $.10^{-4}$ S/m	10^{-3} à 10^{-1} S/m
Rendement (expérimental)	~ 30 à 50 cellules / heure	~ 100-200 cellules / heure
Rendement (analyse)	~ 5 cellules / heure	~ 30 à 50 cellules / heure

FIGURE 3.18 – Tableau comparatif des méthodes de caractérisation des cellules présentées ici : mesure du facteur de Clausius-Mossotti et mesure de la fréquence de coupure.

3.4. Conclusion

Un tableau comparatif regroupant les avantages et inconvénients des deux méthodes est présenté dans la figure 3.18. Les deux méthodes n'apportent pas les mêmes informations. La mesure du facteur de Clausius-Mossotti permet d'obtenir une vue d'ensemble de la réponse des cellules sur une large gamme de fréquences. Elle est ainsi utile pour comparer différentes lignées, comme présenté dans le chapitre suivant (paragraphe 4.2). La seconde, la mesure de la fréquence de coupure, a un rendement plus grand, tant au niveau de la mesure expérimentale que du traitement vidéo. Mais elle permet d'obtenir des informations uniquement autour de la fréquence de coupure. Dans le chapitre suivant, elle est utilisée pour observer les variations de la fréquence de coupure en fonction de traitements chimique ou biologique (paragraphe 4.3).

Ces deux méthodes sont complémentaires de par les informations qu'elles apportent et sont exploitées pour des applications différentes dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Signature diélectrophorétique de cellules humaines et étude de l'influence de modifications membranaires

Sommaire

4.1 Présentation des types cellulaires étudiés 65
4.2 Signature diélectrophorétique de cellules humaines cancéreuses et non cancéreuses 67
4.2.1 En fonction du type cellulaire 68
4.2.2 En fonction de l'état cancéreux d'un type cellulaire 69
4.2.3 En fonction de la progression cancéreuse 73
4.3 Compréhension de l'origine de la fréquence de coupure 76
4.3.1 Influence des canaux ioniques 77
4.3.2 Influence des protéines membranaires 80
4.4 Conclusion 84

Après avoir étudié le comportement des cellules lorsqu'elles sont soumises aux forces électrocinétiques, la réponse de différents types de cellules est mesurée. Les méthodes présentées au chapitre précédent sont appliquées pour comparer des types cellulaires entre eux ou pour tenter de comprendre quels paramètres membranaires sont impliqués dans les propriétés diélectriques. La première section de ce chapitre est consacrée à la mesure expérimentale de la capacité électrique de la membrane. À partir de ce paramètre, il est possible de modéliser le facteur de Clausius-Mossotti pour n'importe quelle condition de conductivité de milieu.
Ensuite, la mesure du facteur de Clausius-Mossotti a été réalisée pour étudier la signature électrique de différentes lignées, pour éprouver la spécificité et la sensibilité de la méthode. La méthode de détermination de la fréquence de coupure étant plus pertinente pour la mesure statistique sur un plus grand nombre de cellules de par son rendement, elle a été utilisée pour comprendre l'origine moléculaire de la fréquence de coupure. Les membranes des cellules ont été modifiées chimiquement et biologiquement et l'impact sur la fréquence de coupure a été mesuré. Les résultats sont présentés dans la dernière section de ce chapitre.

4.1 Présentation des types cellulaires étudiés

Différents types cellulaires sont étudiés tout au long de ce chapitre et sont décrits dans cette partie. Le choix a été fait d'utiliser des lignées cellulaires, plutôt que des cellules primaires, pour travailler sur des cellules identiques dans le temps. Il est admis qu'en dessous du passage 20, les cellules sont considérées comme à "faible passage" et il n'y a pas de dérive génétique significative par rapport à la lignée de départ.

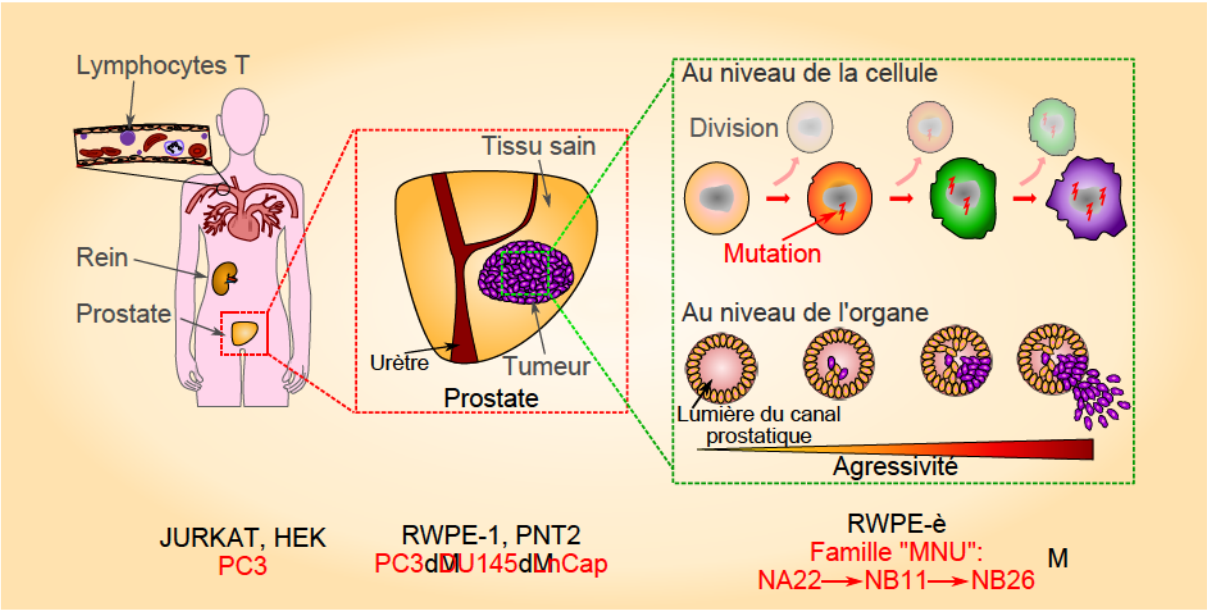


FIGURE 4.1 – **Représentation schématique de la provenance tissulaire des cellules.** En noir, les lignées non cancéreuses et en rouge, les lignées cancéreuses.

La figure 4.1 schématise la provenance de chacune de ces lignées, et représente la restriction progressive du choix des cellules. Les lignées cellulaires sont commercialement disponibles et ont été choisies selon leur origine tissulaire et leur état physiologique :

— lignées provenant d'organes différents : HEK, JURKAT, PC3 (groupe 1).
— lignées provenant du même organe (prostate), et dont les cellules sont issues d'un organe sain ou d'un cancer : RWPE1, PNT2, PC3, DU145, LnCap (groupe 2).
— lignées provenant du même organe (prostate), à un stade de cancérisation différent : RWPE1, WPE1-NA22, WPE1-NB11, WPE1-NB26 (groupe 3).

Les cellules HEK sont des cellules adhérentes, non cancéreuses. Elles représentent un modèle mécanique, et sont régulièrement utilisées pour tester l'efficacité ou la reproductibilité de méthodes et expériences. Les cellules JURKAT sont des lymphocytes T (sous-catégorie de globules blancs), et sont des cellules circulantes, non cancéreuses. La dernière lignée de ce groupe est la lignée PC3, cellules épithéliales de prostate issues d'un adénocarcinome de grade IV métastasé dans l'os (adhérentes et cancéreuses). Ce premier groupe de cellules permet d'avoir des critères physiologiques et mécaniques radicalement différents : adhérentes / non adhérentes et cancéreuses / non cancéreuses (figure 4.2). Les cellules provenant de différents organes, une diversité significative de leurs propriétés est attendue.

4 lignées ont été étudiées dans le second groupe, toutes issues de la prostate : deux lignées non cancéreuses, RWPE1 et PNT2, composées de cellules épithéliales et 3 lignées cancéreuses : PC3 à nouveau, DU145 (cellules épithéliales cancéreuses, issues d'un carcinome métastasé dans le cerveau), et LnCap (cellules épithéliales cancéreuses, issues d'un carcinome métastasé dans un ganglion lymphatique). Dans ce deuxième groupe, les cellules sont toutes adhérentes, et restreintes à un seul organe, ce qui minimise les différences entre elles. Ce groupe se focalise plus

	Lignée	Propriétés mécaniques		Propriétés physiologiques	
		Adhérentes	Circulantes	Non cancéreuses	Cancéreuses
Groupe 1	HEK	x		x	
	JURKAT		x	x	
	PC3	x			x
Groupe 2	RWPE1	x		x	
	PNT2	x		x	
	LnCap	x			x
	PC3	x			x
	DU145	x			x
Groupe 3	RWPE1	x		x	
	WPE1-NA22	x			x
	WPE1-NB11	x			xx
	WPE1-NB26	x			xxx

FIGURE 4.2 – **Lignées cellulaires utilisées.** Les groupes 1, 2 et 3 sont présentés dans ce tableau, ainsi que l'adhérence et l'état physiologique de chaque lignée. Le code couleur mime les différences relatives entre les lignées à l'intérieur d'un groupe.

sur la différence de propriétés en fonction du statut physiologique (cancéreux / non cancéreux), et permettra d'observer l'influence de la cancérogénèse sur les propriétés diélectriques des cellules.

Dans le troisième groupe, les cellules étudiées sont encore des cellules de prostate, mais cette fois, la lignée de départ a été modifiée pour induire la tumorigénèse, et différentes lignées "filles" à un stade de cancérisation différent en sont issues. La lignée RWPE1 exposée au N-méthyl-N-nitrosourée (MNU, $H_3C - N(NO) - CONH_2$) résulte en une famille de lignées tumorigènes, sélectionnées avec une agressivité croissante [103]. Ces cellules miment l'aggravation d'un cancer, où les cellules accumulent des mutations génétiques permettant l'échappement à la sénescence et à l'apoptose cellulaires et autres mécanismes de défense naturels contre la tumorigénèse. Ce dernier groupe rassemble des cellules relativement similaires, comparées aux deux groupes précédents, mais pourtant différentes au niveau physiologique. Il permettra de tester la sensibilité de la méthode à mesurer des changements fins dans les propriétés diélectriques.
La totalité des lignées et de leurs propriétés sont résumées dans la figure 4.2.

4.2 Signature diélectrophorétique de cellules humaines cancéreuses et non cancéreuses

Le facteur de Clausius-Mossotti des différentes lignées présentées au paragraphe 4.1 a été mesuré expérimentalement. Les lignées ont été classées en trois groupes, avec des différences inter-lignées décroissantes, et la mesure de leurs facteurs de Clausius-Mossotti a été faite à plusieurs intervalles dans le temps, pour tester respectivement la sensibilité et la spécificité de la méthode.

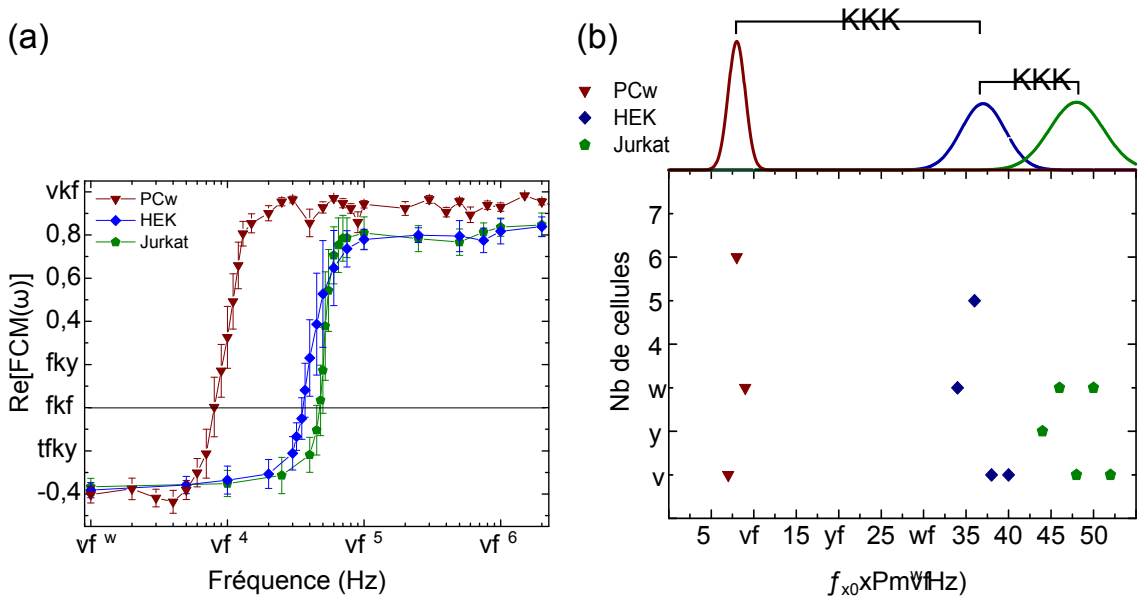


FIGURE 4.3 – **Facteurs de Clausius-Mossotti de cellules du premier groupe**. (a) Partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. (b) Répartition des fréquences de coupure (*** : p < 0.001), $\sigma_m = 5.10^{-4}\ S/m$.

4.2.1 En fonction du type cellulaire

La technique présentée au paragraphe 3.2 est appliquée sur les lignées du groupe 1 : HEK, JURKAT et PC3. Leur facteur de Clausius-Mossotti respectif est présenté dans la figure 4.3(a). Les fréquences de coupure respectivement observées des lignées PC3, HEK et JURKAT sont 8, 36 et 48 $.10^3\ Hz$. La taille des cellules ayant une forte influence sur la fréquence de coupure, il est nécessaire de prendre ce paramètre en compte pour pouvoir comparer les lignées entre elles. Entre la lignée PC3 et les lignées HEK et JURKAT, la taille des cellules est significativement différente (p < 0.001, selon le test de Student), le diamètre moyen des PC3 est d'environ 18 μm, contre 13 μm pour les deux autres. Il est donc difficile d'attribuer la différence de la fréquence de coupure à la seule différence de composition de la membrane des cellules, en excluant le facteur taille. Cependant, pour HEK et JURKAT, la taille des cellules est similaire (p < 0.01) mais la fréquence de coupure est significativement différente (p < 0.001). Dans ce cas, c'est bien la physiologie de la cellule, et notamment celle de la membrane plasmique, qui est la cause de la différence observée.

La largeur à mi-hauteur (FWHM, *full width at half maximum*) est calculée à partir des graphes de répartition de la fréquence de coupure (présentés au paragraphe 3.2), selon l'équation 4.1. L'ensemble des graphiques de ce type correspondant aux autres lignées a été placé en annexe. La valeur moyenne de la fréquence de coupure est exprimée avec une gamme correspondant à la moitié de la largeur à mi-hauteur, arrondie en fonction du pas de l'expérience.

$$FWHM = 2.\sqrt{2.ln(2)} * SD \tag{4.1}$$

Les valeurs pour chaque lignée sont reprises dans le tableau 4.1.

Les membranes plasmiques de cellules circulantes (comme les JURKAT) n'ont pas la même composition que celles des cellules adhérentes (comme les HEK). La concentration en protéines dans la membrane plasmique est une piste explorée concernant la valeur de la fréquence de coupure. L'ancrage des cellules se fait par plusieurs mécanismes : des molécules d'adhésion et des complexes de jonctions. Ces mécanismes permettent une interaction spécifique entre cellules (pour assurer la cohésion du tissu), mais aussi entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ces complexes protéiques (cadhérines, intégrines, desmosomes et hémidesmosomes, etc) que l'on retrouve chez des lignées adhérentes ne sont pas retrouvés dans les lymphocytes T. Cette catégorie de globules blancs a pour fonction de repérer et parfois détruire des cellules étrangères ou malades. L'adhésion cellulaire, qu'elle soit spécifique ou non, se fait via des récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T, dont les ligands peuvent être des molécules d'adhésion [26]. En modifiant la concentration en phospho-lipides (isolants), les protéines peuvent influer sur la polarisation de la cellule. La nature de ces protéines, et la charge qu'elles apportent à la membrane plasmique, peut aussi contribuer à des propriétés diélectriques propres à chaque type cellulaire. Une dernière hypothèse, qui est encore peu soulevée dans la littérature, est l'implication des radeaux lipidiques (plus communément appelés *lipid rafts*). Ces microdomaines de la membrane plasmique se distinguent par leur grande concentration en cholestérol et en glycosphingolipides et en sphingomyéline [23]. Cette composition particulière les rend très peu denses, comparés au reste de la membrane plasmique. Leur rôle est en cours d'étude, mais ils sont impliqués dans la signalisation cellulaire. Ils jouent par exemple un rôle dans l'activation des lymphocytes T, via une cascade de signalisation induite par le récepteur des cellules T (TCR, pour *T cell receptor*) [56]. Même s'ils sont présents dans tous les types cellulaires, leur distribution module la morphologie et la mécanique de la membrane, contribuant ainsi à une modification des propriétés diélectriques de la cellule.

Il est pour le moment impossible de savoir si une hypothèse a plus d'influence sur les propriétés diélectriques que les autres, ou si elles y contribuent toutes. Mais elles permettent d'expliquer pourquoi des lignées différentes présentent une réponse propre à chacune à la diélectrophorèse.

4.2.2 En fonction de l'état cancéreux d'un type cellulaire

Pour étudier des cellules plus proches physiologiquement, le choix a été fait de prendre en compte uniquement des cellules de prostate. Les lignées étudiées sont celles du deuxième groupe : RWPE1, PNT2, LnCap, PC3 et DU145. Pour rappel, la différence siège dans l'état de l'organe : les lignées RWPE1 et PNT2 sont des lignées contrôles, non cancéreuses et sensibles aux androgènes, alors que les trois autres lignées sont des lignées cancéreuses et tumorigènes.

Lignée	$f_{x0}(Hz)$	$SD\ (Hz)$	$FWHM\ (Hz)$	Moyenne (Hz)
PC3	8200	633	1491	$8.10^3 \pm 1.10^3$
HEK	36000	1886	4441	$36.10^3 \pm 2.10^3$
JURKAT	47600	2796	6585	$48.10^3 \pm 4.10^3$

Table 4.1 – Valeurs expérimentales moyennes des fréquences de coupure pour les lignées provenant d'organes différents.

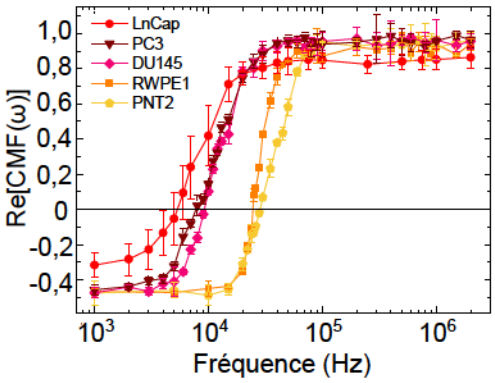


FIGURE 4.4 – **facteurs de Clausius-Mossotti des lignées du second groupe.** Facteurs de Clausius-Mossotti moyens des différentes lignées de cellules de prostate, mesurés sur 10 cellules. $\sigma_m = 5.10^{-4}\ S/m$.

Sur la figure 4.4, on observe encore une fois une démarcation nette entre les lignées contrôles (en orange et jaune) et les lignées cancéreuses (en rouges/rose) : leurs fréquences de coupure respectives sont présentées dans le tableau 4.2.

Dans la majorité des cas, la taille des cellules est significativement différente entre les lignées comparées. Pour s'affranchir du facteur taille, les valeurs de fréquence de coupure sont normalisées selon l'équation 4.2, r étant le rayon de la cellule. Les valeurs obtenues pour chaque lignée sont représentées dans le graphe 4.5 (à droite).

$$f_{x0} * r \tag{4.2}$$

La taille ne semble pas être le facteur discriminant : en comparant les fréquences de coupure par rapport à la taille moyenne des cellules (tableau 4.2), les lignées ayant les fréquences de coupure les plus basses n'ont pas (toujours) les tailles les plus grandes. La morphologie et la composition de la membrane plasmique semblent être de meilleures pistes quant à l'origine des différences observées entre les lignées cancéreuses et non cancéreuses. Il est intéressant de remarquer que les lignées PC3 et DU145, qui sont toutes deux insensibles aux androgènes ont une fréquence de coupure assez similaire, comparée à LnCap, qui y est sensible.

