



HAL
open science

Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules individualisées sous électroporation

Amar Tamra

► **To cite this version:**

Amar Tamra. Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules individualisées sous électroporation. Ingénierie biomédicale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30011 . tel-01499406v2

HAL Id: tel-01499406

<https://theses.hal.science/tel-01499406v2>

Submitted on 20 Feb 2018

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Amar TAMRA

le jeudi 9 mars 2017

Titre :

Spectroscopie diélectrique HyperFréquence de cellules individualisées sous électroporation

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED GEET : Micro et Nanosystèmes

Unité de recherche :

LAAS-CNRS/IPBS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Prof. David DUBUC

Dr. Marie-Pierre ROLS

Jury :

Dr. Satoko YOSHIZAWA

Prof. Philippe RENAUD

Prof. Olivier FRANCAIS

Dr. Katia GRENIER

Prof. David DUBUC

Dr. Marie-Pierre ROLS

Et je vous dis que la vie est en effet obscure sauf là où il y a élan,
Et tout élan est aveugle sauf là où il y a la connaissance,
Et toute connaissance est vaine sauf là où il y a le travail,
Et tout travail est futile sauf là où il y a l'amour.

Gibran Khalil GIBRAN

Remerciements

Le travail de synthèse que nécessite la rédaction d'une thèse est un travail difficile, mais à présent que je me retrouve face à mes remerciements, je me sens toute aussi impuissante....

Ce travail de thèse a été mené au sein du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS (LAAS-CNRS) à Toulouse, dans le groupe Microfluidiques HyperFréquence Fluidique (MH2F), et au sein de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), dans le groupe de Biophysique Cellulaire. J'ai eu l'immense privilège de mener cette thèse sous la co-direction de Prof. David DUBUC et du Dr. Marie-Pierre ROLS.

J'exprime mes sentiments les plus sincères de reconnaissance et de remerciements à David. Je le remercie surtout pour ses qualités humaines, son dévouement, sa disponibilité, son écoute, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance. David, Je voudrais vous dire que j'avais eu beaucoup de chance de travailler avec vous. L'idée de voler de ses propres ailes est un peu effrayante, mais j'ai l'impression d'avoir mûri, d'avoir acquis une certaine confiance grâce à vous. Malgré les obstacles et les défis par lesquels nous sommes passés, vous avez assumé votre engagement dans cette thèse jusqu'au bout, sans vous lasser, sans vous fatiguer. Votre présence et la confiance que vous m'aviez donnée étaient une des raisons qui m'ont poussée à continuer jusqu'au bout malgré tous les moments durs. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de mon profond respect.

Marie Pierre, vous me faites le grand honneur d'avoir accepté de codiriger ce travail et je vous en remercie infiniment. Notre histoire a commencé un peu plus tôt que l'aventure de la thèse ! J'ai eu le privilège de découvrir le monde de la recherche au sein de votre équipe pendant mon stage de Master 2...et quelle belle expérience ! Vous m'avez accueillie dans votre équipe avec chaleur et amitié. Durant ces quatre années, vous m'avez conseillé, aidé et guidé avec beaucoup d'enthousiasme et de rigueur scientifique. Je vous serai toujours reconnaissante pour les moments que vous m'avez consacrés durant ce travail et, surtout, pour votre grande générosité. Veuillez trouver dans ces quelques lignes, le témoignage de mes sincères remerciements, de mon respect et de ma plus profonde gratitude.

Je tiens à remercier Dr. Katia GRENIER, la chef de l'équipe MH2F. C'est vrai qu'officiellement, vous ne faisiez pas partie de mes encadrants de thèse, mais vos conseils, votre disponibilité et vos remarques m'ont été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. De tout cela, je tiens à vous remercier vivement pour la valeur inestimable de vos

encouragements, de votre écoute amicale, de vos conseils très précieux, de votre gentillesse et, surtout, pour la grande confiance que vous m'avez toujours accordée tout au long de la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma sincère reconnaissance, de mon respect et de ma plus profonde gratitude.

Pour avoir accepté de présider le jury, je tiens à remercier Dr. Satoko YOSHIZAWA, et d'avoir porté la plus grandes des attentions à mon travail.

Je remercie particulièrement mes deux rapporteurs de thèse, Prof. Philippe RENAUD, Et Prof Olivier FRANÇAIS qui ont accepté d'évaluer mon travail, pour le temps passé à la lecture de mon manuscrit, leurs jugements et précieux conseils. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements.

Mes remerciements vont également aux personnes ayant participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail, en particulier à l'ensemble des deux équipes avec lesquelles j'ai eu le privilège de travailler!

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe « Biophysique cellulaire » de l'IPBS. L'ambiance stimulante et les échanges d'idées et d'expérience m'ont beaucoup appris. Merci de même pour la bonne humeur ambiante, pour toutes nos pauses et pots conviviaux et un peu trop gourmands ! Une pensée spéciale à Laure...je n'oublierai jamais que c'est grâce à toi que j'ai eu la chance de venir en France pour la première fois, pour mon stage de M2. Flavinus, grand merci à toi ! A chaque fois que j'avais besoin d'une aide, tu te rendais disponible !