Pour aller plus loin dans la comparaison de ces lignées, l'étude a été répétée dans le temps, à 50 semaines d'intervalle, afin de tester la robustesse de la technique et la répétabilité de ces résultats. L'étude sur la lignée PNT2 fournie par le laboratoire Biomics a été stoppée dans leur laboratoire, et la lignée DU145 a subi une contamination majeure par des mycoplasmes. Ces deux lignées ont donc été retirées de l'étude, pour ne conserver que les lignées RWPE1 (non cancéreuse), LnCap et PC3 (cancéreuses) pour l'évolution du facteur de Clausius-Mossotti au cours du temps. Les cellules ont donc été décongelées, mises en culture et testées une première fois puis 50 semaines plus tard selon le même protocole.

Lignée	LnCap	PC3	DU145	RWPE1	PNT2
f_{x0} (Hz)	$5.10^3 \pm 3.10^3$	$8.10^3 \pm 1.10^3$	$9.10^3 \pm 1.10^3$	$25.10^3 \pm 2.10^3$	$28.10^3 \pm 2.10^3$
Taille (μm)	$12,5 \pm 0,8$	$17,9 \pm 0,8$	$16,1 \pm 1,2$	$14,9 \pm 1,0$	$18,1 \pm 1,0$

TABLE 4.2 – Fréquences de coupure et tailles moyennes des lignées du second groupe, correspondant au graphe 4.4.

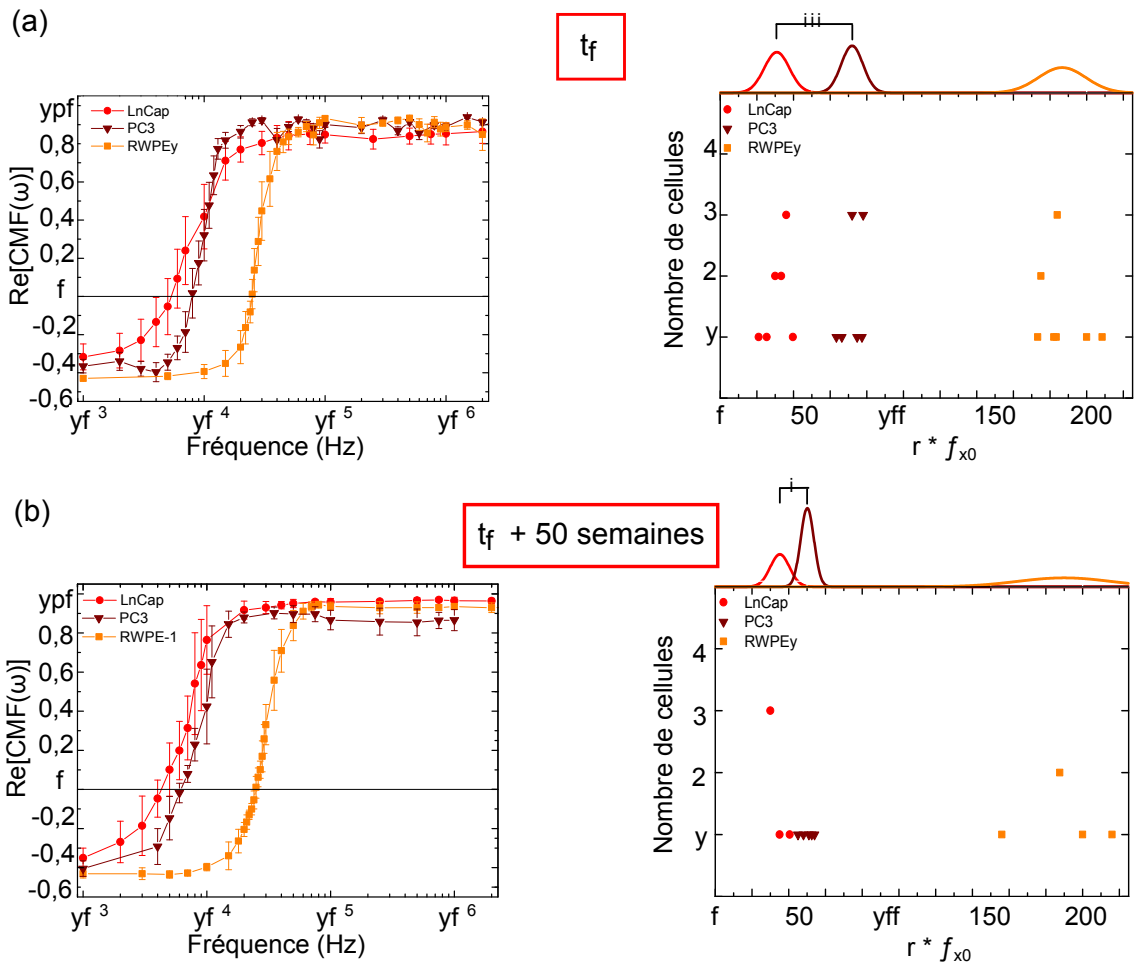


FIGURE 4.5 – **Facteurs de Clausius-Mossotti des lignées du second groupe**, à σ_m = 5.10^{-4} S/m. Partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (à gauche) et répartition des fréquences de coupure (à droite), normalisées par la taille. Mesures (a) sur 10 cellules à t_0 et (b) sur 5 cellules à t_0 + 50 semaines. $*, **, ***$: p $<$ 0.1, 0.01 et 0.001.

Elles n'ont pas été gardées en culture pendant 50 semaines, pour éviter une dérive du matériel génétique. Les fréquences de coupure mesurées n'auraient pas pu être comparées puisque les cellules auraient été différentes lors des deux mesures. Comme le montre le graphe 4.5 (graphiques de gauche), des courbes similaires sont obtenues à t_0 et t_0+50 semaines. Les fréquences de coupure respectives de LnCap, PC3 et RWPE1 sont reprises dans le tableau 4.3.

Dans un premier temps, suivons l'évolution d'une lignée dans le temps : RWPE1 et LnCap ont une fréquence de coupure moyenne identique dans le temps (une fois normalisée par la taille). Seule PC3 présente une variation significative (p < 0,001) entre les mesures à t_0 et à t_0 + 50 semaines.

Le sérum de veau fœtal ajouté au milieu de culture des cellules a une composition empirique, variable selon les lots. De plus, le nombre de passages des cellules en culture n'est pas identique au moment des mesures (même s'il est toujours inférieur à 20 pour limiter la dérive génétique), pour éprouver la robustesse de la mesure du facteur de Clausius-Mossotti à comparer des lignées. Ces variations peuvent avoir une influence sur l'activité des cellules, et expliquer la différence observée entre les deux mesures de la lignée PC3.

Si on s'intéresse maintenant à la différence inter-lignées, il est important de noter qu'une différence significative est observée entre toutes les lignées, lors de la mesure à t_0 ou à t_0 + 50 semaines (toujours en comparant la fréquence de coupure normalisée par la taille). Ce résultat soulève plusieurs points intéressants :

— les lignées sont physiologiquement différentes, la taille n'est pas le point essentiel des différences observées
— deux lignées pourraient être différenciées et séparées sur un critère diélectrique
— la mesure du facteur de Clausius-Mossotti au cours du temps est une technique robuste, qui permet d'évaluer les propriétés d'un type cellulaire au cours du temps. Si les cellules sont les mêmes (comme ici), la technique est suffisamment spécifique pour donner un résultat identique.

Pour une meilleure compréhension, il est nécessaire de détailler la différence entre spécificité et sensibilité. La spécificité d'une méthode est, par définition, sa capacité à donner un résultat négatif lorsque l'hypothèse n'est pas vérifiée. Dans notre cas, cela correspond à trouver une fréquence de coupure identique pour deux cellules qui ne sont pas différentes. La sensibilité, quant à elle, est l'opposé : donner un résultat positif quand l'hypothèse est vérifiée. Ici, c'est

Lignée	LnCap		PC3		RWPE1	
	t_0	t_{50}	t_0	t_{50}	t_0	t_{50}
f_{x0} (Hz)	5.10^3 $\pm 2.10^3$	5.10^3 $\pm 1.10^3$	8.10^3 $\pm 1.10^3$	6.10^3 $\pm 1.10^3$	25.10^3 $\pm 1.10^3$	25.10^3 $\pm 1.10^3$
Taille (μm)	12,5 $\pm 0,8$	14,5 $\pm 0,7$	17,9 $\pm 0,8$	16,8 $\pm 1,3$	14,9 $\pm 1,0$	15,2 $\pm 2,2$

Table 4.3 – Fréquences de coupure et tailles moyennes des lignées LnCap, PC3 et RWPE1 à t_0 et t_0 + 50 semaines.

donc de trouver des fréquences de coupure significativement différentes quand des lignées sont effectivement différentes.
Avec l'expérience répétée dans le temps, on éprouve la spécificité de la méthode : le but recherché est de trouver une fréquence de coupure similaire pour une même lignée, lors de mesures répétées. Ici, la méthode est donc robuste et permet de mesurer un facteur de Clausius-Mossotti identique dans le temps pour des cellules identiques. La valeur prédictive négative (*ie* la probabilité d'obtenir une fréquence de coupure identique pour une même lignée) est ici de 83 % ($p < 0,001$).
De plus, les différences mesurées entre les lignées sont conservées : des cellules de lignées différentes ont des fréquences de coupure différentes, comme observé au paragraphe précédent. Pour confirmer que les différences observées sont statistiquement recevables, il est nécessaire de vérifier la sensibilité de cette méthode de mesure. La mesure de la sensibilité ne peut se faire que sur des lignées suffisamment proches, pour tester la capacité de la méthode à les différencier. Nous avons donc sélectionné un autre groupe de cellules pour réaliser ce test, détaillé dans le paragraphe suivant.

4.2.3 En fonction de la progression cancéreuse

Pour obtenir des cellules plus similaires que celles du groupe 2, nous nous sommes orientés vers des lignées générées chimiquement, en exposant la lignée RWPE1 à un agent cancérigène (le N-méthyl-N-nitrosourée, *MNU*). Différentes lignées filles existent, avec un taux graduel de cancérisation. Ce sont ces lignées qui composent le troisième groupe de cellules étudiées ici. Il contient les lignées RWPE1 (contrôle, non cancéreuse), et WPE1-NA22, WPE1-NB11 et WPE1-NB26, par ordre croissant d'agressivité (figure 4.6).

Pour ces mesures, les expériences ont été réalisées en aveugle. La mesure du facteur de Clausius-Mossotti a été réalisée sur des lignées identifiées par des numéros, lignées qui ont été cultivées par une personne différente au laboratoire Biomics. Ainsi, tout biais d'expérimentation a été évité, et les mesures du facteur de Clausius-Mossotti n'ont pas été influencées. Chaque lignée a une fréquence de coupure qui lui est propre, avec une différence significative entre chaque lignée, pour les deux mesures (figure 4.7). Le point le plus intéressant à soulever est l'évolution de la fréquence de coupure en fonction du degré de cancérisation de la cellule. Les fréquences de coupure respectives des lignées sont présentées dans le tableau 4.4. Il apparaît que la lignée NB26, qui est la plus cancéreuse, a la fréquence de coupure la plus basse.

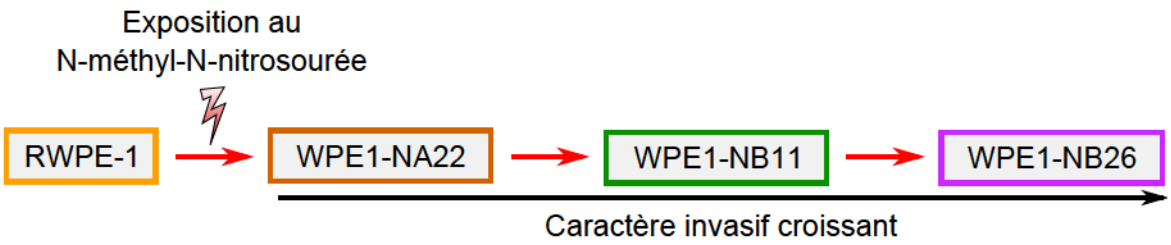


FIGURE 4.6 – **Cellules du troisième groupe.** La lignée RWPE1 est exposée au MNU pour obtenir plusieurs lignées filles avec un niveau graduel de cancérisation. Ces lignées sont disponibles commercialement.

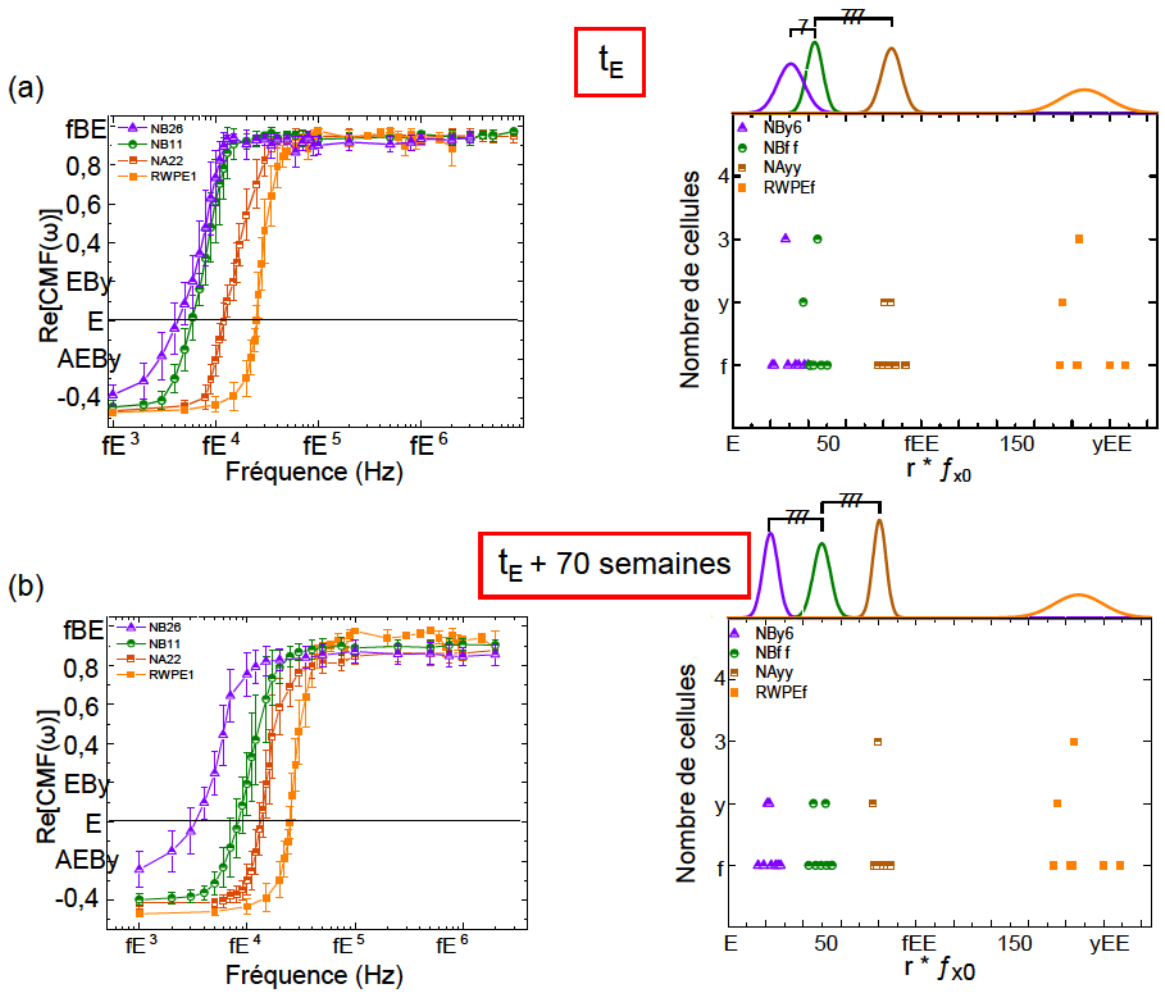


FIGURE 4.7 – **Facteurs de Clausius-Mossotti des lignées du troisième groupe.**, à $\sigma_m = 5.10^{-4}\ S/m$. Partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (à gauche) et répartition des fréquences de coupure (à droite), normalisées par la taille. Mesures sur 10 cellules (a) à t_0 et (b) à $t_0 + 70$ semaines. $*, **, ***$: p < 0.1, 0.01 et 0.001.

Lignée	NB26		NB11		NA22		RWPE1	
	t_0	t_{70}	t_0	t_{70}	t_0	t_{70}	t_0	t_{70}
f_{x0} (Hz)	4.10^3 $\pm 1.10^3$	3.10^3 $\pm 1.10^3$	6.10^3 $\pm 1.10^3$	8.10^3 $\pm 2.10^3$	12.10^3 $\pm 1.10^3$	13.10^3 $\pm 2.10^3$	25.10^3 $\pm 1.10^3$	25.10^3 $\pm 1.10^3$
Taille (μm)	13,9 $\pm 0,6$	14,1 $\pm 1,1$	14,9 $\pm 0,7$	12,4 $\pm 1,1$	14,0 $\pm 0,8$	12,3 $\pm 1,3$	14,9 $\pm 1,0$	15,2 $\pm 2,2$

TABLE 4.4 – Fréquences de coupure et tailles moyennes des lignées NB26, NB11, NA22 et RWPE1 à t_0 et t_0 + 70 semaines.

Et surtout, les fréquences de coupure sont dans l'ordre inverse du degré de cancérisation : plus la lignée est cancéreuse, plus la fréquence de coupure est basse. Ceci est une première démonstration de l'évolution de la fréquence de coupure de cellules cancéreuses humaines dérivées d'une même lignée.
Ce résultat indique que la technique employée ici est suffisamment sensible pour détecter des changements entre différentes lignées. La valeur prédictive positive (*ie* la probabilité que la fréquence de coupure soit différente pour des cellules différentes) atteint 95,3 % ($p < 0,1$). Les résultats obtenus jusqu'ici sont consolidés, la mesure expérimentale de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti permet de distinguer des lignées différentes. Les fréquences de coupure mesurées via cette technique sont statistiquement différentes entre des lignées différentes, même si elles proviennent du même organe. De plus, des lignées de différents stades de cancérisation peuvent être discriminées, ce qui pourrait permettre le diagnostic et le suivi de l'évolution d'un cancer via la mesure du facteur de Clausius-Mossotti de ces cellules. La taille n'étant pas un facteur discriminant, il est possible d'indiquer des différences morphologiques et physiologiques de la membrane cellulaire, suffisantes pour discriminer les lignées entre elles.

Les cellules cancéreuses sont sujettes à de nombreuses modifications de leur cytosquelette et de la membrane plasmique, lors de la tumorigénèse. Les phénotypes les plus agressifs acquièrent la capacité de migrer à travers les tissus pour se développer dans un site à distance du lieu d'origine du cancer (métastase), en diminuant par exemple l'expression des protéines d'adhésion présentées plus haut [65]. La surexpression de certaines protéines (des récepteurs membranaires par exemple), mais aussi la modification de la glycosylation et de la phosphorylation des protéines de surface [65], contribuent à une polarisation électrique différente. La concentration et la nature des lipides et acides gras (tels que le cholestérol) diffèrent entre les cellules cancéreuses et non cancéreuses [60]. Tous ces paramètres peuvent se cumuler pour influencer les propriétés diélectriques d'une lignée. Ces différences permettent la détection et la caractérisation de cellules tumorales par des méthodes comme la diélectrophorèse, jusqu'à des niveaux très fins de différentiation (comme l'évolution cancéreuse).

La mesure du facteur de Clausius-Mossotti des lignées du groupe 1 (HEK, JURKAT et PC3) a montré que chaque lignée possède une fréquence de coupure qui lui est propre. La composition de la membrane plasmique, et notamment la présence de complexes protéiques liés à l'adhérence des lignées HEK et PC3, ainsi que l'hétérogénéité de la membrane dûe aux radeaux lipidiques sont des pistes pour expliquer la différence observée entre les lignées.
Les mesures sur le deuxième groupe de cellules ont apporté plusieurs résultats : les lignées contrôles et cancéreuses ont toujours une fréquence de coupure bien distincte, même si toutes les lignées ont une fréquence de coupure significativement différente entre elles.
La méthode utilisée ici est suffisamment spécifique pour retrouver une fréquence de coupure stable dans le temps sur des lignées identiques. Elle est également assez robuste pour ne pas avoir à tenir compte d'un nombre de passages en culture rigoureusement identique.
Enfin, les facteurs de Clausius-Mossotti du dernier groupe ont été mesurés en aveugle, afin de ne pas influencer le résultat observé. Les fréquences de coupure pour chaque lignée correspondent parfaitement avec le degré de cancérisation de chacune, où la fréquence de coupure est de plus en plus faible au cours de la tumorigénèse. Ces mesures ont également permis de tester la sensibilité de la technique, c'est-à-dire son aptitude à déceler des fréquences de coupure différentes pour des lignées différentes (surtout ici, où les différences sont minimes).
Dans cette section, nous avons donc démontré que des cellules provenant de lignées différentes ont une fréquence de coupure différente, qui peut être observée par la mesure du facteur de Clausius-Mossotti. Cette méthode pourrait par exemple permettre le diagnostic d'un cancer, en comparant la réponse des cellules provenant d'un patient par rapport à un échantillon sain, ainsi que le suivi (et le pronostic) en mesurant l'évolution de la fréquence de coupure au cours de biopsies.