Equipe MH2F, petite équipe c'est vrai mais elle était ma petite famille au sein du laboratoire. Mon expérience était magnifique grâce à vous. Je pense notamment à François et à Amoula ! Je ne saurais pas l'expliquer mais vous avez adouci et éclairci la difficulté et l'obscurité de cette période.

Je ne pourrai bien-sûr pas oublier toutes les personnes que j'ai croisées lors de mon passage au LAAS. Vous êtes très nombreux donc j'espère que je n'oublierais personne ! Sabeha, Andrès, Yassine (Kiffe la life !), Yoann, Adem (:p), Dany (professionnellement), Amani, Fadhila, etc. Je vous remercie vivement pour la bonne humeur et l'ambiance chaleureuse que vous avez su créer.

Quant aux amis, que puis-je dire ici pour les remercier ? Mouin, Mahmoud, Ali, Bicho, Mariam et Raghda, vous étiez tous des soutiens d'exception. Vous resterez toujours les témoins des tracas et des joies qui ont parsemés cette période de ma vie. Même si en amitié rien ne se

compte, je vous dois beaucoup. Vous m'avez offert un cadeau inestimable : une deuxième famille.

Waed, Hanine, Zeinab, la distance n'a jamais affaibli notre amitié. Des premiers jours de L1 à l'Université Libanaise à Beirut jusqu'à la fin du rêve ! Ce rêve que nous avons toutes les 4 partagé...et voilà la récompense ! Des titres de Docteur bien mérités. Vous méritez le meilleur de la vie. Je vous serais toujours reconnaissante pour notre amitié.

Mes sentiments les plus chers s'adressent à ma famille et mes parents en particulier, à qui cette thèse de doctorat est dédiée.

Ma famille, que deviendrais-je sans vous ? Je ne serais pas là où j'en suis sans votre soutien. Des encouragements, sans cesse renouvelés, au moment les plus difficiles dans tout mon parcours, vous avez sans relâche cru en moi. Malgré la distance, j'ai toujours senti votre amour et votre présence à mes côtés.

Maman, Papa... vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a cessé de m'encourager et de prier pour moi. Votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour et respect. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes frères...Ahmad, Bob et Abdallah... As long as I have you, nothing in the world could ever hurt me! Je suis l'aînée, c'est vrai... mais je sens toujours votre affection et votre esprit protecteur pour moi.

ثقوى دوماً أن أجلكم خوري زبي، ثلكركم من كل قلبي !

Enfin mais surtout, à mon mari Hussein. Tes sacrifices, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir malgré tous les obstacles rencontrés. Que Dieu bénisse nos chemins pour un long commun serein. Le bonheur avec toi n'est pas une destination mais une trajectoire. Aucun mot n'est assez fort pour te témoigner ma reconnaissance. Grâce à toi, toute ma peine pour conclure ce travail a été particulièrement adoucie.

Résumé

L'électroporation est un procédé physique qui consiste à appliquer des impulsions de champ électrique pour perméabiliser de manière transitoire ou permanente la membrane plasmique. Ce phénomène est d'un grand intérêt dans le domaine clinique ainsi que dans l'industrie en raison de ses diverses applications, notamment l'électrochimiothérapie qui combine les impulsions électriques à l'administration d'une molécule cytotoxique, dans le cadre du traitement des tumeurs. L'analyse de ce phénomène est traditionnellement réalisée à l'aide des méthodes optique et biochimique (microscopie, cytométrie en flux, test biochimique). Elles sont très efficaces mais nécessitent l'utilisation d'une large gamme de fluorochromes et de marqueurs dont la mise en œuvre peut être laborieuse et coûteuse tout en ayant un caractère invasif aux cellules. Durant ces dernières années, le développement de nouveaux outils biophysiques pour l'étude de l'électroporation a pris place, tels que la diélectrophorèse et la spectroscopie d'impédance (basse fréquence). Outre une facilité de mise en œuvre, ces méthodes représentent un intérêt dans l'étude des modifications membranaires de la cellule. De là vient l'intérêt d'opérer au-delà du GHz, dans la gamme des micro-ondes, pour laquelle la membrane cytoplasmique devient transparente et le contenu intracellulaire est exposé. L'extraction de la permittivité relative suite à l'interaction champ électromagnétique/cellules biologiques reflète alors l'état cellulaire. Cette technique, la spectroscopie diélectrique hyperfréquence, se présente comme une méthode pertinente pour analyser les effets de l'électroporation sur la viabilité cellulaire. De plus, elle ne nécessite aucune utilisation des molécules exogènes (non-invasivité) et les mesures sont directement réalisées dans le milieu de culture des cellules. Deux objectifs ont été définis lors de cette thèse dont les travaux se situent à l'interface entre trois domaines scientifiques : la biologie cellulaire, l'électronique hyperfréquence et les micro-technologies. Le premier objectif concerne la transposition de l'électroporation conventionnelle à l'échelle micrométrique, qui a montré une efficacité aussi performante que la première. La deuxième partie du travail concerne l'étude par spectroscopie diélectrique HyperFréquence de cellules soumises à différents traitements électriques (combinés ou non à une molécule cytotoxique). Ces travaux présentent une puissance statistique et montrent une très bonne corrélation ($R^2 > 0.94$) avec des techniques standards utilisées en biologie, ce qui valide 'biologiquement' la méthode d'analyse HF dans le contexte d'électroporation. Ces travaux montrent en outre que la spectroscopie diélectrique hyperfréquence s'avère être une technique puissante, capable de révéler la viabilité cellulaire