4.3 Compréhension de l'origine de la fréquence de coupure

Les facteurs moléculaires influençant la première fréquence de coupure sont peu expliqués dans la littérature [80]. La membrane plasmique est constituée de lipides et de protéines, qui peuvent être glycosylées ou non. Les phospholipides constituent l'élément de base de la membrane, et forment une bicouche lipidique séparant le cytoplasme du milieu extracellulaire. Il est difficile de modifier la composition en lipides de la membrane sans engager de dommages léthaux. Les protéines représentent la moitié de la masse de la membrane, et ont différentes fonctions, allant de la régulation des entrées de nutriments à la communication avec les cellules environnantes.
Nourse et al ont démontré que la glycosylation des protéines membranaires a une influence sur les propriétés diélectriques de la cellule [76]. En inhibant la N-glycosylation des protéines dans l'appareil de Golgi par la swainsonine (qui empêche une enzyme d'intervenir dans la glycosylation des protéines), la fréquence de coupure des cellules traitées est décalée vers une fréquence plus basse. Outre la composition biochimique des membranes, il a été démontré que la morphologie a une influence importante sur la fréquence de coupure [31, 82]. La rugosité de la membrane est liée à la formation de replis et est inversement reliée à la fréquence de coupure. La capacité électrique de la membrane diminue lorsque la rugosité est faible, augmentant la valeur de la fréquence de coupure.

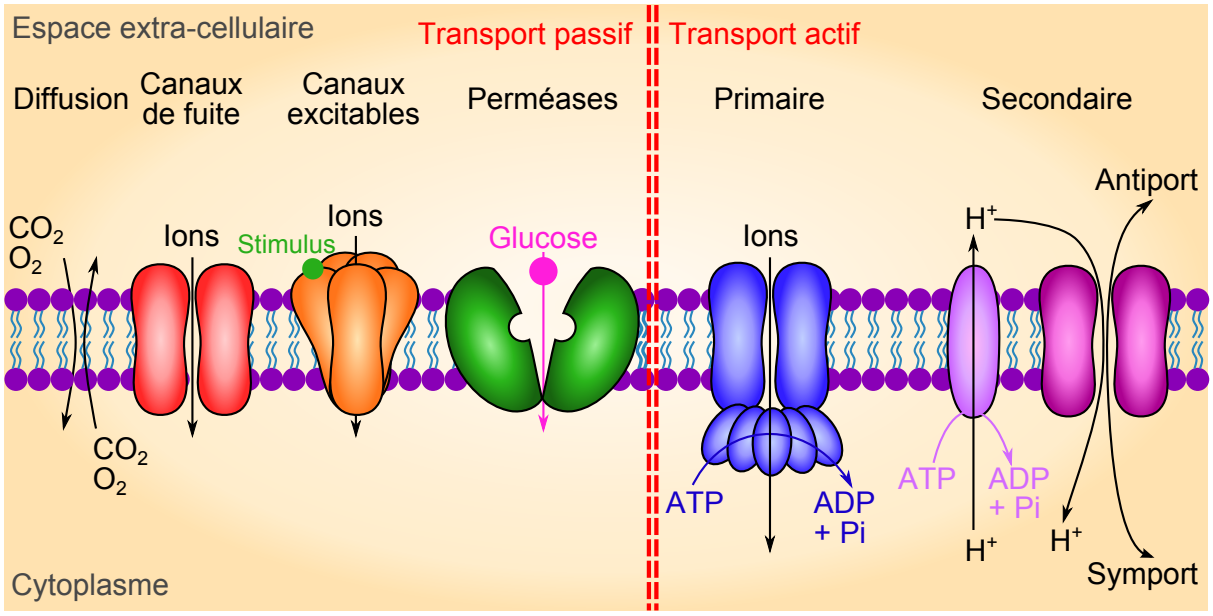


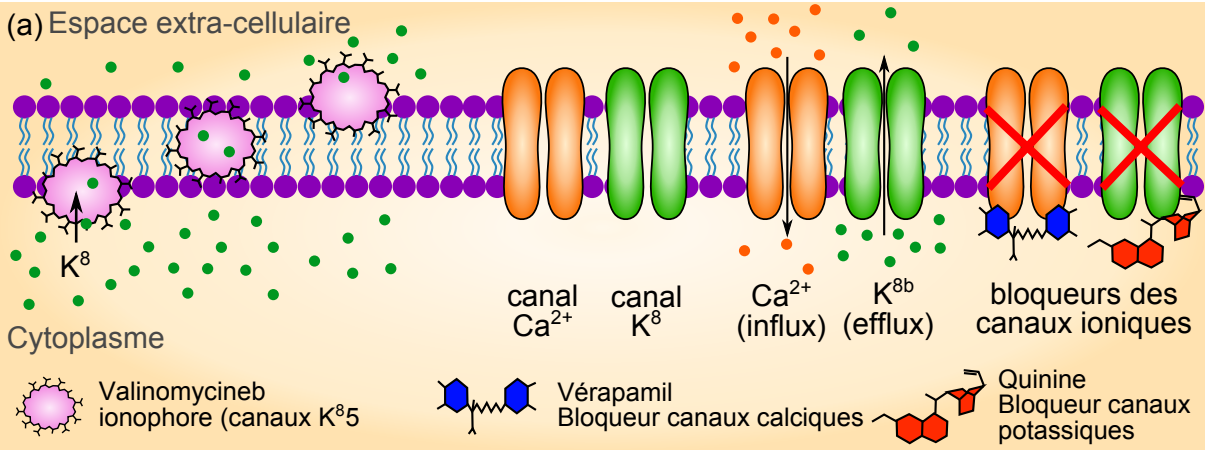
FIGURE 4.8 – **Transport transmembranaire.** Schémas des différents sytèmes de transport à travers la membrane plasmique. Le transport passif suit le gradient de concentration des molécules alors que le transport actif requiert de l'énergie(apportée par l'hydrolyse de l'ATP) pour transporter les solutés contre leur gradient de concentration.

Afin de comprendre quels sont les mécanismes influençant les propriétés diélectriques des cellules (et donc leur réponse diélectrophorétique), la membrane des cellules a été modifiée par des voies biologique ou chimique. L'impact sur la fréquence de coupure a été mesuré via la méthode de rotation présentée au paragraphe 3.3, pour pouvoir étudier un nombre significatif de cellules. Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux échanges ioniques à travers la membrane et à la concentration en protéines. Ces deux paramètres peuvent influencer les propriétés électriques de la membrane, en faisant intervenir des porteurs de charges (échanges ioniques) ou en modifiant l'aptitude de la membrane à emmagasiner ces charges (via les protéines). Dans tous les cas, les charges surfaciques aux abords de la membrane (côté extérieur) peuvent entraîner une modification des propriétés diélectriques de la cellule.
Au niveau des échanges ioniques, nous nous sommes concentrés sur les canaux ioniques. Le transport de charges de part et d'autre de la membrane semble être un bon candidat pour avoir une action sur les propriétés diélectriques de la cellule. De plus, ce sont les transporteurs les plus représentés dans les membranes plasmiques. Pour les protéines, nous avons ciblé des protéines en grande quantité dans les membranes, notamment des protéines surexprimées dans des cellules cancéreuses.

4.3.1 Influence des canaux ioniques

➢ Échanges ioniques à travers la membrane

La membrane plasmique des cellules est semi-perméable, et elle laisse entrer ou sortir sélectivement les nutriments et déchets nécessaires au fonctionnement de la cellule (figure 4.8). Seuls les gaz dissous, l'eau, et les molécules de faible poids moléculaire (hydrophobes ou polaires non chargées) peuvent franchir la membrane par diffusion. Toutes les molécules organiques chargées,



(b)

Ion	Concentration extracellulaire (mM5	Concentration intracellulaire (mM5	Flux (transport passif)
K^8	5.4	~140	efflux: vers le milieu extracellulaire
Ca^{2+}	1.8	~10^{-4}	influx: vers le milieu intracellulaire

FIGURE 4.9 – **Modification des échanges ioniques au niveau de la membrane plasmique.** (a) Schémas des différentes molécules utilisées pour augmenter (ionophore) ou bloquer les échanges via les canaux ioniques. (b) Concentrations intra- et extra-cellulaires des solutés étudiés.

les macro-molécules polaires et les ions sont totalement arrêtés par la bicouche phospholipidique. Des transports facilités permettent l'entrée/sortie de ces molécules, et sont régulés par la cellule. Les transporteurs les plus connus sont les canaux ioniques, spécifiques d'un soluté en général (Na^+, K^+, Ca^{2+}, etc). Ces protéines transmembranaires peuvent être ouvertes en permanence (canaux de fuite) ou ouvertes sous l'action d'un stimuli physico-chimique (canaux excitables). Dans tous les cas, lorsque le canal est en position ouverte, les ions transitent dans le sens du gradient de concentration, c'est-à-dire du compartiment le plus concentré vers le moins concentré. Aussi, des perméases facilitent le transport passif de molécules telles que le glucose ou l'adénosine triphosphate (ATP). L'entrée de certaines molécules doit également se faire contre le gradient de concentration. De l'énergie est nécessaire pour compenser cet échange thermodynamiquement défavorable, énergie qui provient de l'hydrolyse de l'ATP au niveau de pompes ATPasiques liées à la membrane plasmique.

➢ Modification des échanges ioniques

Les échanges d'ions à travers les canaux ont été perturbés par voie chimique (figure 4.9(a)). La valinomycine est un ionophore et fonctionne comme un transporteur passif, spécifique des ions K^+. Le flux d'ions K^+ à travers la membrane est augmenté, en suivant le sens du gradient de concentration. L'expérience est réalisée dans du milieu de culture, où la concentration en

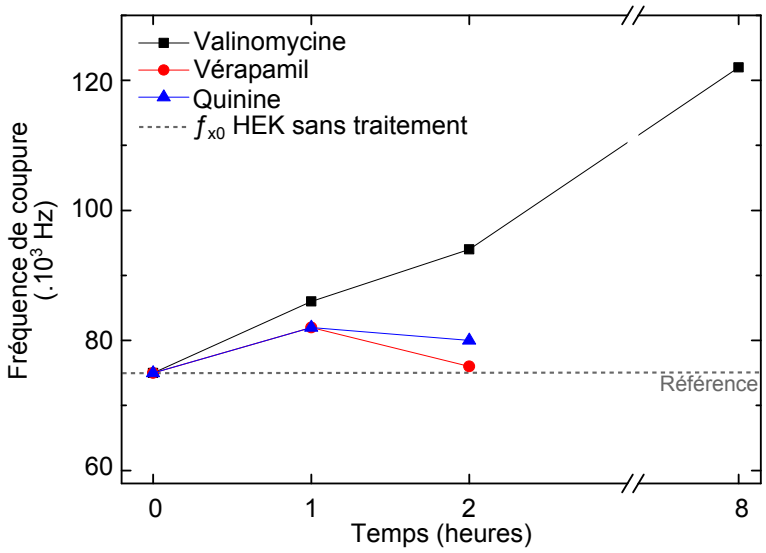


FIGURE 4.10 – **Évolution temporelle de la fréquence de coupure de cellules HEK après modification des échanges ioniques membranaires.** Fréquences de coupure moyennes mesurée à σ_m = 2.10^{-2} S/m sur une moyenne de 36 cellules par point (min=12, max=74) après traitement de cellules HEK à la valinomycine (0.1 μM), le vérapamil (70 μM) ou la quinine (200 μM). Mesures réalisées à une conductivité de σ_m = 2.10^{-2} S/m, t = 0 étant la fréquence de coupure des cellules HEK non modifiées. Les graphes correspondant à la courbe de rotation en fonction de la fréquence pour chaque expérience sont disponibles dans l'annexe F.1.

ions K^+ vaut 5 mM. La concentration intracellulaire en potassium étant d'environ 140 mM, la valinomycine augmente la sortie d'ions K^+.
L'effet inverse est obtenu avec des molécules appelées bloqueurs des canaux ioniques. Le vérapamil est spécifique des canaux calciques, alors que la quinine est spécifique des canaux potassiques. Ces molécules viennent se lier dans les canaux ioniques et empêchent le passage des ions. Au vu des concentrations ioniques intra- et extra-cellulaires exposées dans le tableau 4.9(b), le vérapamil empêche la sortie des ions K^+ et la quinine l'entrée des ions Ca^{2+}.

➢ **Résultats**

Après 1 h d'incubation avec 0,1 μM de valinomycine, la fréquence de coupure augmente, passant de 75.10^3 à 86.10^3 Hz et continue d'augmenter au cours du temps pour finalement atteindre 122.10^3 Hz après 8 h de contact avec les cellules. Ces résultats confirment la transition vers des fréquences plus élevées de la fréquence de coupure lorsque la cellule est en apoptose [48, 101] ou si la membrane a des "fuites" [82].
La valinomycine est également connue pour induire l'apoptose à la même concentration qu'utilisée ici, mais au bout de 16 h [51], sans détérioration significative de la membrane à 8 h. Les effets observés ici ne semblent donc pas être attribués à l'apoptose de la cellule. L'augmentation de la fréquence de coupure après 1 et 2 h de traitement à la valinomycine peut être causée par les perturbations induites par la sortie d'ions potassium à travers les canaux de fuite.
Gascoyne et al ont démontré, en étudiant des globules rouges infectés par la malaria, que lorsque la charge négative de la cellule diminue (ce qui est le cas lors de l'infection par *Plas-*

modium falciparum), la fréquence de coupure augmente [30]. La charge nette de la cellule, au départ fortement négative, va donc diminuer avec l'apport d'ions chargés positivement (sortie d'ions K^+). L'augmentation de la fréquence de coupure observée est concordante avec cette supposition, et tend à confirmer l'hypothèse de départ.

La fréquence de coupure observée après traitement avec des bloqueurs des canaux ioniques est sensiblement la même qu'au départ, avec une variation de 6 %. La quinine est spécifique des canaux de fuite dédiés aux ions K^+ et le vérapamil spécifique de canaux excitables pour les ions calcium Ca^{2+}.
Comme cette lignée ne possède pas de canaux voltage-dépendants, la courbe des cellules traitées au vérapamil est considérée comme un témoin négatif. Après 2 h de traitement à la quinine, la valeur de la fréquence de coupure ne diffère que de 5.10^3 Hz de la fréquence de coupure originale, et de 4.10^3 Hz de la fréquence de coupure observée après 2 h de traitement au vérapamil. Dans l'un ou l'autre des cas, l'effet sur les cellules HEK est négligeable. L'arrêt du transport d'ions n'induit pas un effet inverse à l'augmentation du passage des ions à travers les membranes.

Il semblerait donc que le passage d'ions à travers la membrane, ou plutôt l'accumulation d'ions d'un côté ou de l'autre de la membrane, pourrait être en partie responsable de la variation de la fréquence de coupure qu'on peut observer entre différentes lignées. Le passage d'ions quant à lui influerait plutôt sur la conductivité de la membrane, comme pour les cellules excitables (neurones, cellules cardiaques) [4]. Une étude plus approfondie permettrait de mesurer réellement l'impact de la valinomycine sur les propriétés diélectriques des cellules.

4.3.2 Influence des protéines membranaires

La seconde hypothèse étudiée ici est l'influence de la concentration en protéines dans la membrane plasmique sur l'aptitude de la membrane à retenir les charges, et donc sur sa capacité électrique C_{mem}. La membrane a donc été modifiée, par voie biologique, afin de diminuer la concentration en protéines membranaires, plus particulièrement des protéines transmembranaires, et observer l'impact sur la fréquence de coupure.

➢ Choix des siARN

Pour cette étude, la concentration de certaines protéines a été réduite près de zéro, grâce à une technique de biologie moléculaire appelée extinction de gène (détaillée dans l'annexe E). Pour pouvoir observer l'impact sur la fréquence de coupure, les protéines visées doivent être présentes en quantité suffisante pour induire un changement significatif dans la composition de la membrane plasmique. Les protéines membranaires sont diverses et présentes à différentes concentrations suivant le type cellulaire. Certains évènements au cours de la cellule tels que l'apoptose ou la cancérogénèse entraînent l'augmentation de l'expression ou la translocation de protéines dans la membrane.

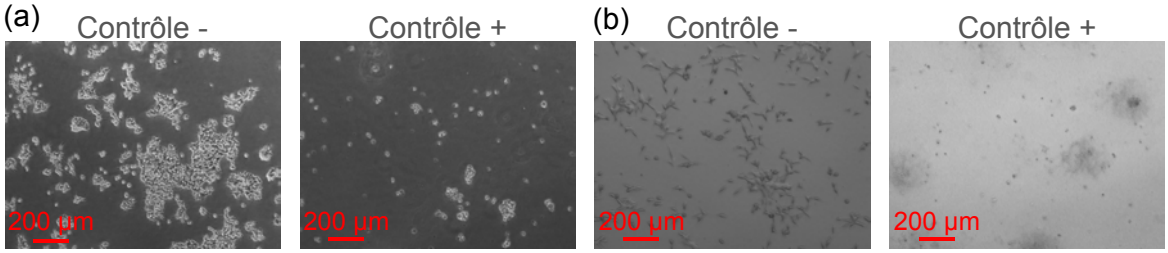


FIGURE 4.11 – **Contrôle de la transfection de siARN.** Photographies en culture à 72 h après transfection avec les contrôles positif et négatif sur (a) les cellules HEK et (b) les cellules LnCap.

Le choix s'est porté sur des protéines surexprimées dans les cellules cancéreuses, et particulièrement dans le cas du cancer de la prostate. Les 3 protéines sélectionnées sont :

— les canaux SK3 (encodés par le gène KCNN3) : *Chantôme et al* ont relevé l'implication des canaux SK3 (qui permettent l'entrée d'ions calcium dans la cellule) dans le processus de migration des cellules cancéreuses pour former des métastases [12].
Les deux autres protéines font partie d'une famille de récepteurs membranaires, appelés *TRP* (pour *Transient Receptor Potential Channels*).
— les canaux TRP-V6 : *Niemeyer et al* ont mis en évidence l'expression de la protéine TRP-V6 dans les cellules cancéreuses de prostate, alors qu'elles ne sont pas exprimées dans les cellules saines [75].
— les canaux TRP-M8 : *Tsavaler et al* ont démontré la surexpression de la protéine TRP-M8 (entrée d'ions sodium Na^+ et calcium Ca^{2+})dans les cellules cancéreuses de prostate dès les stades précoces de cancer [95]. TRP-M8 est depuis étudié pour devenir un marqueur précoce du cancer de la prostate, son expression chutant lorsque les cellules perdent leur dépendance aux androgènes (associé à un mauvais pronostic) [98].

Ces trois protéines ont donc été choisies pour étudier l'influence de la concentration en protéines dans la membrane plasmique. Chaque siARN correspondant a été testé à une concentration de 10 et 20 nM et la fréquence de coupure des cellules est mesurée après 72 h de transfection, pour atteindre le point final de la réaction. Des témoins positif et négatif de transfection ont aussi été testés.

➢ **Résultats**

La lignée HEK a été testée en parallèle de la lignée LnCap, afin de pouvoir observer la différence de l'interférence ARN sur des cellules non cancéreuses (HEK, cellules épithéliales de rein, pour rappel) et des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes (LnCap, issues de métastases dans un ganglion lymphatique).
Le témoin positif (siARN AllStars Cell Death) cible des gènes unanimement présents dans la cellule et nécessaires à sa survie. L'extinction de ces gènes, si la transfection est réussie, entraîne la mort de la cellule, observable au microscope par le détachement des cellules du support de culture. Pour les deux lignées, les cellules traitées avec ce siARN sont mortes et détachées de la surface de culture (figure 4.11).