suite à un traitement chimique et/ou électrique. Ils ouvrent la voie à l'analyse 'non-invasive' par spectroscopie diélectrique HyperFréquence de cellules électroporées *in-situ*.

Abstract

Electroporation is a physical process that consists in applying electric field pulses to transiently or permanently permeabilize the plasma membrane. This phenomenon is of great interest in the clinical field as well as in the industry because of its various applications, in particular electrochemotherapy which combines electrical pulses with the administration of a cytotoxic molecule in the treatment of tumors. The evaluation of this phenomenon is traditionally carried out using optical and biochemical methods (microscopy, flow cytometry, biochemical test). They are very effective but require the use of a wide range of fluorochromes and markers, which can be laborious and costly to implement, while being invasive to the cells. In recent years, the development of new biophysical tools for the study of electroporation has taken place, such as dielectrophoresis and impedance spectroscopy (low frequency). In addition to the ease of implementation, these methods are of interest in the study of membrane modifications of the cell. Hence the advantage of operating beyond the GHz, in the range of microwaves, for which the cytoplasmic membrane becomes transparent and the intracellular content is exposed. The extraction of the relative permittivity as a result of the electromagnetic field / biological cell interaction then reflects the cell state. This technique, microwave dielectric spectroscopy, is a relevant method for analyzing the effects of electroporation on cell viability. Moreover, it does not require any use of the exogenous molecules (non-invasive) and the measurements are directly carried out in the culture medium of the cells. Two objectives were defined during this thesis whose work is located at the interface between three scientific fields: cellular biology, microwave electronics and micro-technologies. The first objective concerns the transposition of conventional electroporation to the micrometric scale, which has shown an efficiency as efficient as the first. The second part of the work concerns the study by HighFrequency dielectric spectroscopy of cells subjected to different electrical treatments (combined or not with a cytotoxic molecule). This work presents a statistical power and shows a very good correlation ($R^2 > 0.94$) with standard techniques used in biology, which biologically validates the HF analysis method in the context of electroporation. This work also shows that microwave dielectric spectroscopy proves to be a powerful technique capable of revealing cell viability following chemical and / or electrical treatment. They open the way to 'non-invasive' analysis by hyper-frequency dielectric spectroscopy of electroporated cells *in situ*.

Table des matières

Introduction générale.....	15
Chapitre I : Introduction et Motivations de ce travail	19
I. Introduction	19
II. La membrane cellulaire	20
II.1 La membrane cellulaire : le modèle de la mosaïque fluide.....	21
II.1.1 Structure et composition	21
II.1.2 Fonctions de la membrane plasmique	25
III. Electroporation : bases et mécanismes	26
III.1 Effet du potentiel membranaire.....	26
III.2 Influence des paramètres électriques	29
III.3 Description du phénomène.....	31
III.4 Modèles d'étude	33
III.5 Applications de l'électroporation.....	34
III.5.1 Industrie Agroalimentaire.....	35
III.5.2 Applications biomédicales.....	36
III.6 Conclusion	40
IV. Lab-on-chip	40
IV.1 Avantages par rapport aux technologies classiques.....	42
IV.2 Applications des Lab-on-chip	43
IV.2.1 Applications en biologie moléculaire	43
IV.2.2 Applications en protéomique.....	45
IV.2.3 Applications en chimie	46
IV.2.4 Applications en biologie cellulaire	47
IV.3 Intégration des systèmes d'analyse on-chip.....	48
V. La spectroscopie diélectrique HyperFréquence.....	50
V.1 Historique.....	50
V.2 Polarisation des matériaux et propriétés diélectriques : Notions fondamentales... 51	
V.2.1 Les différents phénomènes de polarisation	52
V.2.2 Le phénomène de relaxation diélectrique	54
V.2.3 Conduction ionique.....	56
V.2.4 Modèle électrique d'une cellule	56

V.3	Spectroscopie diélectrique	57
VI.	Conclusions et objectifs du travail.....	59
VII.	Références du Chapitre I	61
Chapitre II : Développement de l'Electroporation « On-Chip ».....		69
I.	Introduction	69
II.	L'électroporation « on-chip ».....	69
III.	Matériels et méthodes	78
III.1	Culture cellulaire.....	78
III.2	Electroporation classique macrométrique	78
III.3	Détermination de la perméabilité.....	79
III.4	Détermination de la viabilité.....	80
III.4.1	Test de clonogénicité	80
III.4.2	Test de comptage cellulaire	80
IV.	Microcomposant électro-microfluidique	81
V.	Résultats expérimentaux.....	86
V.1	Perméabilisation cellulaire par électroporation "conventionnelle"	86
V.1.1	Perméabilité membranaire	86
V.1.2	Test de viabilité	88
V.2	Perméabilisation cellulaire par électroporation "on-chip"	93
V.2.1	Cartographie de la distribution du champ électrique.....	94
V.2.2	Visualisation de la perméabilisation par suivi de fluorescence	95
V.2.3	Evaluation de l'effet de l'électroporation « on-chip » sur la viabilité cellulaire	98
VI.	Conclusion.....	100
VII.	Références du Chapitre II.....	103
Chapitre III : Spectroscopie Diélectrique HyperFréquence de Cellules Individualisées sous Electroporation		107
I.	Introduction	107
II.	Analyse post-électroporation « on chip »	108
II.1	La diélectrophorèse	109
II.2	La spectroscopie d'impédance	111
II.3	La Spectroscopie Diélectrique Haute Fréquence	115
III.	Analyse hyperfréquence de cellules uniques.....	116
III.1	Détection capacitive HF	117

III.2	Les avantages de l'étude de cellule unique.....	119
III.3	Microfabrication du composant hyperfréquence pour une cellule unique.....	120
III.4	Matériels et méthodes	122
III.4.1	Dispositif expérimental.....	122
III.4.2	Matériels biologiques utilisés	125
IV.	Résultats expérimentaux.....	126
IV.1	Protocoles et conditions de mesure.....	126
IV.2	SDHF d'une cellule unique.....	127
IV.2.1	Détection et analyse d'une cellule unique	127
IV.2.2	Analyse par SDHF de la perméabilisation par la saponine	130
IV.3	Analyse par SDHF de la réponse cellulaire au champ électrique	134
IV.3.1	Analyse biologique de la perméabilisation et la viabilité cellulaire.....	134
IV.3.2	Analyse par SDHF de la perméabilité et de la viabilité cellulaire.....	140
IV.3.2.1	Analyse par SDHF de l'effet de l'intensité du champ électrique	141
IV.3.2.2	Suivi temporel par SDHF de l'effet de l'électroporation	146
IV.4	Analyse par SDHF des THP1 sous électrochimiothérapie	148
IV.4.1	Analyse par SDHF de l'effet de la bléomycine couplée à l'électroporation.....	152
IV.5	Conclusion.....	154
V.	Conclusion.....	155
VI.	Références du Chapitre III.....	157
	Conclusion générale et perspectives	161
	Production Scientifique.....	163

Introduction générale

Depuis les années 80, l'utilisation du champ électrique dans le domaine biologique et médical revêt des intérêts thérapeutiques de toute importance en présentant des caractéristiques innovantes et prometteuses. Il est notamment de plus en plus développé/utilisé dans le domaine de l'électroporation cellulaire, qui se traduit par l'application d'impulsions de champ électrique aux cellules ou tissus afin d'induire un changement dans les propriétés de la membrane plasmique, qui devient temporairement perméable à certaines molécules d'intérêt. Cette approche conduit au développement de nouvelles méthodes de recherche telles que l'électrochimiothérapie (transfert de molécules cytotoxiques), l'électrogénothérapie (transfert des molécules d'ADN ou d'ARN), l'électroporation irréversible (ablation de tumeurs ou éradication de microorganismes). L'analyse des effets qui résultent de ces phénomènes est souvent faite avec des méthodes optiques ou biochimiques. Les méthodes optiques ont fait l'objet d'intenses recherches et sont effectivement des outils puissants pour la biologie. Néanmoins, elles présentent un certain nombre d'inconvénients, tel l'utilisation d'une large gamme de fluorochromes et de marqueurs dont la mise en œuvre est laborieuse et coûteuse. De plus, elles présentent un caractère invasif, du fait que les cellules sont altérées après leur caractérisation par ces méthodes.

Avec le développement de la microélectronique et des microtechnologies, nous assistons à une tendance mondiale de transposer les méthodes d'analyse à l'échelle micrométrique, ce qui permet de réduire le temps et les coûts des opérations, tout en intégrant de nombreuses opérations massivement parallélisables. De plus, un retour à l'échelle d'une cellule unique semble être crucial pour la compréhension de nombreux phénomènes biologiques qui peuvent être masqués par moyennage sur une population cellulaire. De là vient l'intérêt de développer de nouveaux systèmes micrométriques dédiés à la cellule unique. Cette solution technologique permet ainsi une fusion des avantages précédemment évoqués (réduction du temps et des coûts des opérations, parallélisation, analyse de cellule individuelle) mais aussi ouvre une immense opportunité : intégrer des méthodes d'analyse électrique dédiées à la biologie et qui ne nécessitent pas l'utilisation de marqueurs spécifiques qui risque d'altérer la réponse cellulaire et biaiser les résultats.