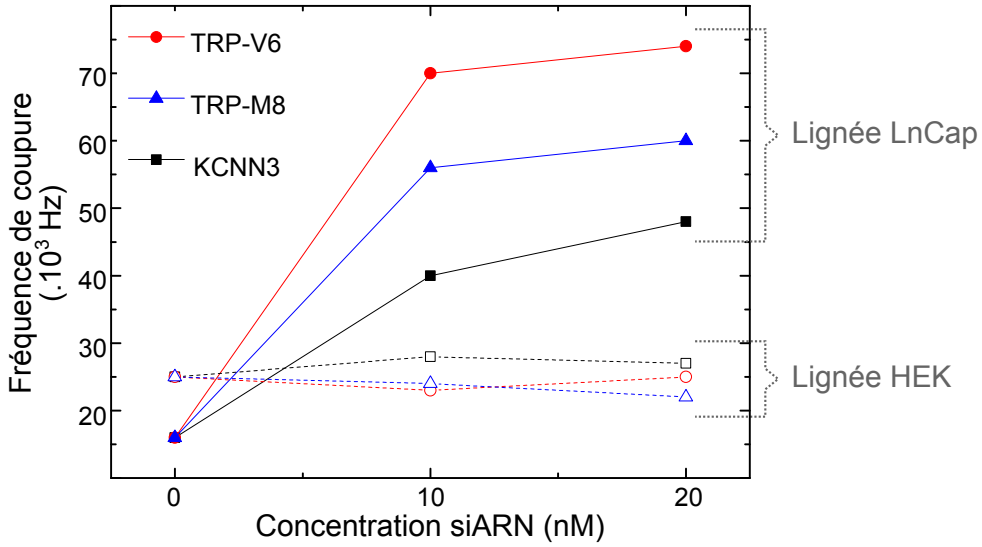


FIGURE 4.12 – **Évolution temporelle de la fréquence de coupure après modification de la concentration protéique membranaire.** Fréquences de coupure moyennes mesurée à σ_m = 2.10^{-2} S/m sur une moyenne de 26 et 28 cellules par point pour les lignées HEK (pointillés) et LnCap (traits pleins), respectivement (HEK : min=21, max=42 ; LnCap : min=16, max=40) après 72 h de transfection avec 10 et 20 nM de siARN. Les graphes correspondant à la courbe de rotation en fonction de la fréquence pour chaque expérience sont disponibles dans l'annexe F.2.

Le contrôle négatif, quant à lui, ne cible aucun gène connu dans les cellules mammifères et permet de s'assurer que le protocole de transfection en lui-même n'est pas délétère pour la cellule. En culture, on observe les cellules poursuivant un développement normal, sans mortalité cellulaire après traitement avec ce siARN.
Grâce à ces deux contrôles, on s'assure de la sensibilité et de la spécificité de la méthode de transfection. Si un changement est observé lors des tests avec les siARN visant les gènes d'intérêt, les résultats sont dûs à l'extinction du gène ciblé et non à une réaction parasite durant l'étape de transfection.

Après 72 h de transfection avec les siARN d'intérêt, la fréquence de coupure est mesurée sur les lignées HEK et LnCap. Chez les cellules HEK, les protéines sont absentes ou présentes en faible concentration dans la membrane et, suite à la transfection à 10 et 20 nM, il n'y a pas de différence significative par rapport à la fréquence de coupure initiale (figure 4.12, en pointillés). Il faut cependant préciser que la valeur à [siARN] = 0 a été mesurée après 72 h d'exposition à l'agent de transfection (Lipofectamine™) et est plus basse que la fréquence de coupure normalement observée pour des cellules HEK (25.10^3 Hz au lieu de 75.10^3 Hz). Une telle différence peut être expliquée par le passage de la Lipofectamine™à travers la membrane pour transporter les siARN dans l'espace intracellulaire. En effet, la Lipofectamine™, composée de lipides cationiques et neutres, fusionne avec la membrane plasmique, perturbant l'intégrité de cette dernière.
Dans les cellules LnCap, la fréquence de coupure à [siARN] = 0 est égale à 16.10^3 Hz et est plus basse comparée aux cellules HEK dans les mêmes conditions. Comme précédemment, les cellules cancéreuses présentent une fréquence de coupure inférieure aux cellules non cancéreuses, même lorsque l'intégrité de la membrane est compromise (de manière similaire entre les deux

lignées).Après extinction des gènes ciblés, d'une manière générale, la fréquence de coupure est plus élevée, passant par exemple de 16.10^3 Hz à 40.10^3 Hz à $[siARN]_{KCNN3} = 10$ nM et 48.10^3 Hz à $[siARN]_{KCNN3} = 20$ nM. La hausse de la fréquence de coupure est plus importante entre 0 et 10 nM (+67-73 % suivant la cible) qu'entre 10 et 20 nM de siARN (+ 5-17 %), ce qui implique que l'extinction de gène atteint un plateau à de plus hautes concentrations. La tendance de cette courbe montre que la concentration en protéines dans la membrane plasmique ne peut être diminuée indéfiniment.

La quantité de protéines présentes dans la membrane de la cellule a un impact significatif sur la fréquence de coupure : lorsque la concentration en protéines est faible, la fréquence de coupure est haute, et inversement. Les protéines étant le plus souvent chargées mais tout de même isolantes, elles ont une influence sur l'aptitude de la membrane à accumuler des charges. Et notamment, une plus grande quantité de protéines augmente la capacité électrique de la membrane, et donc diminue la fréquence de coupure.
Comme expliqué plus haut, il a été démontré que les replis que forment la membrane a un impact sur la fréquence de coupure. Une rugosité accrue entraîne une augmentation de la capacité C_{mem} et une diminution de la fréquence de coupure. L'aspect visuel des cellules en culture est semblable entre les différents puits, ce qui laisse à penser que la rugosité des cellules n'est pas altérée. Ce résultat vient confirmer les résultats précédents observés sur les différentes origines de la fréquence de coupure.

Ces résultats apportent la preuve que la concentration en protéines des membranes plasmiques est un facteur important pour les propriétés diélectriques. Cela explique en partie pourquoi les cellules d'espèces ou de types différents présentent des caractéristiques diélectrophorétiques qui leur sont propres. Cela permet également d'apporter de nouvelles hypothèses concernant l'évolution des propriétés diélectriques au cours de la cancérisation, la composition de la membrane plasmique étant bouleversée, avec la surexpression de certaines protéines et la disparition d'autres.
Si les propriétés diélectriques des cellules dépendent de nombreux facteurs entremêlés (rugosité, concentration en protéines et glyco-protéines, ...), la compréhension de l'influence de ces facteurs permet de mieux prédire la réponse des cellules au champ électrique et donc d'avancer vers de meilleures solutions de diagnostic et de détection des cancers.

> La membrane plasmique a été modifiée, pour comprendre les facteurs influençant les paramètres électriques et diélectriques de la cellule. Les échanges ioniques via les canaux de fuite ont été perturbés par des agents chimiques, pour augmenter le flux d'ions à travers la membrane (valinomycine) ou le stopper (quinine, vérapamil). La concentration de protéines dans la membrane a été diminuée par extinction de gène, en utilisant des *siARN*.
> Il a été observé que la fréquence de coupure augmente lorsqu'il y a une fuite d'ions vers l'extérieur de la membrane. Une augmentation de la quantité d'ions autour de la membrane (ou la diminution d'ions à l'intérieur de la cellule) modifie la polarisation de la cellule, et donc la fréquence à laquelle se trouve l'équilibre entre la polarisation du milieu et de la cellule.

> En revanche, l'augmentation de la quantité d'ions dans le cytoplasme n'a pas démontré de modifications significatives de la fréquence de coupure et donc la membrane joue bien le rôle d'isolant à la première fréquence de coupure.
> Lorsque la concentration en protéines est diminuée, la fréquence de coupure augmente significativement. Cette hypothèse pourrait permettre de comprendre en partie pourquoi les cellules cancéreuses ont toujours une fréquence de coupure plus basse que les cellules saines, en plus de la modification de la rigidité cellulaire.

4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, les différentes lignées étudiées ont été classées en trois groupes, où les différences inter-lignées sont décroissantes. Le premier groupe comporte des lignées provenant d'organes différents, adhérentes ou non, cancéreuses ou non. Le second comporte uniquement des cellules de prostate, toutes adhérentes, cancéreuses et non cancéreuses. Le dernier groupe contient des lignées de prostate, dont une non cancéreuse et les 3 autres représentant un modèle de progression cancéreuse.

Tout d'abord, le facteur de Clausius-Mossotti de toutes les lignées a été mesuré, à deux intervalles dans le temps. Les différences de facteur de Clausius-Mossotti entre les lignées sont significatives, même lorsque les lignées sont proches, comme deux cellules à un stade de cancérisation différent. De plus, la méthode est suffisamment spécifique pour mesurer une fréquence de coupure identique pour des cellules de mêmes lignées mesurées à des moments différents (plusieurs dizaines de semaines).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant aux différences observées entre les lignées. Ici, les cellules ayant une taille statistiquement similaire, la composition et la morphologie des membranes semble être le facteur principal de variation puisque la première fréquence de coupure dépend essentiellement des propriétés de la membrane plasmique. La concentration en protéines, en phospho-lipides, en acides gras, la présence et l'agencement des radeaux lipidiques sont autant de pistes à explorer.

Pour terminer, les éléments membranaires influençant les propriétés diélectriques des cellules ont été étudiés, plus particulièrement l'impact des échanges ioniques et la concentration en protéines membranaires. Il a été démontré que la fuite d'ions du cytosol vers le milieu extra cellulaire augmentait la fréquence de coupure, mais la raison de cette augmentation reste encore à explorer. L'effet inverse, bloquer les échanges ioniques, n'a pas eu d'impact significatif sur la fréquence de coupure. Il a également été démontré que la concentration en protéines a un effet important sur la fréquence de coupure, cette dernière augmentant lorsque la quantité de protéines dans la membrane diminue.

Tous ces éléments permettent de mieux comprendre l'origine de la fréquence de coupure et les raisons des variations observées entre différentes cellules. Mettre en lumière les raisons de ces variations permet de mieux comprendre la réponse des cellules à la diélectrophorèse et à plus long terme d'améliorer les puces microfluidiques pour perfectionner la détection et le suivi des cellules cancéreuses. Et ainsi, de pouvoir diagnostiquer plus précocement l'apparition d'un cancer, grâce à des technologies innovantes, et permettre une prise en charge plus rapide du patient et lui assurer de meilleurs chances de traitement.

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux était d'étudier la réponse de cellules humaines à un champ électrique, afin de caractériser et comparer différentes populations de cellules, notamment des cellules cancéreuses et non cancéreuses.

Les cellules exhibent des propriétés mécaniques et physiques qui leur sont propres, qui sont liées au type cellulaire et évoluent au cours de la vie de la cellule. Les propriétés électriques et diélectriques présentent l'avantage d'être sensibles à des changements minimes dans la cellule, et de refléter un changement d'état (engagement dans une voie de différentiation par exemple) précurseur des marqueurs habituels. Grâce à l'engouement pour la microfluidique et les laboratoires-sur-puce, de nombreuses technologies ont vu le jour pour mesurer les propriétés diélectriques des cellules. Ces dernières sont exploitées pour apporter de nouvelles approches pour la détection de cellules cancéreuses circulantes par exemple, et donc le diagnostic précoce d'un cancer.

Afin d'exercer une force de diélectrophorèse, qui repose sur l'application d'un champ électrique non uniforme sur une suspension cellulaire, des puces microfluidiques ont été fabriquées par des techniques classiques de lithographie. Des électrodes d'or ou d'ITO (transparentes) permettent d'appliquer un champ électrique local et leur forme impose la direction de déplacement des cellules. Les puces et le milieu de diélectrophorèse sont adaptés à la manipulation de cellules : les lames de verre sont traitées pour limiter l'adsorption des cellules, et le milieu est préparé de manière à conserver l'équilibre osmotique des cellules, tout en proposant une large gamme de conductivités.

Nous avons tout d'abord observé et rapporté la réponse des cellules aux forces électrocinétiques, dans différentes conditions de conductivité, de différences de potentiel, et de fréquences. Les phénomènes électro-hydrodynamiques impliqués dans le mouvement effectif des cellules ont été étudiés et confrontés à un modèle théorique. L'application d'un courant alternatif entraîne l'apparition des forces de diélectrophorèse, d'électrothermie et d'électro-osmose. La compréhension de la compétition entre ces forces est nécessaire pour l'analyse rigoureuse de la réponse des cellules.

À partir de cette analyse détaillée, deux méthodes ont été décrites pour mesurer les propriétés diélectriques des cellules. La première est basée sur la mesure de la vitesse de déplacement des cellules lorsqu'elles sont soumises uniquement à la diélectrophorèse, sans interférence des forces hydrodynamiques. Ainsi, il est possible de mesurer la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti, et de calculer la capacité électrique de la membrane. La deuxième méthode tire avantage de la rotation des cellules, observée autour de la fréquence de coupure, en l'absence d'un champ tournant. La vitesse de rotation étant maximale à la fréquence de coupure, il est possible de déterminer cette dernière sur un nombre significatif de cellules, en suivant le pic de rotation observé autour de la fréquence de coupure. Un programme a été développé pour automatiser le traitement vidéo et augmenter le débit de l'analyse.

Dans un second temps, chacune des méthodes a été exploitée pour caractériser des populations de cellules. La mesure du facteur de Clausius-Mossotti sur des groupes de lignées a montré

que cette technique est suffisamment sensible pour noter une différence significative entre des cellules à différents stades de cancérisation, ce qui représente une première démonstration sur des cellules humaines. La méthode est également spécifique, ce qui permet d'avoir des résultats identiques lorsque les mesures sont répétées.
Il apparaît systématiquement que les cellules cancéreuses ont une fréquence de coupure plus basse que les cellules non cancéreuses. La taille des cellules est souvent citée comme principal responsable, les cellules cancéreuses étant généralement plus grandes. Nous avons démontré que pour tous les états de cancérisation la fréquence de coupure reste inférieure aux cellules non cancéreuses.

L'origine de ces variations réside dans la morphologie et la composition de la membrane plasmique. En modifiant la composition de la membrane, et en observant la fréquence de coupure sur un nombre significatif de cellules, *via* la méthode de rotation, il a été démontré que l'augmentation du passage des ions à travers la membrane modifiait la fréquence de coupure. Mais surtout, la concentration en protéines de la membrane a été réduite en ciblant des protéines par extinction de gène. La fréquence de coupure correspondante s'en trouve systématiquement augmentée, ce qui pourrait expliquer la variation observée pour les cellules cancéreuses, qui surexpriment plusieurs protéines membranaires par rapport aux cellules non cancéreuses.

L'ensemble de ces résultats permet de mieux comprendre la manipulation des cellules par les champs électriques. Basé sur ce travail, observer les cellules *in vitro* au cours d'évènements comme la différentiation ou la cancérisation pourront être développées. Pour aller plus loin, ces connaissances permettront de donner naissance à de nouvelles technologies de diagnostic. Ainsi, au lieu d'avoir un test ciblé sur un type de cancer, il est envisageable d'imaginer un diagnostic généralisé. En créant une puce microfluidique où circulerait un échantillon sanguin le long d'électrodes transversales, il pourrait être possible de détecter une cellule au milieu de millions d'autres. En choisissant une fréquence déterminante, les cellules d'intérêt se retrouveraient arrêtées au niveau de l'électrode, permettant par la suite de les identifier et de réaliser des diagnostics très précoces de cancer, et donc de traiter la maladie plus rapidement et efficacement.

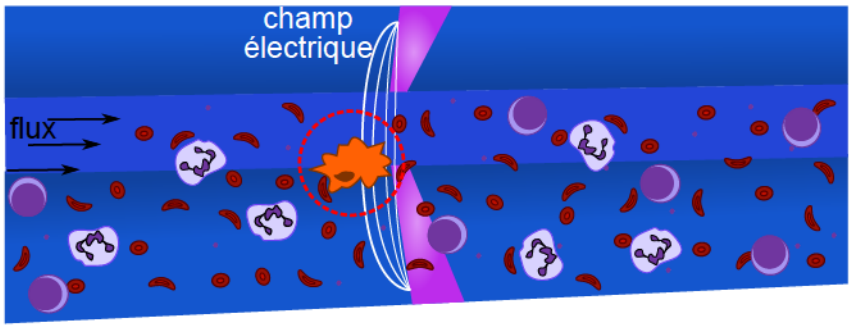


FIGURE 4.13 – Schéma représentatif de la détection d'une cellule cancéreuse parmi un échantillon sanguin par diélectrophorèse : la cellule est stoppée par des électrodes transversales au flux microfluidique.

Publications

Ce travail a donné lieu aux parutions scientifiques suivantes :

Articles scientifiques

1. C. Vaillier, T. Honegger, F. Kermarrec, X. Gidrol et D. Peyrade. *Comprehensive analysis of human cells motion under an irrotational AC electric field in an electro-microfluidic chip.* **Plos One** 9(4) : e95231 (2014).

2. C. Vaillier, T. Honegger, F. Kermarrec, X. Gidrol et D. Peyrade. *Involvement of membrane proteins and ion channels on the self-rotation of human cells in a non-rotating AC electric field.* **Electrophoresis** 36(9-10) :1123-1129 (2015).

Conférences internationales

1. C. Benoit, T. Honegger, E. Picard et D. Peyrade. *Interactions between functional colloids and cells.* 38th International Conference on Micro and Nano Engineering. Septembre 2012, Toulouse (France), Présentation orale.

2. C. Benoit, A. Bourrier, T. Honegger, E. Picard, M. Zelsmann et D. Peyrade. *Design of a 3D electro-microfluidic chip for dielectrophoretic handling of particles inside cells.* 39th International Conference on Micro and Nano Engineering. Septembre 2013, Londres (Grande Bretagne), Présentation orale.

3. C. Benoit, T. Honegger et D. Peyrade. *Self-Rotation and Electrikinetic Properties of Cells in a Non-Rotational AC Electric Field.* 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS). Octobre 2013, Freiburg (Allemagne), Poster.

4. C. Iss, H. Joisten, T. Dietsch, S. Leulmi, M. Morcrette, S. Auffret, E. Gautier, P. Sabon, Y. Hou-Broutin, T. Livache, J. Faure-Vincent, R. Calemczuk, C. Benoit, D. Peyrade et B. Dieny. *Magnetic micro :nano tweezers functionalized for biological and medical applications.* 55th International Conference of Magnetism and Magnetic Materials. Novembre 2013, Denver (USA), Présentation orale.

5.C. Vaillier, T. Honegger, X. Gidrol et D. Peyrade.*Automated characterization of cells using self-rotation effect in a non-rotational AC electric field : influence of membrane modification.* Dielectrophoresis. Juillet 2014, Londres (Grande Bretagne), Présentation orale.

Annexe A

Fabrication des électrodes par lithographie

La fabrication des électrodes sur les puces d'or ou d'ITO se fait selon des protocoles classiques de microfabrication, par lithographie optique. Pour les puces en or, une étape préliminaire est nécessaire, pour déposer l'or sur une lame de verre standard.

A.1 Dépôt métallique

Le dépôt de métal se fait sur une lame propre, dans un évaporateur à faisceaux d'électrons (Plassys). Le matériau cible est bombardé par un faisceau d'électrons, dans une chambre sous vide d'air. Les molécules sont dispersées en phase gazeuse et se déposent dans la chambre, et sur la lame. La vitesse de déposition peut être ajustée, sachant qu'un dépôt rapide sera plus rugueux et moins homogène qu'un dépôt lent.
Ici, une couche d'accroche en titane est déposée, pour permettre à l'or de mieux adhérer sur la lame de verre. Le titane (15 nm) et l'or (135 nm) sont donc déposés successivement à une vitesse de 0.5 nm/sec.

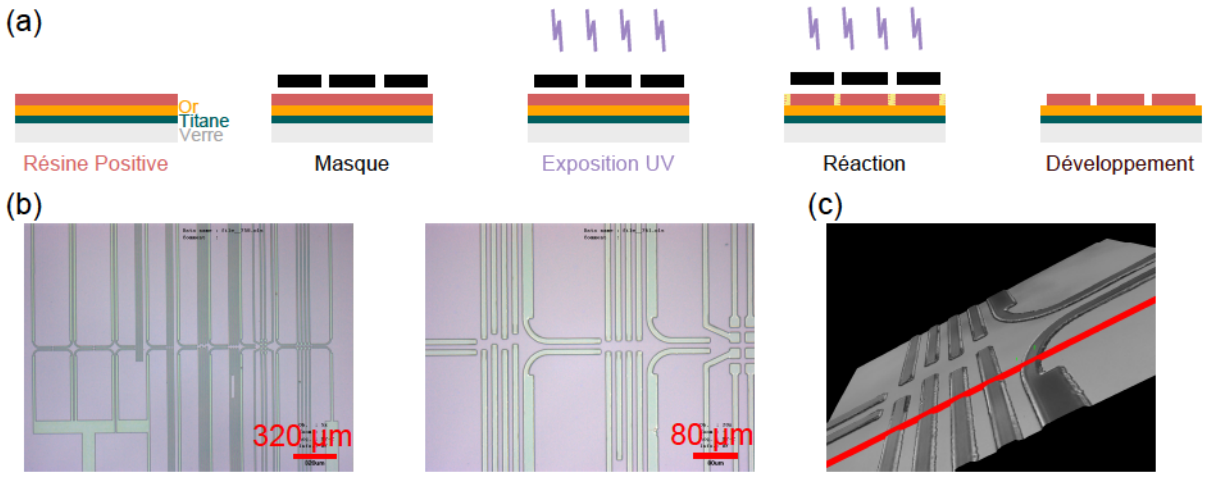


Figure A.1 – **Lithographie.** (a) Schéma de la procédure pour des puces avec des électrodes en or. (b) Photographies à l'objectif 5x et 20x. (c) Image 3D reconstituée après imagerie confocale en 3D.