C'est pour cela que nous trouvons dans la littérature des systèmes micrométriques innovants conçus pour l'analyse électrique des cellules soumises à l'électroporation. La plupart de ces travaux reposent sur l'utilisation de la diélectrophorèse DEP ou sur l'utilisation des ondes

électromagnétiques à basse fréquence (spectroscopie d'impédance). Ces outils sont en effet très performants dans la révélation des effets induits au niveau de la membrane cellulaire. Mais que se passe-t-il au-delà de la membrane ? Pour répondre à cette question, il est indispensable de sonder le contenu intracellulaire, d'où l'intérêt des hyperfréquences (quelques GHz). Dans cette gamme de fréquences, la membrane devient transparente pour les ondes électromagnétiques, qui pénètrent donc dans la cellule et interagissent avec le contenu intracellulaire. Cette technique d'analyse s'appelle la spectroscopie diélectrique hyperfréquence et se présente comme une méthode pertinente, et complémentaire aux autres techniques, pour analyser les cellules biologiques.

Dans le cadre de cette thèse qui se situe à l'interface des trois domaines (biologie cellulaire, électronique hyperfréquence et microtechnologie), nous présentons la mise au point d'une méthode analytique attractive, compétitive et adaptée à l'étude des effets de l'électroporation sur des cellules individualisées, pour laquelle l'analyse ne nécessite pas de marquage, ni de contact avec les cellules et se fait dans le milieu de culture liquide : la spectroscopie diélectrique hyperfréquence. L'objectif principal est donc de montrer l'intérêt que présente la technique d'analyse diélectrique dans le domaine fréquentiel du gigaHertz pour étudier des cellules biologiques soumises à l'électroporation.

Ces travaux de thèse représentent le fruit d'une co-direction entre deux équipes appartenant à deux laboratoires aux domaines scientifiques différents. La première équipe d'accueil est l'équipe Micro et nanosystèmes HyperFréquences Fluidiques (MH2F) au sein du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes de Toulouse (LAAS-CNRS), au sein de laquelle ont été réalisées la conception et la microfabrication de nos microdispositifs, ainsi que la caractérisation hyperfréquence de divers échantillons biologiques. La deuxième équipe d'accueil est l'équipe de Biophysique cellulaire au sein de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de Toulouse (IPBS), dans laquelle une étape incontournable de caractérisation et « calibration » des cellules, ainsi qu'une mise au point de protocoles correspondants à l'électroporation, ont été effectuées.

Ce manuscrit de thèse est divisé en trois parties :

- Le premier chapitre représente une introduction générale des différents principes utilisés au cours de cette thèse. Une explication approfondie de l'électroporation, des « Lab-on-chip », ainsi que de la spectroscopie diélectrique hyperfréquence est faite.

- Le deuxième chapitre traite du principe de l'électroporation « on-chip ». Pour cela, une revue des microsystèmes dédiés à l'électroporation à l'échelle micrométrique est réalisée en premier lieu. Cela est suivi de la présentation de notre microcomposant dédié à l'électroporation on-chip ainsi que des résultats obtenus.
- Le troisième et dernier chapitre est consacré à la partie d'analyse par spectroscopie diélectrique hyperfréquence des effets de l'électroporation on-chip. Ce chapitre présente les matériels et méthodes mis en œuvre, les différents résultats de spectroscopie HF pour 7 tests biologiques distincts suivant 3 plans d'expériences, ainsi que les méthodes de « contre-mesures » biologiques qui vont corréliser nos résultats hyperfréquences.

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse vont ainsi démontrer que la spectroscopie diélectrique associée à la microfluidique est une technique fiable et puissante, pouvant enrichir notre vision des cellules biologiques sous traitement.

Chapitre I : Introduction et Motivations de ce travail

I. Introduction

Le travail présenté dans ce manuscrit concerne l'étude des cellules soumises à un traitement électrique (électroporation), associé ou non à l'administration d'une molécule cytotoxique, par une nouvelle méthode d'analyse : la spectroscopie diélectrique hyperfréquence. Il a été mené au travers d'une collaboration entre l'équipe de Biophysique cellulaire de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, qui étudie les mécanismes de vectorisation de molécules dans les cellules par la technique d'électroporation et l'équipe Micro et nanosystèmes HyperFréquences Fluidiques du LAAS-CNRS, qui développe des microsystèmes d'analyse hyperfréquence. Notre projet est donc à mi-chemin entre biologie, les microtechnologies et l'électronique et met en commun des connaissances de ces différents domaines afin de mettre au point de nouveaux outils utilisables en biologie cellulaire.