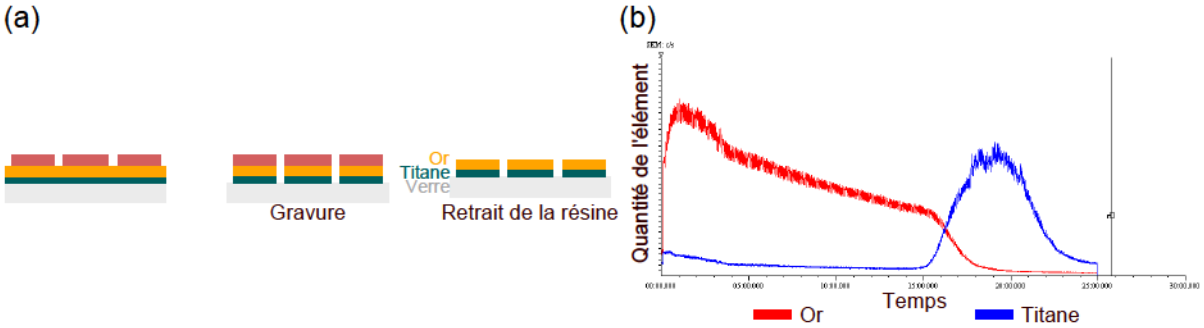


FIGURE A.2 – **Gravure.** (a) Schéma de la procédure pour des puces avec des électrodes en or. (b) Suivi de la gravure par spectrométrie de masse.

Les étapes de lithographie sont réalisées en salle blanche, dans une pièce à éclairage inatictinique, sans UVs. La résine AZ1512HS (1,5 μm, MicroChemicals) est ensuite étalée par enduction centrifuge sur la lame préalablement recouverte d'un promoteur d'adhérence (TiPrime, MicroChemicals, figure A.1). Les deux sont étalés à 3000 *rpm* pendant 30 *s*, suivi d'un recuit à 110 ° pendant 120 *s* qui accélère l'évaporation du solvant. L'exposition aux UVs se fait à travers un masque (verre sodocalcique/chrome, Toppan Photomasks) pendant 5,7 *s* sur substrat or, 6,2 *s* sur substrat ITO, avec une pression de contact de 1,5 bar entre l'échantillon et le masque (et un flux de 18 $mW.cm^{-2}$ @ 365 *nm* et de 32.9 $mW.cm^{-2}$ @ 405 *nm*). La résine (positive) exposée devient alors soluble dans son révélateur et les motifs sont développés dans un bain d'AZ Developer (MicroChem), fraîchement dilué dans l'eau (1 :1 en volume), pendant 30 secondes. L'échantillon est plongé dans un bain d'eau pour stopper la réaction et séché sous flux d'azote. La lithographie est contrôlée par microscopie confocale, pour vérifier l'absence de défauts. La lame est ensuite exposée à une gravure physique, à faisceau d'ions (*Ion Beam Etching*, Plassys). Les parties de la lame non protégées par la résine sont gravées par le bombardement des ions (figure A.2). Le flux d'ions argon est maintenu entre 2,4 et 2,6 *sccm* (pour *standard cubic centimeter per minute*) avec une puissance du signal RF de 400 *W*. Une rotation de l'échantillon à 10 *rpm* permet d'assurer une gravure uniforme. Un spectromètre de masse (*Secondary Ion Mass Spectrometry*) permet détecter les ions relargués lors de la gravure, pour suivre et adapter le temps de gravure. La gravure est arrêtée lorsque la quantité d'ions relargués est nulle.
Les lames sont alors stockées avant d'être utilisées.

Annexe B

Plateforme de diélectrophorèse

La plateforme électromicrofluidique comporte trois modules : optique, électrique et microfluidique. Le module microfluidique n'a pas été utilisé dans le cadre des travaux de cette thèse, mais reste un élement indispensable lors de l'utilisation de puces 3D.

B.1 Module optique

La puce est insérée dans un connecteur à zéro force d'insertion (ZIF), qui permet le maintien de la puce et la transmission du courant électrique. Les connecteurs ZIF sont montés dans un support aluminium, lui-même fixé à une platine motorisée (Markhauser) permettant de déplacer la zone d'observation lorsque l'échantillon est soumis à un courant électrique. L'ensemble est monté sur un microscope Leica possédant quatre objectifs à longue distance focale (5, 10, 20 et 50X) et différentes illuminations détaillées dans l'annexe suivant (Annexe C). L'observation de la puce se fait au moyen d'une caméra CCD couleur (Manta G201C, Allied Vision Technologies), avec une résolution de 1624*1234 px et une fréquence d'enregistrement de 14 images par seconde.

B.2 Module électrique

Le module électrique permet l'application d'un ou plusieurs potentiels sur une ou plusieurs électrodes. En suivant le chemin des générateurs jusqu'à la puce, le module se découpe en plusieurs sections : les générateurs sont reliés à un circuit électronique pour adresser la(les) électrode(s) active(s). Des nappes électriques permettent l'acheminement du courant jusqu'à un circuit imprimé sur lequel est relié un connecteur ZIF (*Zéro Force d'Insertion*, PCI ZIF Testconnecteur, AP Products GmbH). La puce électro-microfluidique vient s'insérer dans le connecteur en position "ouvert" et le contact électrique ainsi que le maintien mécanique se font lorsque le connecteur est en position "fermé".

Deux potentiels différents peuvent être délivrés, grâce à deux générateurs électriques (TG2000, TTi). Chacun est capable de délivrer une tension continue (5 V maximum) ou alternative (0-10 MHz, en signal sinusoïdal, triangulaire ou carré, 20 V_{pp} maximum). Dans la suite de cette thèse, seuls des potentiels alternatifs sinusoïdaux sont appliqués.

Un circuit électronique composé de micro-contrôleurs (MC33996, Freescale Semiconductor) et de relais électro-magnétiques (Multicomp HRA-S-DC5V) permet l'adressage des électrodes, de manière individuelle ou collective. Il est ainsi possible d'appliquer le courant sur une ou plusieurs électrodes sélectionnée(s).

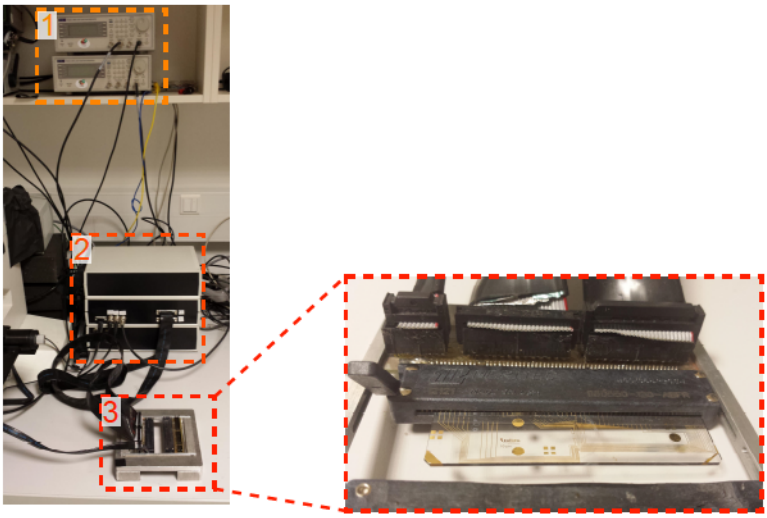


FIGURE B.1 – **Photographie du module électrique seul.** 1- Générateurs, 2- Module électronique d'adressage des électrodes et 3- Connecteur ZIF pour la puce. L'encadré montre une image agrandie lorsque la puce est insérée dans le connecteur.

Les nappes blindées permettent la transmission du courant uniquement sur les électrodes activées, sans activation des électrodes voisines. Le circuit imprimé au niveau du ZIF relie chacun de ses contacts avec le fil de la nappe correspondant. Des pinces en cuivre viennent en contact avec les macro-électrodes lorsque le ZIF est en position "fermé".

B.3 Interface logicielle

L'intégralité de la plateforme est contrôlée par un logiciel développé sous Labview (National Instruments). Ce dernier permet le contrôle du module électrique, en choisissant la fréquence et le voltage de sortie pour chaque générateur. Il est également possible d'entrer une séquence de potentiels sur une ou plusieurs électrode(s) dans un temps imparti, via un fichier texte écrit manuellement. L'activation des électrodes est également contrôlée via ce logiciel, avec pour chacune le choix d'être raccordée au premier ou au second générateur. Par défaut, toutes les électrodes non activées sont reliées à la masse.
L'interfaçage de la caméra avec Labview permet de visualiser et d'enregistrer des images ou des vidéos à partir de l'image totale ou d'une région d'intérêt. Le temps d'acquisition de la caméra peut être ajusté, en essayant d'obtenir l'équilibre optimal entre l'acquisition d'une image claire et une fréquence d'enregistrement correcte (au moins 10 images par secondes, *ips*).
Le module microfluidique est lui aussi interfacé avec Labview. Il est possible de contrôler la valve du pousse-seringue pour connecter ce dernier avec l'extérieur (atmosphère) ou le circuit microfluidique. Le pousse-seringue peut être rempli ou vidé entièrement en une fois, ou pas à pas (réglable). Un mode séquentiel est également intégré, suivant le même procédé que pour les séquences de courant électrique.

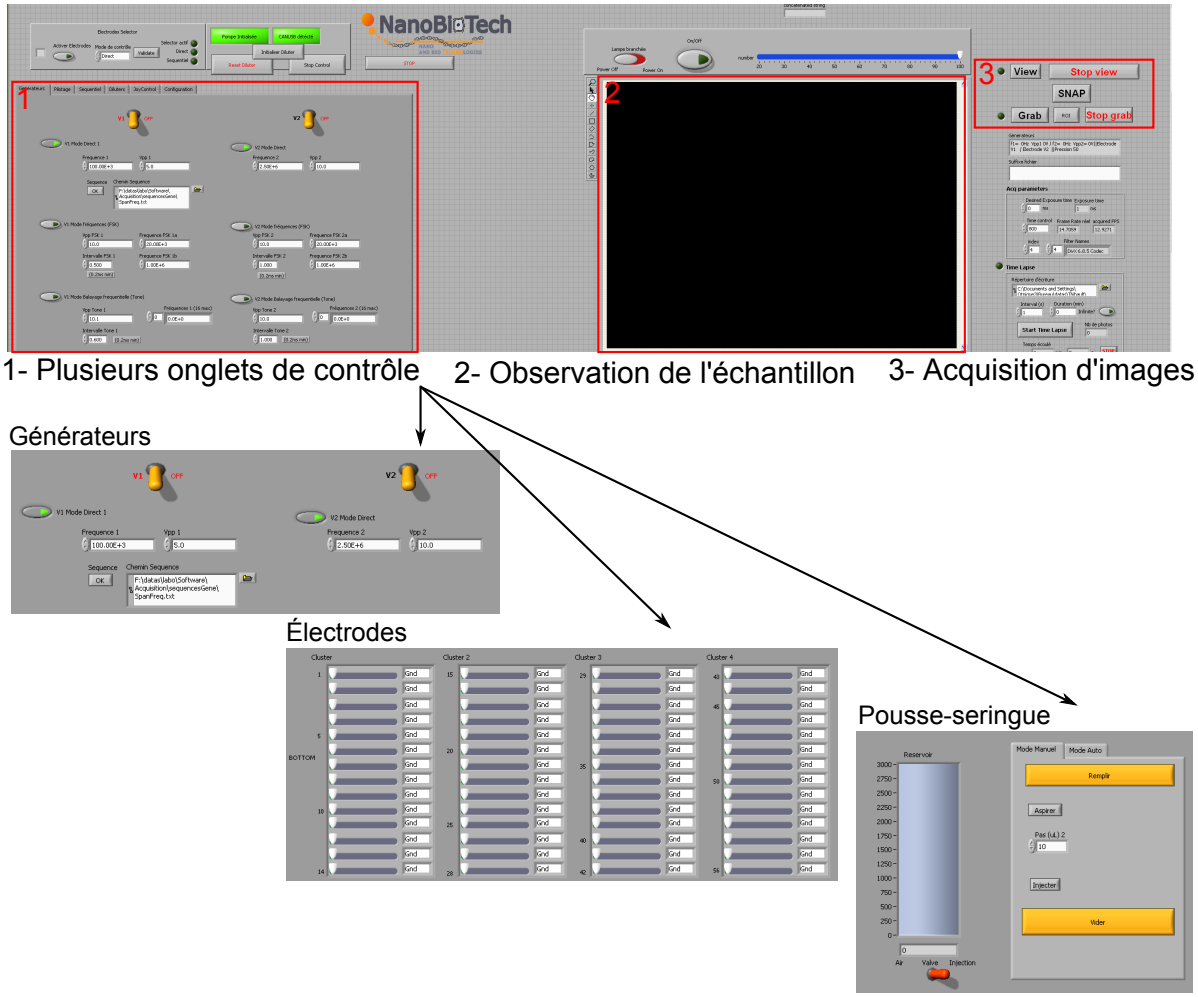


FIGURE B.2 – **Vue d'ensemble du logiciel d'interfaçage de la table d'expérimentation.** Le contrôle des différents modules est mis en évidence dans les encadrés rouges : 1- Onglets de contrôle pour les générateurs, les électrodes et le pousse seringue ; 2- Affichage de la caméra ; 3- Acquisition de photos et vidéos.

B.4 Module fluidique

Un module microfluidique est également implémenté à la plateforme, et sera détaillé brièvement puisqu'il n'a pas été utilisé dans le cadre de ces travaux.
Afin d'optimiser l'écoulement dans des canaux fluidiques de faible dimension (1 à 50 μm de hauteur), le circuit microfluidique installé permet de travailler à pression constante, évitant ainsi un temps d'écoulement trop long (effet "bouchon" observé lorsque le liquide est directement poussé à travers les canaux par un pousse-seringue). Le liquide chargé via une boucle d'injection (100 μL maximum) est mis en mouvement par de l'air, compressé en amont par un pousse-seringue automatique (Cavro XP 3000, Tecan). L'injection dans la puce microfluidique se fait au moyen de capillaires et de connecteurs dédiés (Nanoport N-333, Upchurch).

Annexe C

Illuminations disponibles sur le banc de manipulation

Pour observer la suspension cellulaire, différentes illuminations sont disponibles sur le microscope et sont détaillées ci-après.

C.1 Microscopie en champ sombre

Les faisceaux lumineux arrivent par le côté de l'échantillon, en incidence rasante, et la lumière diffusée par l'échantillon est collectée, comme schématisé sur la figure C.1(a). L'illumination par champ sombre est parfaitement adaptée pour la visualisation de microparticules (figure C.1(b), mais pas pour des objets biologiques réfringents comme les cellules (figure C.1(c-d)). Les électrodes d'or de la puce reflètent fortement la lumière et apparaissent en orangé. Il est tout de même possible de distinguer légèrement les cellules sur des puces en ITO, en augmentant le temps d'acquisition de la caméra. Puisque l'ITO est transparent, le capteur de la caméra n'est pas saturé par la réflexion de la lumière sur l'électrode.

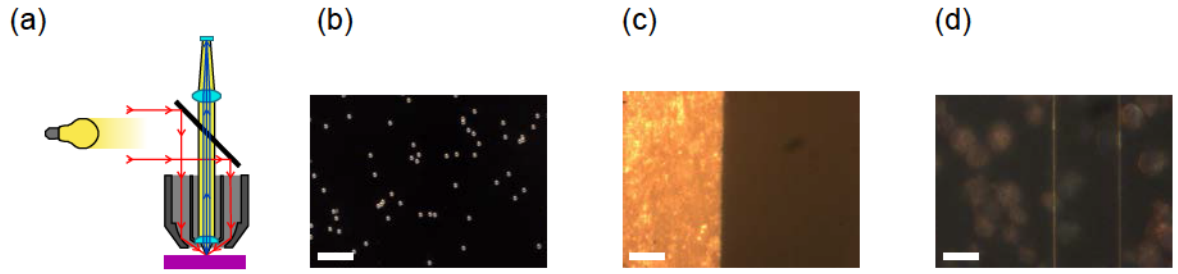


Figure C.1 – **Observations en illumination en champ sombre.** (a) Schéma du trajet lumineux. Les faisceaux lumineux (en rouge) arrivent en incidence rasante sur l'échantillon (violet). La lumière reflétée (en bleu) par l'échantillon remonte le long de la colonne optique est collectée par des lentilles (bleu clair) avant d'atteindre la caméra. (b-d) Photos de la visualisation de microparticules de polystyrène de 2 μm(b), et de cellules ((c) sur une puce en or et (d) sur une puce en ITO). La barre d'échelle représente 20 μm.

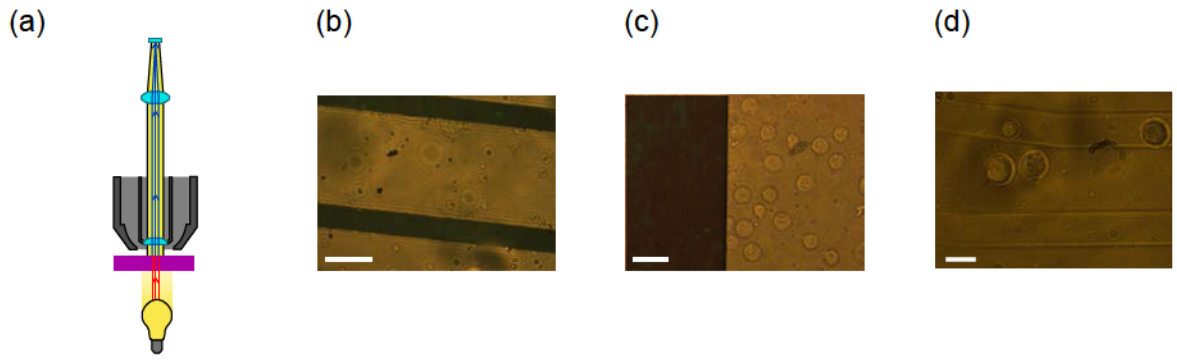


FIGURE C.2 – **Observations en illumination en champ clair (transmission).** (a) Schéma du trajet lumineux. La lumière traverse l'épaisseur de l'échantillon (en violet), et la lumière transmise (en bleue) est collectée par l'objectif. (b-d) Photos de la visualisation de microparticules de polystyrène de 1 μm(b) et de cellules ((c) sur une puce en or et (d) sur une puce en ITO). La barre d'échelle représente 20 μm.

C.2 Microscopie par transmission (champ clair)

Dans ce mode, l'illumination se fait par le dessous de l'objet et la lumière transmise est collectée par dessus de manière à ce que la lumière traverse l'échantillon (C.2(a)). Ici, l'illumination en champ clair est la plus adaptée puisque les contours des cellules sont visibles, ainsi que l'inhomogénéité de leur cytoplasme. Elle a été ajoutée au microscope en plaçant une LED sous l'échantillon, pour que la source lumineuse traverse la puce avant d'être collectée par les objectifs situés au-dessus. Cette fois, les électrodes d'or sont opaques à la lumière et apparaissent en noir. Les électrodes d'ITO apportent l'avantage supplémentaire de pouvoir observer les cellules qui se trouvent au-dessus d'une électrode par transparence.
Un autre avantage de cet éclairage est qu'il laisse la possibilité d'ajouter une deuxième illumination via la lampe du microscope. Des doubles illuminations (transmission / fluorescence) ont été utilisées lorsqu'un marquage fluorescent de l'actine par exemple a été réalisé pour différencier des types cellulaires.

C.3 Microscopie de fluorescence

Le dispositif se compose d'une lampe et d'un filtre positionné entre la source et l'échantillon (filtre d'excitation), afin de sélectionner les longueurs d'onde spécifiques (inférieures ou égales, passe-bas) à l'excitation du fluorophore utilisé. Après excitation de l'échantillon, la fluorescence émise passe un second filtre (filtre d'émission), positionné en aval de l'échantillon dans le chemin optique, qui permet de récolter uniquement les longueurs d'onde supérieures et égales à celles émises (passe-haut). Un miroir dichroïque permet de refléter la lumière d'excitation entre la lampe et l'échantillon et de transmettre la longueur d'onde d'émission entre l'échantillon et la caméra (figure C.3a).

Pour visualiser de manière spécifique des composants cellulaires, des marqueurs fluorescents commerciaux sont disponibles, spécifiques des membranes, cytoplasme ou acides nucléiques. Ils apportent le grand avantage de traverser les membranes de cellules vivantes. Un des plus connus

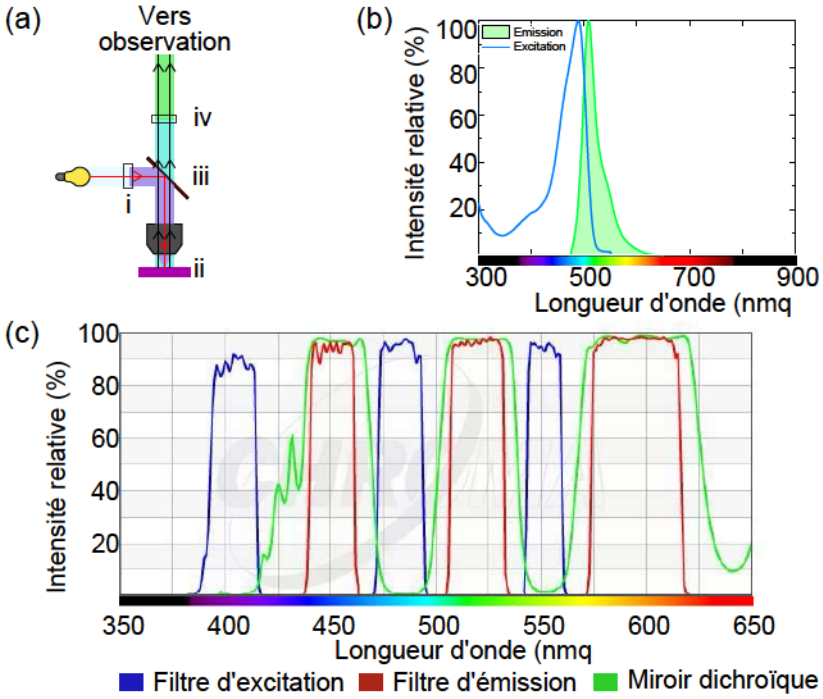


FIGURE C.3 – **Illumination par fluorescence.** (a) Chemin optique : le filtre d'excitation (ii) sélectionne les longueurs d'onde qui illuminent l'échantillon (ii). Le miroir dichroïque (iii) réfléchit ces rayons à travers l'objectif. La fluorescence émise est transmise par le miroir et la plage de longueur d'onde d'intérêt est filtrée par le filtre d'émission (iv) avant d'atteindre la caméra. (b) Spectres d'excitation et d'émission de la GFP, adapté de Fluorescence SpectraViewer, LifeTechnologies.(c) Spectres des filtres d'excitation et d'émission et du miroir dichroïque du set de multifluorescence, adapté de Chroma Technology.

est le 4'-6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), capable de se lier fortement à l'ADN et de marquer le noyau des cellules. Dans certains cas, nous avons marqué une protéine du cytosquelette, l'actine, avec une étiquette fluorescente (GFP, pour *Green Fluorescent Protein*).

Comme les cellules sont vivantes et en suspension lors des expériences, il était nécessaire de pouvoir observer plusieurs fluorescences en direct : le noyau (fluorescence bleue, émission à λ = 450-490 nm) et l'actine (fluorescence verte, émission à λ = 504 nm) par exemple. Pour cela, un set de filtres dédié (Set 69000 "DAPI/FITC/TRITC", Chroma Technology) a été monté sur le microscope avec des filtres d'excitation/émission et un miroir dichroïque dédiés à la multifluorescence. En effet, comme le montre la figure C.3(c), le filtre d'excitation (en bleu) permet le passage de 3 fourchettes de longueurs d'onde différentes, centrées à 402 nm (violet proche UV), 490 nm (bleu) et 572 nm (jaune). Ces longueurs d'onde sont reflétées quasiment totalement par le miroir dichroïque (en vert, intensité relative du passage de ces longueurs d'onde à travers le filtre proche de 0). Après illumination de l'échantillon, trois fluorescences sont récoltées simultanément, grâce au filtre d'émission (en rouge), avec des pics centrés à 455 nm (bleu), 535 nm (vert) et 632 nm (rouge-orangé).
Afin d'observer les trois fluorescences simultanément, une lampe développant une illumination large spectre (de 350 à 700 nm) de 1950 *lumens* (ThorLabs, HPLS-30-03) est montée en amont. Si l'illumination n'apporte pas une énergie suffisante, il faut accroître le temps d'acquisition de la caméra, faisant baisser la fréquence d'images enregistrées. Par exemple, lorsque la lampe est à 20 % d'intensité (pour simuler un éclairage de plus faible puissance), le temps d'acquisition nécessaire pour obtenir une image convenable est d'environ 250 ms, soit une fréquence de de 4 à 5 *ips*. Le seuil pour qu'un film soit fluide pour l'oeil humain est de 24 *ips*. Avec cette lampe, on peut donc enregistrer à une fréquence d'environ 20 *ips*, à pleine puissance (temps d'acquisition de 50 ms).

Annexe D

Méthode expérimentale pour déterminer la capacité membranaire

Il est possible de calculer la capacité électrique de la membrane cellulaire en mesurant la fréquence de coupure à différentes conductivités. Le coefficient directeur de la droite α (sur un graphique avec σ_m en abscisse et $r * f_{x0}$ en ordonnée) est relié à la capacité électrique par l'équation D.1.

$$C_{mem} = \frac{1}{\pi.\sqrt{2}.\alpha} \tag{D.1}$$

Expérimentalement, la fréquence de coupure est simplement observée comme le moment où la cellule n'est plus ni attirée ni repoussée par l'électrode. À faible voltage (V $<$ 3 V_pp), la rotation des cellules est minimisée, sans être totalement absente. Au final, la rotation des cellules est à peine observée qu'à la valeur de la fréquence de coupure, ce qui facilite l'observation de cette dernière, et la rend plus impartiale. La valeur de la fréquence de coupure est pondérée en fonction du rayon de la cellule.

Un exemple des mesures obtenues sur la lignée JURKAT est donné dans la figure D.1(a). La fréquence de coupure est observée pour des conductivités allant de 10^{-3} à 10^{-2} S/m, sur 3 cellules différentes. Après régression linéaire, la pente de la droite vaut $\alpha_{JURKAT} = 26,9 \pm 1,9$ (R^2 = 0,981).

L'expérience est répétée pour les autres lignées du premier groupe, HEK et PC3, et les moyennes des fréquences de coupure sont tracées sur la figure D.1(b). Les pentes respectives de ces deux lignées sont $\alpha_{HEK} = 21,6 \pm 0,6$ (R^2 = 0,996) et $\alpha_{PC3} = 20,2 \pm 1,9$ (R^2 = 0,966). Selon l'équation 1.22, les capacités électriques de chaque lignée sont calculées et présentées dans le tableau D.1.

À partir de la modélisation de la fréquence de coupure par la mesure de la capacité membranaire, les lignées peuvent être séparées. Les 3 lignées (HEK, JURKAT et PC3) ont une capacité électrique C_{mem} propre à chacune, et la lignée PC3 (cancéreuse) est celle qui a la plus haute. Expérimentalement, cela se traduit par la fréquence de coupure la plus basse. L'avantage majeur de la mesure de C_{mem} est la modélisation du facteur de Clausius-Mossotti afin de pouvoir prédire la fréquence de coupure. Un modèle mathématique a été réalisé sous Matlab (MathWorks) pour tracer spécifiquement le facteur de Clausius-Mossotti d'une cellule, à partir de la conductivité du milieu, la capacité électrique de la lignée et le diamètre mesuré par l'observation. On peut également appliquer le modèle sur une moyenne de taille d'un échantillon pour

Lignée	JURKAT	HEK	PC3
C_{mem} ($mF.m^{-2}$)	8,37	10,42	11,14

Table D.1 – Valeurs des capacités électriques des membranes de cellules JURKAT, HEK et PC3.

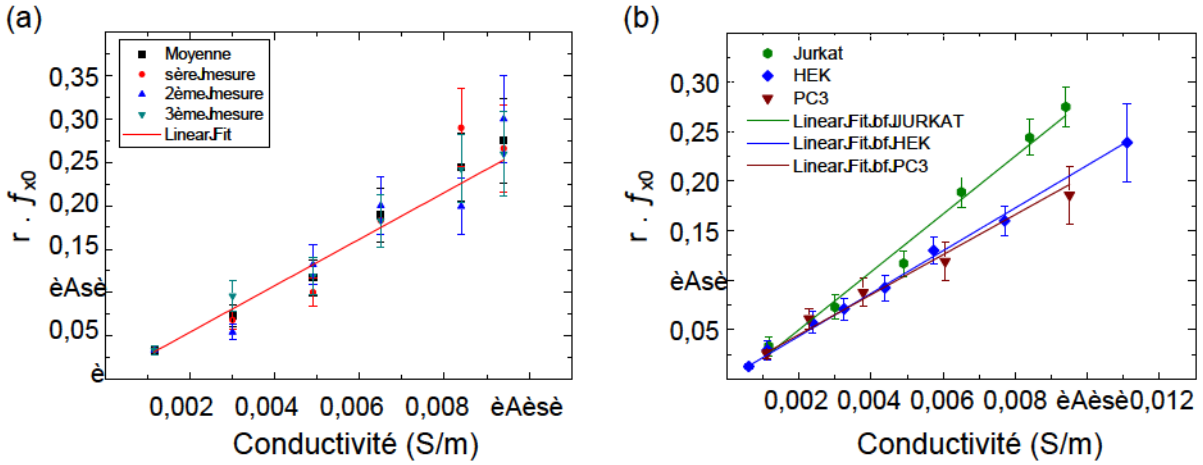


FIGURE D.1 – **Mesures expérimentales de C_{mem}.** (a) Graphique de la mesure de la fréquence de coupure pour la lignée JURKAT à différentes conductivités, pour 3 cellules différentes par point. La capacité électrique de la membrane est calculée selon l'équation 1.22 où α est le coefficient directeur de cette courbe. (b) Moyennes sur 3 cellules et régressions linéaires de la fréquence de coupure pour les lignées HEK, JURKAT et PC3.

calculer la fréquence de coupure moyenne de la lignée.
En connaissant la valeur exacte de la fréquence de coupure, il est possible de séparer 2 types de cellules mélangés en solution, en induisant une réponse à la diélectrophorèse différente pour chaque type de cellule. La figure D.2(a) montre le facteur de Clausius-Mossotti calculé pour les cellules HEK et JURKAT observées en (b). L'actine des cellules HEK est marquée à la *GFP*, pour permettre de les différencier. La fréquence de coupure de la cellule de la lignée HEK vaut 14.10^3 Hz et celle de la cellule JURKAT 32.10^3 Hz. Il existe donc une fenêtre entre ces deux fréquences de coupure où les cellules ont une réponse différente à la diélectrophorèse. La figure D.2(b) montre la réponse de ces deux cellules aux trois fréquences choisies :

- à $f = 5.10^3$ Hz : pour les deux cellules, $Re[FCM(\omega)] < 0$, les deux lignées sont sans surprise repoussées de l'électrode (nDEP).
- à $f = 50.10^3$: $Re[FCM(\omega)] > 0$: les deux lignées sont en diélectrophorèse positive, et attirées vers l'électrode.
- à une fréquence intermédiaire, se trouvant dans la fenêtre entre les deux fréquences de coupure, $f = 20.10^3$ Hz : $Re[FCM(\omega)]_{HEK} > 0$ et $Re[FCM(\omega)]_{JURKAT} < 0$. Les deux cellules ne présentent pas la même réponse à la diélectrophorèse.

Le deuxième scénario de la figure D.2(b) montre en effet que la cellule HEK est attirée vers l'électrode alors que la cellule JURKAT en est repoussée faiblement. N'étant au départ pas au plus proche de l'électrode, la force de diélectrophorèse n'est pas maximale, cela explique la différence de distance parcourue par la cellule JURKAT par rapport à la cellule HEK.
En exploitant les différences des propriétés diélectriques de ces deux types cellulaires, il serait possible de les séparer. Un autre motif d'électrodes permettrait de diriger un type cellulaire vers un canal de sortie, et le deuxième vers un autre canal de sortie, comme présenté par *Gossett et al* dans leur revue sur la séparation de cellules [37].

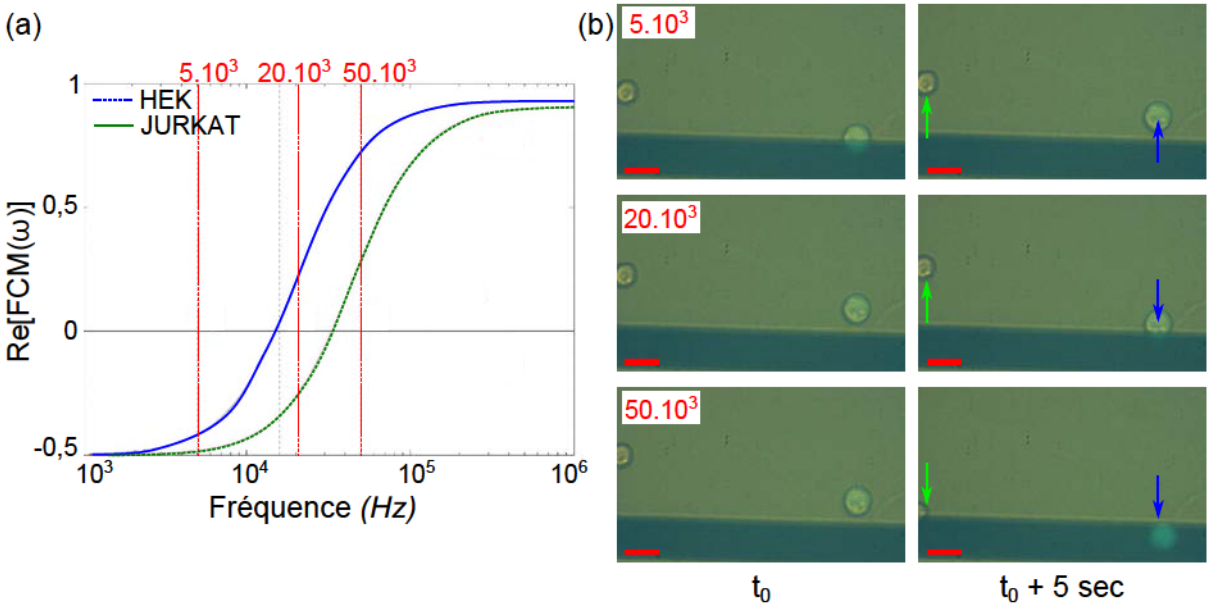


FIGURE D.2 – **Séparation de 2 types cellulaires.** (a) facteurs de Clausius-Mossotti correspondants aux cellules HEK (en bleu) et JURKAT (en vert) observées expérimentalement, (b) Déplacement des cellules JURKAT (cellule de gauche) et HEK (cellule de droite, fluorescente), après 5 secondes à 3 fréquences différentes. La barre d'échelle vaut 20 μm.

Annexe E

Extinction de gènes

L'information codant pour les protéines est stockée dans l'ADN de la cellule, situé dans le noyau (Figure E.1). Le gène correspondant à une protéine est copié en ARN messager (ARNm) au cours de la transcription. Cet ARNm est transporté dans le cytoplasme de la cellule et la protéine est synthétisée par les ribosomes au cours de la traduction. La protéine est ensuite envoyée sur son lieu d'action (la membrane en l'occurence), via différents mécanismes regroupés sous le terme "adressage". [1]
Afin de perturber l'expression des protéines transmembranaires, plusieurs techniques étaient envisageables. L'extinction de gène par interférence ARN a été préférée au *knock-out*. Le *knock-out* (rarement appelé invalidation génique) se base sur une technique de biologie moléculaire appelée recombinaison homologue, où le gène initial de la cellule est remplacé par une copie incomplète qui empêche l'expression du gène. Cette technique est fastidieuse à mettre en place, mais permet par la suite d'obtenir une lignée cellulaire stable n'exprimant plus la protéine ciblée.
L'interférence ARN conduit à une baisse transitoire de l'expression de la protéine et est techniquement beaucoup plus simple à réaliser. C'est au départ un mécanisme de base du fonctionnement de la cellule, permettant de réguler l'expression des gènes en empêchant la traduction de l'ARNm. En introduisant un ARN extérieur, il est possible de moduler "manuellement" l'expression du gène ciblé.

Pour cela, de petits ARN interférents (siARN, pour *small interferent RNA*) sont complexés à un agent de transfection qui, de par sa nature lipidique, permet le passage des membranes plasmiques sans la détériorer (par électroporation par exemple). Ces petits ARN double-brin (une vingtaine de nucléotides) sont immédiatement pris en charge par un complexe protéique (RISC, pour *RNA-induced silencing complex*) qui les clivent en ARN simple brin. Ils viennent reconnaître de manière très spécifique l'ARNm cible et se lient à la séquence complémentaire présente sur cet ARNm (long de plusieurs dizaines à milliers de nucléotides, suivant le gène transcrit). La formation d'un ARN double brin enclenche un processus systématique de dégradation de l'ARN, et empêche la traduction en protéine du gène codé. Les protéines déjà présentes dans la membrane sont éliminées naturellement au cours du temps, et non remplacées puisqu'il n'y a plus (ou très peu) de protéines disponibles nouvellement synthétisées.

1. Au niveau moléculaire, la synthèse de protéines et l'interférence ARN est plus complexe, mais n'a pas lieu d'être présentée dans ce manuscrit.

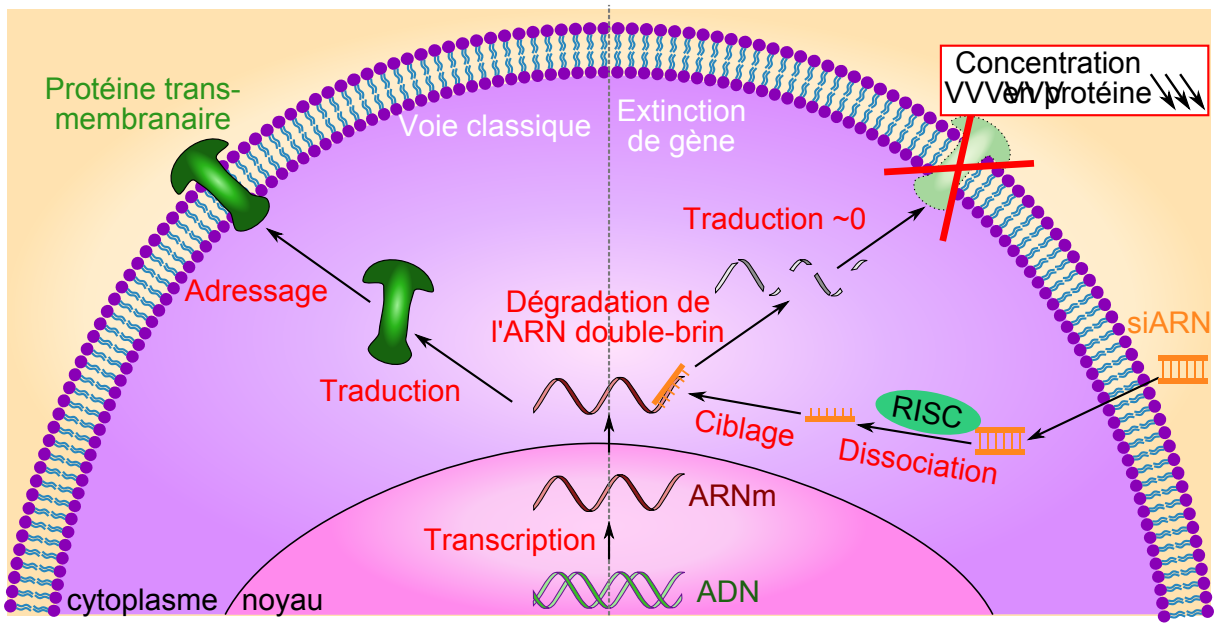


FIGURE E.1 – **Modification de la concentration en protéines dans la membrane plasmique.** Schéma explicatif de l'extinction de gène. Le fragment d'ARN pénètre dans la cellule, est clivé en ARN monobrin. Il vient se lier spécifiquement à un ARNm, ce qui entraîne la destruction immédiate de ce dernier, et empêche la traduction en protéine.