Afin de délimiter les contours du contexte de la thèse, nous découperons ce premier chapitre en trois parties, qui sont à l'image des disciplines à faire converger pour construire ce travail de thèse.

Avant de nous lancer dans l'explication du phénomène de l'électroporation, il est indispensable de comprendre les motivations d'utilisation de cette technique. Nous décrirons donc, dans la première partie, la membrane plasmique avec ses différents constituants et fonctions, ainsi que le principe de l'électroporation et les différentes applications qui en résultent.

Des études à l'échelle de la cellule unique peuvent contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents des différents phénomènes. La seconde partie de ce chapitre sera donc dédiée à une revue des récentes applications des microtechnologies aux domaines biologique et médical et de l'intérêt que peuvent présenter les études à l'échelle micrométrique, connu aussi sous le nom du « Lab-on-chip ».

La troisième et dernière partie de ce chapitre concerne la spectroscopie diélectrique hyperfréquence : nous nous intéresserons donc aux principes d'interactions entre la matière biologique et les ondes électromagnétiques en fonction de la fréquence.

II. La membrane cellulaire

Jusqu'à l'émergence de la microscopie électronique au début des années 1950, la membrane cellulaire n'a été que rarement mentionnée dans la littérature scientifique. Ni son organisation, ni sa composition n'étaient connues. Afin de mieux comprendre le concept d'une cellule et de sa membrane, les chercheurs ont utilisé des méthodes indirectes pour aider à créer l'image de cette membrane avant même de la visualiser. Leurs travaux ont permis d'établir le modèle actuel de la membrane cellulaire.

A la fin du 19^{ème} siècle, Charles Ernest Overton (1885) étudie les propriétés osmotiques de la cellule et conclut que la membrane autour de la cellule a les propriétés de l'huile : elle contient des phospholipides qui régulent la perméabilité de la membrane [1]. En 1925, Gorter et Grendel étudient la surface d'une monocouche de lipides extraite d'un nombre connu de globules rouges. Ils en concluent que la membrane cellulaire est une bicouche lipidique composée de 2 couches de phospholipides, molécules formées de têtes hydrophiles et de queues hydrophobes. Cependant, le modèle proposé par Gorter et Grendel, bien que correct, n'était pas suffisant pour répondre aux questions de perméabilité, de tension de surface et de résistance électrique des membranes. Pour cela, Davson et Danielli proposent dix ans plus tard (1935), la présence d'une couche de protéines associée à la bicouche lipidique. Dans les années 1950, Robertson confirme la présence de la membrane plasmique sous la forme proposée par Davson et Danielli grâce à la microscopie électronique. Néanmoins, ce n'est qu'en 1972 que Singer et Nicholson développent de nouvelles idées concernant la structure de la membrane cellulaire moderne: le modèle de la mosaïque fluide. Ce modèle prédit que les protéines sont incorporées dans la bicouche lipidique et que les composantes de cette dernière (phospholipides et protéines) présentent une libre diffusion rotationnelle et latérale dans le plan de la membrane, ce qui résulte en leur distribution aléatoire et hétérogène. Or, un grand nombre de travaux suggère que le mouvement de la plupart des protéines de la membrane plasmique est partiellement limité à l'échelle nanométrique ; cette hétérogénéité latérale dans l'organisation de la membrane est le résultat des interactions protéine-protéine, protéine-lipide et lipide-lipide. Cette interaction est à la base d'une compartimentation fonctionnelle de la membrane plasmique : des groupes spécifiques, appelés micro-domaines, se forment dans la membrane. Ces derniers facilitent des

processus cellulaires, tels que la signalisation, l'adhésion et le trafic membranaire. Une variété de micro-domaines peut se former : des micro-domaines de courte durée de vie se formant à partir de quelques protéines et lipides, ou des micro-domaines stables et bien organisés, de diamètre allant de quelques dizaines jusqu'à quelques centaines de nanomètres.

II.1 La membrane cellulaire : le modèle de la mosaïque fluide

Tous les types de cellules, procaryotes ou eucaryotes, animales ou végétales, sont délimités par une membrane cellulaire cytoplasmique qui s'avère être indispensable à la vie, en raison de sa capacité à séparer le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire, assurant ainsi l'intégrité cellulaire. Bien que la présence d'une membrane cellulaire soit commune à tous les types cellulaires, il existe certaines différences: contrairement à la cellule animale, la cellule végétale et la cellule bactérienne présentent une paroi cellulaire rigide associée à la membrane plasmique.

II.1.1 Structure et composition

L'étude par microscopie électronique d'une coupe membranaire révèle la structure en bicouche continue de phospholipides agencés en tête-bêche de la membrane cytoplasmique (7-8 nm d'épaisseur). Chaque lipide est constitué de deux chaînes hydrogencarbonées hydrophobes (queue) et d'une tête hydrophile : ce qui donne à la membrane la propriété d'être amphipathique, conduisant ainsi à l'assemblage en bicouche. La composition fondamentale de la membrane plasmique associe la bicouche lipidique à deux catégories de molécules : les lipides et les protéines. Les phospholipides sont amphiphiles : ils ont une partie polaire attirés par l'eau (hydrophile) et un composant apolaire repoussé par l'eau (hydrophobe). Quand ils sont dilués dans l'eau, les molécules amphiphiles adoptent spontanément la structure moléculaire la plus stable thermodynamiquement. Dans les conditions biologiques, les phospholipides forment une double couche dans laquelle les queues hydrophobes se font face dans le cœur de la structure, tandis que les têtes hydrophiles interagissent avec l'eau environnante (Figure 1).

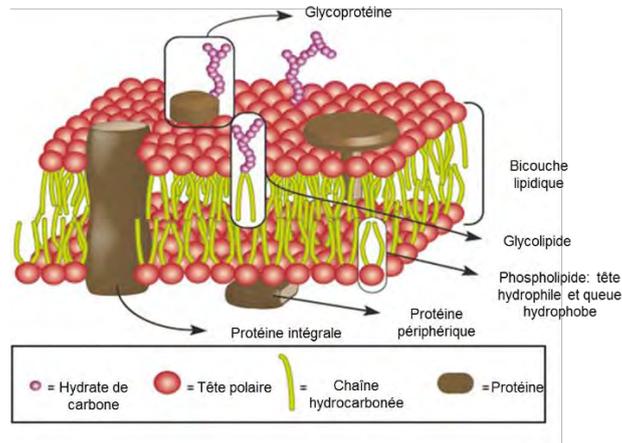


Figure 1: Modèle de la mosaïque fluide de la membrane cellulaire. Vue schématique de la structure de la membrane cellulaire [2].

Les membranes plasmiques des cellules animales contiennent quatre types de phospholipides majeurs (les phosphatidylcholines PC, les phosphatidylethanolamines PE, les phosphatidylsérines PS et les sphingomyélines). Ces phospholipides sont distribués d’une manière asymétrique entre les deux feuillets externe et interne de la bicouche membranaire (Figure 2) [3].

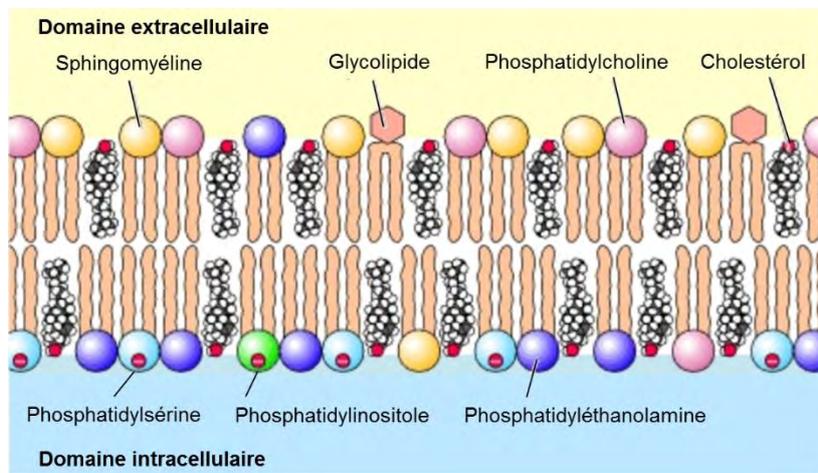


Figure 2: Composants lipidiques de la membrane plasmique, répartis sur les deux feuillets [3].

Le feuillet externe de la membrane plasmique est principalement constitué de la phosphatidylcholine et de la sphingomyéline, alors que le feuillet interne est constitué majoritairement de la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine. Un cinquième type de phospholipide, le phosphatidylinositol, y est également localisé. De plus, la membrane cellulaire des cellules animales contient des glycolipides (chaînes d’hydrate de carbone liées à des lipides) et du cholestérol. Les premiers se trouvent exclusivement sur le feuillet externe de

la membrane avec la partie carbohydratée exposée à la surface cellulaire. Ils ne constituent que 2% de la totalité des lipides de la membrane plasmique et forment une couche de protection hydrophile du côté extracellulaire de la membrane. Quant au cholestérol, il est un composant majeur de la membrane des cellules animales présent dans les deux feuillettes. Cette distribution asymétrique caractérise une cellule saine. L'externalisation des PS constitue entre autres un signal précoce d'apoptose, c'est à dire d'un certain type de mort cellulaire [3].