Annexe F

Mesure de la fréquence de coupure après modification de la membrane

Les mesures de la fréquence de coupure après modification de la membrane, par voie chimique ou biologique sont réalisées par la méthode de rotation. Les graphiques obtenus pour chacune des mesures sont présentés ici.

F.1 Modification de la membrane par voie chimique

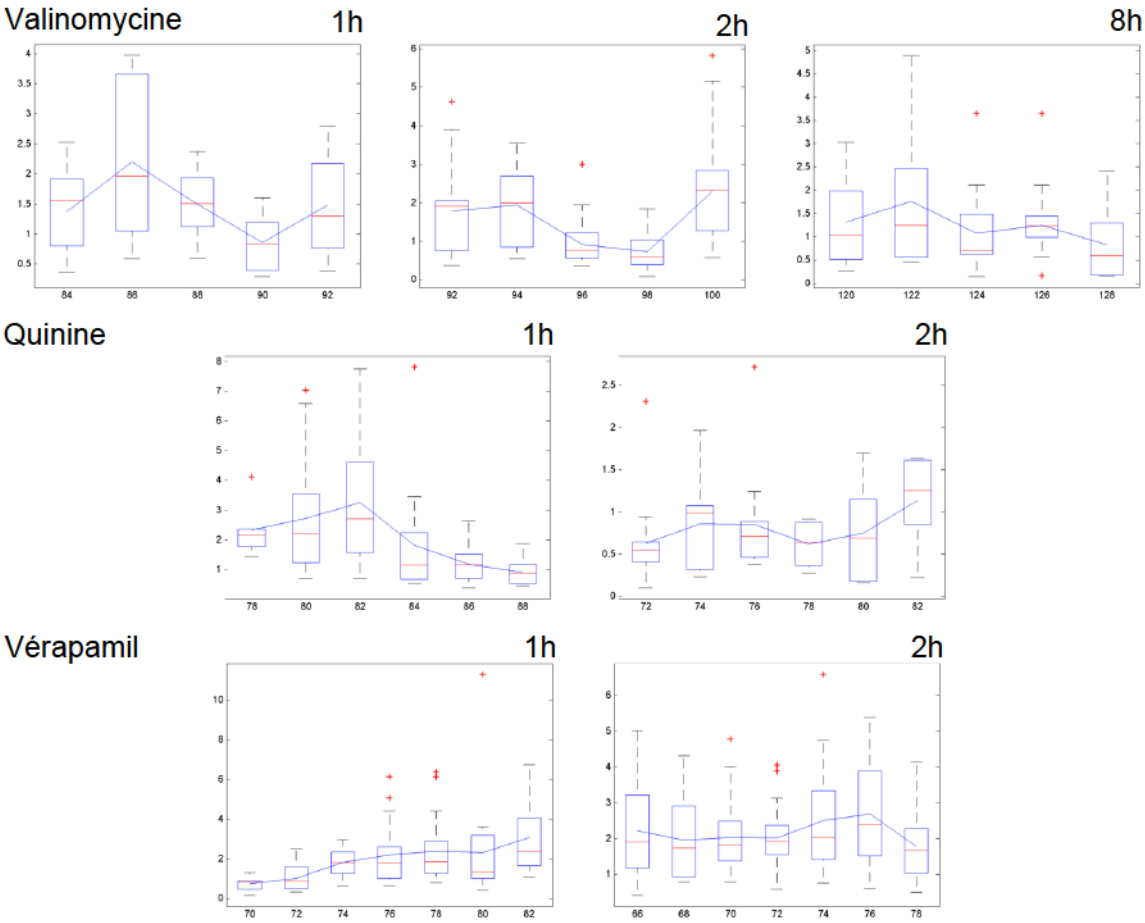


Figure F.1 – **Rotation des cellules HEK après modification chimique de la membrane.** Graphes de la vitesse de rotation en fonction de la fréquence, à $\sigma_m = 2.10^{-2}\ S/m$ après traitement à la valinomycine (0,1 μM), à la quinine (200 μM) ou au vérapamil (70 μM).

F.2 Modification de la membrane par voie biologique

F.2.1 Sur les cellules témoins HEK

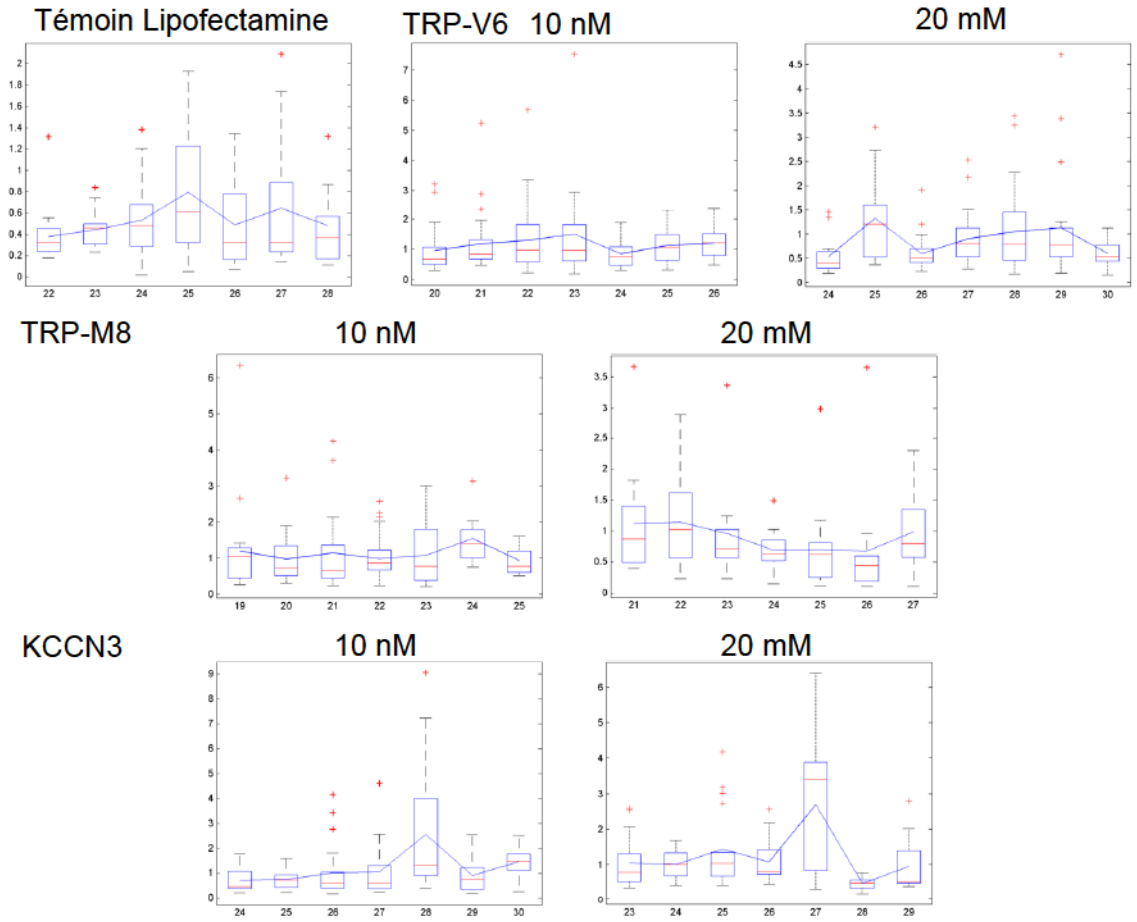


FIGURE F.2 – **Rotation des cellules HEK après modification de la membrane par extinction de gène.** Graphes de la vitesse de rotation en fonction de la fréquence, à $\sigma_m = 2.10^{-2}$ S/m après traitement avec des siARNs ciblant les gènes TRP-V6, TRP-M8 et KCCN3 à 10 ou 20 μM. Le témoin correspond à la fréquence de coupure des cellules après traitement à la lipofectamine.

F.2.2 Sur les cellules LnCap

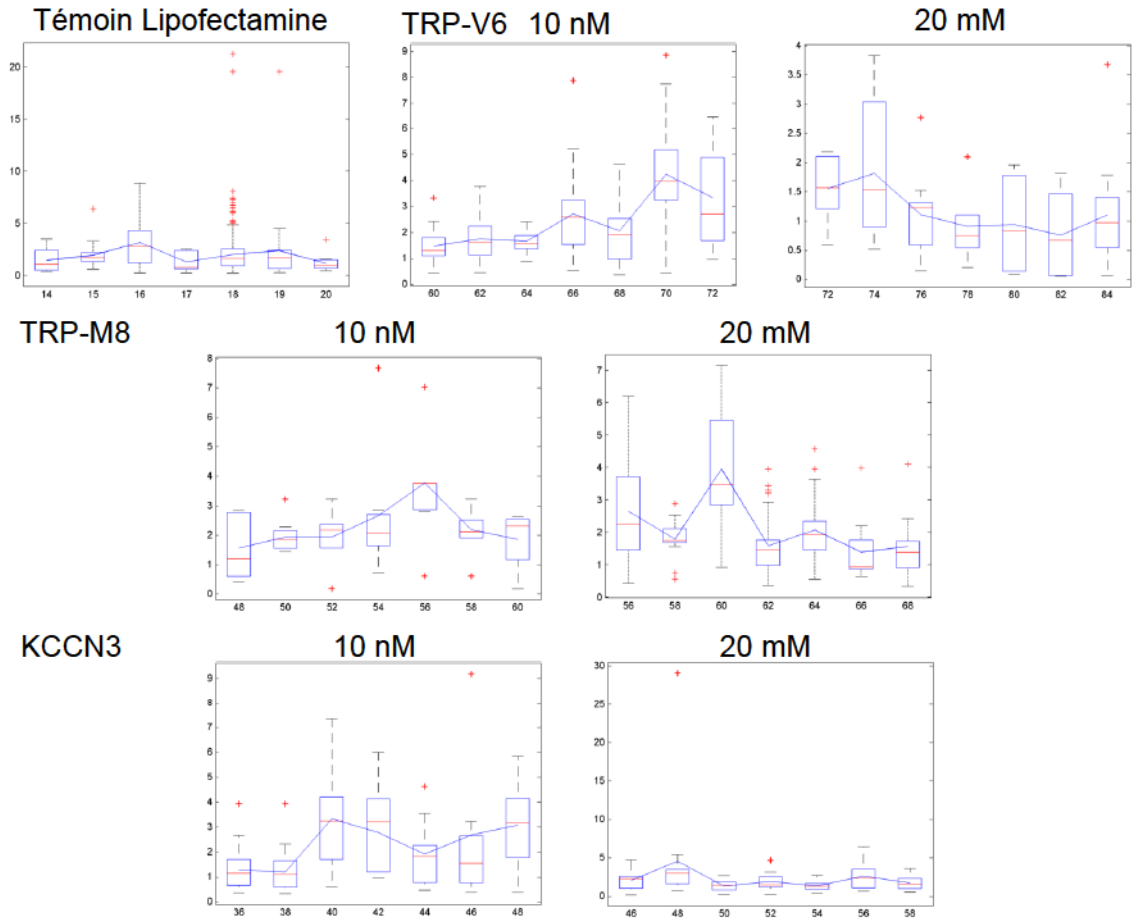


FIGURE F.3 – **Rotation des cellules LnCap après modification de la membrane par extinction de gène.** Graphes de la vitesse de rotation en fonction de la fréquence, à $\sigma_m = 2.10^{-2}$ S/m après traitement avec des siARNs ciblant les gènes TRP-V6, TRP-M8 et KCCN3 à 10 ou 20 μM. Le témoin correspond à la fréquence de coupure des cellules après traitement à la lipofectamine.

Bibliographie

[1] Andrea Adamo, Armon Sharei, Luigi Adamo, ByungKun Lee, Shirley Mao, and Klavs F. Jensen. Microfluidics-based assessment of cell deformability. *Analytical Chemistry*, 84 :6438–6443, 2012.

[2] Jonathan D. Adams, Unyoung Kim, and H. Tom Soh. Multitarget magnetic activated cell sorter. *Proceedings of the Na*, 105(47) :18165–18170, 2008.

[3] W. M. Arnold and U Zimmermann. Electro-rotation : development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *Journal of Electrostatics*, 21(2-3) :151–191, September 1988.

[4] George J Augustine, Dona M Chikaraishi, Michael D Ehlers, Gillian Einstein, David Fitzpatrick, William C Hall, Erich Jarvis, Lawrence C Kats, Julie Kauer, Anthony-Samuel LaMantia, James O McNamara, Richard D Mooney, Miguel AL Nicololis, D Purves, Peter H Reinhart, Sidney A Simon, JH Pate Skene, James Voyvodic, Leonard E White, and S Mark Williams. *Two Voltage-Dependent Membrane Conductances*, volume Chapter 3. Sinauer Associates, Inc, 2004. Two Voltage-Dependent Membrane Conductances.

[5] Pierre O. Bagnaninchi and Nicola Drummond. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(16) :6462–6467, 2011.

[6] F F Becker, X B Wang, Y Huang, R Pethig, J Vykoukal, and P R Gascoyne. Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3) :860–864, January 1995.

[7] Christopher B. Black, Thomas D. Duensing, Linda S. Trinkle, and R. Terry Dunlay. Cell-based screening using high-throughput flow cytometry. *Assay*, 9(1) :13–20, 2011.

[8] W. A. Bonner, H. R. Hulett, R. G. Sweet, and L. A. Herzenberg. Fluorescence Activated Cell Sorting. *Review of Scientific Instruments*, 43(3) :404–409, 1972.

[9] Sangwon Byun, Sungmin Son, Dario Amodei, Nathan Caermal, Josephine Shaw, Joon Ho Kang, Vivian C. Hecht, Monte M. Winslow, Tyler Jacks, Parag Mallick, and Scott R. Manalis. Characterizing deformability and surface friction of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19) :7580–7585, 2013.

[10] A Castellanos, A Ramos, A G Lez, N G Green, and H Morgan. Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems : Scaling laws. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 36(1) :2584–2597, 2003.

[11] K L Chan, H Morgan, E Morgan, I T Cameron, and M R Thomas. Measurements of the dielectric properties of peripheral blood mononuclear cells and trophoblast cells using AC electrokinetic techniques. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1500(3) :313–322, March 2000.

[12] Aurélie Chantome, Marie Potier-Carterau, Lucie Clarysse, Gaelle Fromont, Séverine Marionneau-Lambot, Maxime Guéguinou, Jean-Christophe Pagès, Christine Collin, Thibauld Oullier, Alban Girault, Flavie Arbio, Jean-Pierre Haelters, Paul-Alain Jaffrès, Michelle Pinault, Pierre Besson, Virginie Joulin, Philippe Bougnoux, and Christope Vandier. Pivotal Role of the Lipid Raft SK3–Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases. *Cancer Research*, 73(15) :4852–4861, 2013.

[13] Long-Ho Chau, Wenfeng Liang, Florence Wing Ki Cheung, Wing Keung Liu, Wen Jung Li, Shih-Chi Chen, and Gwo-Bin Lee. Self-Rotation of Cells in an Irrotational AC E-Field in an Opto-Electrokinetics Chip. *PloS one*, 8(1) :e51577, 2013.

[14] Baoguo Chen, Mingjie Zhou, and Lisa X. Xu. Study of vascular endothelial cell morphology during hyperthermia. *Journal of Thermal Biology*, 30 :111–117, 2005.

[15] Jian Chen, Jason Li, and Yu Sun. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab on a chip*, 12(10) :1753–67, April 2012.

[16] Colin Chung, Martin Waterfall, Steve Pells, Anoop Menachery, Stewart Smith, and Ronald Pethig. Dielectrophoretic Characterisation of Mammalian Cells above 100 MHz. *J Electr Bioimp*, 2 :64–71, 2011.

[17] Henry F. Clemo and Clive Marc Baumgarten. cGMP and Atrial Natriuretic Factor Regulate Cell Volume of Rabbit Atrial Myocytes. *Circulation Research*, 77 :741–749, 1995.

[18] R P Daniele and S K Holian. A potassium ionophore (valinomycin) inhibits lymphocyte proliferation by its effects on the cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10) :3599–602, October 1976.

[19] Cristina E. Davis, Joshua J. Rychak, Bouvard Hosticka, Scott C. Davis, Edward John III, Amy L. Tucker, Pamela M. Norris, and J. Randall Moorman. A novel method for measuring dynamic changes in cell volume. *Journal of applied physiology*, 96 :1886–1893, 2004.

[20] Il Doh and Young-Ho Cho. A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process. *Sensors and Actuators A : Physical*, 121(1) :59–65, May 2005.

[21] K. Drewnowska and C. M. Baumgarten. Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes : bumetanide, chlorothiazide, and ouabain. *American Journal of Physiology*, 260(1) :C122–C131, 1991.

[22] Jaideep S. Dudani, Daniel R. Gossett, Henry T. K. Tse, and Dino Di Carlo. Pinched-flow hydrodynamic stretching of single-cells. *Lab Chip*, 13 :3728–3734, 2013.

[23] Michael Edidin. Lipid microdomains in cell surface membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(4) :528 – 532, 1997.

[24] Markus U. Ehrengruber, D. A. Deranleau, and Thomas D. Coates. SHAPE OSCILLATIONS OF HUMAN NEUTROPHIL LEUKOCYTES : CHARACTERIZATION AND RELATIONSHIP TO CELL MOTILITY. *The Journal of Experimental Biology*, 199 :741–747, 1996.

[25] J. M. England and M. C. Down. Measurement of the Mean Cell Volume using Electronic Particle Counters. *British Journal of Haematology*, 32(3) :403–410, 1976.

[26] Alain Fischer, Charles Auffray, and Anne Durandy. Les molécules d'adhésion des lymphocytes T. *Médecine/Sciences*, 3 :334–342, 1987.

[27] Lisa a Flanagan, Jente Lu, Lisen Wang, Steve a Marchenko, Noo Li Jeon, Abraham P Lee, and Edwin S Monuki. Unique dielectric properties distinguish stem cells and their differentiated progeny. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(3) :656–65, March 2008.

[28] Zachary R Gagnon. Cellular dielectrophoresis : Applications to the characterization, manipulation, separation and patterning of cells. *Electrophoresis*, 32 :2466–2487, 2011.

[29] Patricia Gangoiti, Luz Camacho, Lide Arana, Alberto Ouro, Maria H. Granado, Leyre Brizuela, Josefina Casas, Gemma FabriÃ¡s, JosÃ© Luis Abad, Antonio Delgado, and Antonio

GÃ³mez-MuÃ±oz. Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids : Implications in disease. *Progress in Lipid Research*, 49(4) :316 – 334, 2010.

[30] P Gascoyne, R Pethig, J Satayavivad, F F Becker, and M Ruchirawat. Dielectrophoretic detection of changes in erythrocyte membranes following malarial infection. *Biochimica et biophysica acta*, 1323(2) :240–52, January 1997.

[31] Peter R C Gascoyne, Sangjo Shim, Jamileh Noshari, Frederick F Becker, and Katherine Stemke-Hale. Correlations between the dielectric properties and exterior morphology of cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation. *Electrophoresis*, 34(7) :1042–50, April 2013.

[32] Peter R C Gascoyne and Jody Vykoukal. Particle separation by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 23(13) :1973–1983, 2002.

[33] P.R. Gascoyne and J.V. Vykoukal. Dielectrophoresis-Based Sample Handling in General-Purpose Programmable Diagnostic Instruments. *Proceedings of IEEE : Institute of Electrical and Electronics Engineers*, 92(1) :22–42, 2004.

[34] Lamya Ghenim, Hirokazu Kaji, Yu Hoshino, Takeshi Ishibashi, Vincent Haguet, Xavier Gidrol, and Matsuhiko Nishizawa. Monitoring impedance changes associated with motility and mitosis of a single cell. *Lab on a chip*, 10(19) :2546–50, October 2010.

[35] J Gimsa. A comprehensive approach to electro-orientation, electrodeformation, dielectrophoresis, and electrorotation of ellipsoidal particles and biological cells. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 54(1) :23–31, August 2001.

[36] J Gimsa, T Müller, T Schnelle, and G. Fuhr. Dielectric spectroscopy of single human erythrocytes at physiological ionic strength : dispersion of the cytoplasm. *Biophysical Journal*, 71(1) :495–506, 1996.

[37] Daniel R Gossett, Westbrook M Weaver, Albert J Mach, Soojung Claire Hur, Henry Tat Kwong Tse, Wonhee Lee, Hamed Amini, and Dino Di Carlo. Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8) :3249–67, August 2010.

[38] Marthe L. Gray, Robert A. Hoffman, and W. Peter Hansen. A new method for cell volume measurement based on volume exclusion of a fluorescent dye. *Cytometry*, 3(6) :428–434, 1983.

[39] Jeremy B.A. Green. Sophistications of cell sorting. *Nature Cell Biology*, 10 :375–377, 2008.

[40] J. Guck, R. Ananthakrishnan, H. Mahmood, T. J. Moon, C. C. Cunningham, and K. Kas. The optical stretcher : a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical Journal*, 81(2) :767–784, 2001.

[41] Song-I Han, Young-Don Joo, and Ki-Ho Han. An electrorotation technique for measuring the dielectric properties of cells with simultaneous use of negative quadrupolar dielectrophoresis and electrorotation. *Analyst*, 138 :1529–1537, 2013.

[42] Chen-Ta Ho, Ruei-Zeng Lin, Wen-Yu Chang, Hwan-You Chang, and Cheng-Hsien Liu. Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap. *Lab on a Chip*, 6(6) :724–734, 2006.

[43] Robert M. Hochmuth. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics*, 33 :15–22, 2000.

[44] David Holmes, David Pettigrew, Christian H. Reccius, James D. Gwyer, Cees van Berkel, Judith Holloway, Donna E. Davies, and Hywel Morgan. Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry. *Lab Chip*, 9 :2881–2889, 2009.

[45] Thibault Honegger. *Electrocinétique tridimensionnelle de particules colloïdales en géométrie microfluidique et application à la manipulation de cellules.* PhD thesis, Université de Grenoble, 2011.

[46] Thibault Honegger, Kévin Berton, Emmanuel Picard, and David Peyrade. Determination of Clausius–Mossotti factors and surface capacitances for colloidal particles. *Applied Physics Letters*, 98(18) :181906, 2011.

[47] Thibault Honegger, Mark A Scott, Mehmet F Yanik, and Joel Voldman. Electrokinetic confinement of axonal growth for dynamically configurable neural networks. *Lab on a Chip*, 13(4) :589–598, 2013.

[48] Chengjun Huang, Ailiang Chen, Lei Wang, Min Guo, and Jun Yu. Electrokinetic measurements of dielectric properties of membrane for apoptotic HL-60 cells on chip-based device. *Biomedical microdevices*, 9(3) :335–43, June 2007.

[49] Ying Huang, Xiao-Bo Wang, Peter R.C. Gascoyne, and Frederick F. Becker. Membrane dielectric responses of human T-lymphocytes following mitogenic stimulation . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1417(1) :51 – 62, 1999.

[50] Y. Hübner, K. F. Hoettges, G. E. N. Kass, S. L. Ogin, and M P Hughes. Parallel measurements of drug actions on erythrocytes by dielectrophoresis, unsig a three-dimensional electrode design. *IEEE Proceedings Nanobiotechnologies*, 152(4) :150–154, 2005.

[51] Y Inai, M Yabuki, T Kanno, J Akiyama, T Yasuda, and K Utsumi. Valinomycin induces apoptosis of ascites hepatoma cells (AH-130) in relation to mitochondrial membrane potential. *Cell structure and function*, 22(5) :555–63, October 1997.

[52] A Ismail, MP Hughes, HJ Mulhall, ROC Oreffo, and FH Labeed. Characterization of human skeletal stem and bone cell populations using dielectrophoresis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(2) :162–168, 2012.

[53] Steven L. Jacques. Optical Properties of biological tissues : a review. *Physics in Medicine and Biology*, 58 :R37–R61, 2013.

[54] T B Jones and Masao Washizu. Multipolar dielectrophoretic and electrorotation theory. *Journal of Electrostatics*, 37 :121–134, 1996.

[55] Thomas B Jones. Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 22(6) :33–42, 2003.

[56] Elizabeth C. Jury, Fabian Flores-Borja, and Panagiotis S. Kabouridis. Lipid rafts in T cell signalling and disease . *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(5) :608 – 615, 2007. Membrane Lipid Microdomains : Roles in Signalling and Disease and 3D Chromatin Structure Inside the Cell Nucleus.

[57] K V Kaler and T B Jones. Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitation. *Biophysical Journal*, 57(2) :173–182, 1990.

[58] B. E. Kashevskii, S. B. Kashevskii, I. V. Prokhorov, E. N. Aleksandrova, and Yu P. Istomin. Magnetophoresis and the Magnetic Susceptibility of HeLa Tumor Cells. *Biophysics*, 51(6) :902–907, 2006.

[59] Unyoung Kim, Chih-Wen Shu, Karen Y Dane, Patrick S Daugherty, Jean Y J Wang, and H T Soh. Selection of mammalian cells based on their cell-cycle phase using dielectrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52) :20708–12, December 2007.

[60] Kiyohide Kojima. Molecular Aspects of the plasma membrane in tumor cells. *Journal of medical science*, 56 :1–18, 1993.

[61] P.W. Kuchel, B.E. Chapman, W.A. Bubb, P. E. Hansen, C.J. Durrant, and M.P. Hertzberg. Magnetic Susceptibility : Solutions, Emulsions and Cells. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 18A(1) :56–71, 2003.

[62] Chau-Hwang Lee and Wan-Chen Lin. Non-interferometric wide-field optical profilometry with nanometer depth resolution. *Laser and Electro-Optics*, (1) :33–34, 2002.

[63] Junghun Lee, Youngwoong Kim, Minchurl Kim, Byungkyu Kim, and Ji Yoon Kang. Negative-dielectrophoresis separation modules based high throughput and high efficient cell sorting platform for leukemia cell. In *Sensors, 2011 IEEE*, pages 1874–1877, Oct 2011.

[64] U Lei, Pei-Hou Sun, and Ronald Pethig. Refinement of the theory for extracting cell dielectric properties from dielectrophoresis and electrorotation experiments. *Biomicrofluidics*, 5(4) :044109–16, December 2011.

[65] Rikke Leth-Larsen, Rikke R. Lund, and Henrik J. Ditzel. Plasma Membrane Proteomics and Its Application in Clinical Cancer Biomarker Discovery. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9 :1369–1382, 2010.

[66] Y. J. Lo, U. Lei, K. Y. Chen, Y. Y. Lin, C. C. Huang, M. S. Wu, and P. C. Yang. Derivation of the cell dielectric properties based on Clausius-Mossotti factor. *Applied Physics Letters*, 104(11) :113702, March 2014.

[67] Y. J. Lo, Y. Y. Lin, U. Lei, M. S. Wu, and P. C. Yang. Measurement of the Clausius-Mossotti factor of generalized dielectrophoresis. *Applied Physics Letters*, 104(8) :083701, February 2014.

[68] Oleg Lunov, Vitalii Zablotskii, Olexander Churpita, Eliška Chánová, Eva Syková, Alexandr Dejneka, and Šárka Kubinová. Cell death induced by ozone and various non-thermal plasmas : therapeutic perspectives and limitations. *Scientific Reports*, 4(7129), 2014.

[69] Michelle C. Mazzoni, Evy Lundgrend, Karl-E Arfors, and Marcos Intaglietta. Volume Changes of an Endothelial Cell Monolayer on Exposure to Anisotonic Media. *Journal of Intracellular Physiology*, 140 :272–280, 1989.

[70] S Meister, B Frey, YR Lang, US Gaipl, G Schett, U Schlötzer-Schrehardt, and RE Voll. Calcium channel blocker verapamil enhances endoplasmic reticulum stress and cell death induced by proteasome inhibition in myeloma cells. *Neoplasia*, 12(7) :550–561, 2010.

[71] Hywel Morgan and Nicholas G. Green. *AC Electrokinetics : Colloids and Nanoparticles.* Research Studies Press, 2003.

[72] Hywel Morgan and Nicolas G. Green. *AC Electrokinetics : Colloids and Nanoparticles.* Research Studies Pr, 2008.

[73] Hayley J. Mulhall, Michael P. Hughes, Batool Kazmi, Mark P. Lewis, and Fatima H. Labeed. Epithelial cancer cells exhibit different electrical properties when cultured in 2D and 3D environments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(11) :5136 – 5141, 2013.

[74] José Coelho Neto, Ubirajara Agero, Ricardo T. Gazzinelli, and N. Mesquita, Oscar. Measuring Optical and Mechanical Properties of a Living Cell with Defocusing Microscopy. *Biophysical Journal*, 91 :1108–1115, 2006.

[75] BA Niemeyer, C Bergs, U Wissenbach, V Florckerzi, and C Trost. Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca2+ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6) :3600–3605, March 2001.

[76] J. L. Nourse, J. L. Prieto, A. R. Dickson, J. Lu, M.M. Pathak, F. Tombola, M. Demetriou, A. P. Lee, and L. A. Flanagan. Membrane Biophysics Define Neuron and Astrocyte Progenitors in the Neural Lineage. *Stem Cells*, 32(3) :706–716, 2014.

[77] Jonghyun Oh, Robert Hart, Jorge Capurro, and Hongseok Noh. Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform AC electric fields in a microchannel. *Lab on a Chip*, 9(1) :62–78, 2009.

[78] Huei-Jyuan Pan, Ruei-Lin Wang, Jian-Long Xiao, Yu-Jen Chang, Yun-Ru Cheng, Ji-Yen andChen, and Chau-Hwang Lee. Using optical profilometry to characterize cell membrane roughness influenced by amyloid-beta 42 aggregates and electric fields. *Journal of Biomedical Optics*, 19(1) :011009, 2014.

[79] Kidong Park, Larry J. Millet, Namjung Kim, Xiaozhong Jin, Gabriel Popescu, N. R. Aluru, K Jimmy Hsia, and Rashid Bashir. Measurement of adherent cell mass and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(48) :20691–20696, 2010.

[80] R Pethig. Review Article-Dielectrophoresis : Status of the theory, technology, and applications. *Biomicrofluidics*, 4(2) :22811, 2010.

[81] R Pethig, L M Jakubek, R H Sanger, E Heart, E D Corson, and P J S Smith. Electrokinetic measurements of membrane capacitance and conductance for pancreatic ÎÂ²-cells. *IEE Proceedings : Nanobiotechnology*, 152(6) :189–193, 2005.

[82] R Pethig and M S Talary. Dielectrophoretic detection of membrane morphology changes in Jurkat T-cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *IET Nanobiotechnology*, 1(1) :2–9, 2007.

[83] Ronald Pethig, Richard S. Lee, and Mark S. Talary. Cell Physiometry Tools based on Dielectrophoresis. In *Journal of Laboratory Automation*, volume 9. SAGE, 2004.

[84] H A Pohl. The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields. *Journal of App. Phy.*, 22(7) :869, 1950.

[85] H a Pohl and J S Crane. Dielectrophoresis of cells. *Biophysical journal*, 11(9) :711–27, September 1971.

[86] Erica D Pratt, Chao Huang, Benjamin G Hawkins, Jason P Gleghorn, and Brian J Kirby. Rare Cell Capture in Microfluidic Devices. *Chemical engineering science*, 66(7) :1508–1522, April 2011.

[87] Alireza Salmanzadeh, Elizabeth S. Elvington, Paul C. Roberts, Eva M. Schmelz, and Rafael V. Davalos. Sphingolipid metabolites modulate dielectric characteristics of cells in a mouse ovarian cancer progression model. *Integr. Biol.*, 5 :843–852, 2013.

[88] Alireza Salmanzadeh, Michael B Sano, Roberto C Gallo-Villanueva, Paul C Roberts, Eva M Schmelz, and Rafael V Davalos. Investigating dielectric properties of different stages of syngeneic murine ovarian cancer cells. *Biomicrofluidics*, 7(1) :11809, January 2013.

[89] P. Salvo, R. Verplancke, F. Bossuyt, D. Latta, B. Vandecasteele, C. Liu, and J. Vanfleteren. Adhesive bonding by SU-8 transfer for assembling microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics*, 13(6) :987–991, June 2012.

[90] Michael B. Sano, Erin A. Henslee, Eva Schmelz, and Rafael V. Davalos. Contactless dielectrophoretic spectroscopy : Examination of the dielectric properties of cells found in blood. *ELECTROPHORESIS*, 32(22) :3164–3171, 2011.

[91] B. Schmitz, A. Radbruch, T. KÃ¼mmel, C. Wickenhauser, H. Korb, M.L. Hansmann, J. Thiele, and R. Fischer. Magnetic activated cell sorting (MACS) â€" a new immunomagnetic method for megakaryocytic cell isolation : Comparison of different separation techniques. *European Journal of Haematology*, 52(5) :267–275, 1994.

[92] Sungmin Son, Amit Tzur, Yaochung Weng, Paul Jorgensen, Jisoo Kim, Marc W. Kirschner, and Scott R. Manalis. Direct observation of mammalian cell growth and size regulation. *Nature Methods*, 9(9) :910–912, 2012.

[93] Eric M. Strohm and Michael C. Kolios. Quantifying the ultrasonic Properties of cells during apoptosis using time resolves acoustic microscopy. *IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings*, pages 49–52, 2009.

[94] Hao-Wei Su, Javier L Prieto, and Joel Voldman. Rapid dielectrophoretic characterization of single cells using the dielectrophoretic spring. *Lab Chip*, 13(20) :4109–4117, 2013.

[95] L Tsavaler, MH Shapero, S Morkowski, and R Laus. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium Channel proteins. *Cancer Res*, 61 :3760–3769, 2001.

[96] M D Vahey and J. Voldman. An Equilibrium Method for Continuous-Flow Cell Sorting Using Dielectrophoresis. *Analytical Chemistry*, 80(9) :3135–3143, 2008.

[97] M D Vahey and J Voldman. High-throughput cell and particle characterization using isodielectric separation. *Analytical Chemistry*, 81(7) :2446–2455, 2009.

[98] María Ll Valero, Fernanda Mello de Queiroz, Walter Stühmer, Félix Viana, and Luis a Pardo. TRPM8 ion channels differentially modulate proliferation and cell cycle distribution of normal and cancer prostate cells. *PloS one*, 7(12) :e51825, January 2012.

[99] Srinivas Velugotla, Steve Pells, Heidi K Mjoseng, Cairnan R E Duffy, Stewart Smith, Paul De Sousa, and Ronald Pethig. Dielectrophoresis based discrimination of human embryonic stem cells from differentiating derivatives. *Biomicrofluidics*, 6(4) :44113, January 2012.

[100] Daynene M. Vykoukal, Peter R. C. Gascoyne, and Jody Vykoukal. Dielectric characterization of complete mononuclear and polymorphonuclear blood cell subpopulations for label-free discrimination. *Integr. Biol.*, 1 :477–484, 2009.

[101] Xujing Wang, Frederick F Becker, and Peter R C Gascoyne. Membrane dielectric changes indicate induced apoptosis in HL-60 cells more sensitively than surface phosphatidylserine expression or DNA fragmentation. *Biochimica et biophysica acta*, 1564(2) :412–20, August 2002.

[102] Zhao Wang, Larry Millet, Mustafa Mir, Huafeng Ding, Sakulsuk Unarunotai, John Rogers, Martha U. Gillette, and Gabriel Popescu. Spatial light interference microscopy (SLIM). *Optics Express*, 19(2) :1016–1026, January 2011.

[103] MM Webber, STA Quader, HK Kleinman, HK Bello-DeOcampo, PD Storto, G Bice, W DeMendonca-Calaca, and DE Williams. Human cell lines as an in vitro/ in vivo model for prostate carcinogenesis and progression. *The Prostate*, 47(1) :1–13, April 2011.

[104] Liqun Wu, Lin-Yue Lanry Yung, and Kian-Meng Lim. Dielectrophoretic capture voltage spectrum for measurement of dielectric properties and separation of cancer cells. *Biomicrofluidics*, 6(1) :14113–1411310, March 2012.

[105] Mathias P. Wymann, Peter Kernen, David A. Deranleau, Beatrice Dewald, Vinzenz von Tscharner, and Marco Baggliolini. Oscillatory motion in human Neutrophils responding to chemotactic stimuli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 147(1) :361–368, 1987.

[106] C Zhang, K Khoshmanesh, a Mitchell, and K Kalantar-Zadeh. Dielectrophoresis for manipulation of micro/nano particles in microfluidic systems. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(1) :401–20, January 2010.

[107] Yang Zhao, Deyong Chen, Yana Luo, Hao Li, Bin Deng, Song-bin Huang, Tzu-Keng Chiu, Min-Hsien Wu, Rong Long, Hao Hu, Xiaoting Zhao, Wentao Yue, Junbo Wang, and Jian Chen. A microfluidic systemn for cell type classification based on cellular size-independent electrical properties. *Lab on a CHip*, 13(12) :2272–2277, 2013.

[108] Min Zhou, Guangjin Xu, Minjie Xie, Xuexin Zhang, Gary P Schools, Liqun Ma, Harold K Kimelberg, and Haijun Chen. TWIK-1 and TREK-1 Are Potassium Channels Contributing Significantly to Astrocyte Passive Conductance in Rat Hippocampal Slices. *The journal of neuroscience*, 29(26), 2009.

[109] Jie Zhuang, Wei Ren, Yu Jing, and J.F. Kolb. Dielectric evolution of mammalian cell membranes after exposure to pulsed electric fields. *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, 19(2) :609–622, April 2012.

[110] Ulrich Zimmermann, U. Friedrich, H. Mussauer, P. Gessner, K. Hamel, and V. Sukhorukov. Electromanipulation of mammalian cells : fundamentals and application. *Plasma Science, IEEE Transactions on*, 28(1) :72–82, Feb 2000.

Caractérisation électrocinétique de cellules humaines

Résumé : La connaissance et la compréhension des propriétés électrocinétiques des cellules apportent de multiples applications en recherche biomédicale, comme le diagnostic et le suivi de l'évolution d'un cancer. L'application de champs électriques alternatifs non-uniformes dans des microsystèmes, et plus particulièrement la force de diélectrophorèse, permet de caractériser des populations de cellules sans marqueur spécifique.
Nous avons tout d'abord mené une étude fondamentale pour décrire la réponse des cellules humaines dans de telles conditions. La compétition entre les forces diélectrophorétique et électrohydrodynamiques (effets électrothermiques, électro-osmose) a été modélisée. La confrontation du modèle à l'observation expérimentale du mouvement de telles cellules dans des canaux microfluidiques comportant des électrodes micro structurées a été effectuée. À partir de cette étude, une nouvelle méthode de détermination de la fréquence de coupure de cellules humaines sur un nombre statistique de cellules représentant une population a été élaborée.
Ensuite, nous avons étudié les fréquences de coupure entre des lignées issues de différents tissus épithéliaux (rein et prostate) ou de cellules circulantes. Il a été démontré que les fréquences de coupure sont statistiquement différentes entre les lignées. Les méthodes développées ont ainsi permis de mesurer les différentes signatures électriques de cellules cancéreuses de prostate à chaque stade d'évolution du cancer.
Enfin, nous nous sommes intéressés à comprendre les mécanismes de polarisation des cellules sous champ électrique alternatif. Nous avons modifié la membrane des cellules chimiquement ou biologiquement pour comprendre l'origine moléculaire de la fréquence de coupure. Il a été mis en évidence que la concentration en protéines et l'activité de certains canaux ioniques augmentent significativement la fréquence de coupure des cellules.
En exploitant les effets de la diélectrophorèse sur les cellules, il devient possible de caractériser finement leurs propriétés diélectriques, et de proposer à plus long terme de nouvelles technologies de détection et de diagnostic.

Mots-clés : caractérisation, cellules, diélectrophorèse, membrane plasmique, propriétés diélectriques.

Electrokinetic characterization of human cells

Abstract : Measuring and understanding cells' electrokinetic properties bring several applications in the biomedical field, like the diagnosis and the monitoring of cancer diseases. The application of alternative non uniform electric fields in microsystems, in particular the dielectrophoretic force, allows a label-free characterization of cell populations.
In this Thesis, a comprehensive study has been established to describe the response of human cells in non-uniform AC fields. We have modeled the competition between dielectrophoresis and electro-hydrodynamical forces (electrothermal effects, AC electro-osmosis). This model was compared to the observation of cell motions in microfluidic channels with structured electrodes. We have established a new method to determine the crossover frequencies of human cells on a statistically relevant number of cells, which represents a population.
Then, the Clausius-Mossotti factor of cell lines has been measured, from different epithelial tissues (kidney, prostate) or circulating cells. We have demonstrated that the crossover frequencies are statistically different between these lines. This method has been used to monitor the different electrical signatures of prostate cancer cells at each grade of cancer.
Finally, we have focused on the polarization process of cells regarding the electric field. We have modified chemically and biologically cell membranes to understand the molecular origin of the crossover frequency. The membrane proteins depletion and the activity of some ion channels significantly increase the cell crossover frequency.
By taking advantage of the dielectrophoretic response of cells, it becomes possible to characterize their dielectric properties and to develop new technologies for cancer detection and diagnosis.

Keywords : Characterization, cells, dielectrophoresis, plasma membrane, dielectric properties.