Bien que les lipides soient les éléments structurels fondamentaux des membranes, les protéines sont responsables de l'exécution des rôles bien spécifiques au sein de la membrane : récepteurs, transporteurs, messagers intracellulaires, catalyse enzymatique, adhérence cellulaire, etc. La plupart des membranes cytoplasmiques se composent d'environ 50% de lipides et 50% de protéines en poids. Etant donné que les protéines sont beaucoup plus grandes que les lipides, ce pourcentage correspond à environ une molécule de protéine par toutes les 50 à 100 molécules de lipide. Selon le modèle de Singer et Nicholson, les protéines sont ancrées de différentes manières dans la bicouche lipidique fluide. On distingue alors trois classes de protéines :

- a) Les protéines extrinsèques ou périphériques : ces protéines sont localisées en dehors de la membrane. Elles sont indirectement associées à la membrane par le biais de liaisons électrostatiques de type hydrogène ou d'interactions protéine-protéine. Elles sont soit entièrement intracellulaires soit entièrement extracellulaires.
- b) Les protéines intrinsèques ou intégrales : ce sont des protéines qui interagissent fortement avec la membrane. On en distingue deux classes: des protéines ancrées dans des acides gras et des protéines transmembranaires.
 - Les protéines ancrées dans des acides gras : elles peuvent être ancrées sur les glyco-phosphatidyl-inositol (GPI) et sont donc présentes sur la face extracellulaire de la membrane. D'autre part, si elles sont ancrées à la membrane par l'intermédiaire d'acide gras, elles seront présentes sur la face intracellulaire de la membrane.
 - Les protéines transmembranaires : ces protéines traversent les deux feuillettes de la membrane et sont liées d'une manière stable à la membrane avec sa partie interne hydrophobe.

Des interactions se forment entre les différents protéines et lipides de la membrane plasmique, ce qui résulte en la création de ce qu'on appelle les micro-domaines [4],[5],[6]. Les micro-domaines riches en cholestérol, les radeaux lipidiques (lipid rafts) et les cavéoles (caveolae),

sont particulièrement intéressants, vu leur implication dans plusieurs processus cellulaires (Figure 3).

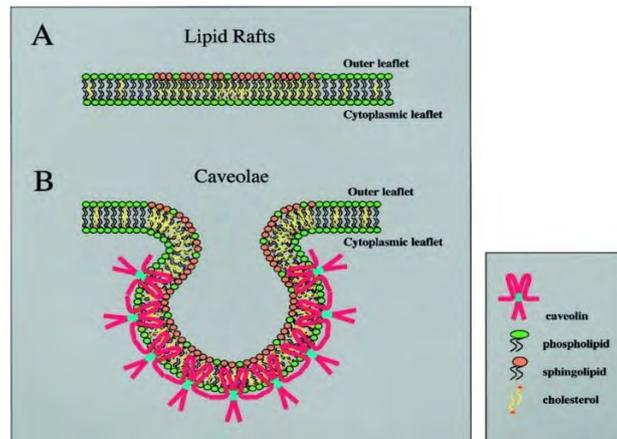


Figure 3 : Organisation détaillée des radeaux lipidiques et des cavéoles de la membrane plasmique. (A) radeau lipidique enrichi en cholestérol (jaune) et sphingolipides (orange). (B) cavéole: la présence de la protéine cavéoline (rouge), induit de petites invaginations de la membrane plasmique [7].

En 1997, Simons et Ikonen émettent l'hypothèse de la présence de structures appelées radeaux lipidiques, responsables de l'hétérogénéité latérale de la membrane plasmique [4]. Ces ensembles dynamiques de protéines et de lipides flottent dans la bicouche membranaire, mais peuvent également se regrouper pour former de larges structures bien organisées. Ils sont composés de molécules de cholestérol et de sphingolipides du feuillet externe connectées au cholestérol et phospholipides du feuillet interne de la membrane plasmique. Ces structures sont fluides mais plus organisées et compactées que le reste de la membrane. Ils ont reçu une attention croissante en tant que structures qui régulent la fonction de la membrane dans les cellules eucaryotes [8]. Ils interviennent dans des processus cellulaires tel que l'assemblage des molécules de signalisation, le trafic membranaire, la neurotransmission et le trafic des récepteurs [9], [10].

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane cellulaire, de 50-70 nm de diamètre, et ont été identifiées pour la première fois en 1955 par la microscopie électronique [11]. Elles présentent une composition biochimique similaire à celle des radeaux lipidiques (glycosphingolipides et cholestérol), d'où leur classement comme étant un sous-type des radeaux. Néanmoins, la présence d'une protéine, la cavéoline, est une caractéristique déterminante [12], [13]. Récemment, un autre type de protéines, les cavines cytoplasmiques, semblent avoir un rôle critique dans le maintien de la structure et la fonction des cavéoles [14].

Leur abondance relative dépend du type cellulaire; elles sont absentes dans les lymphocytes et la plupart des neurones, alors qu'elles représentent jusqu'à 35% de la surface cellulaire des adipocytes, des cellules endothéliales et musculaires [15].

Bien que la membrane cellulaire présente un rôle fondamental dans l'intégrité de la cellule, il existe une autre composante indispensable à la vie de la cellule. C'est un réseau complexe et dynamique de filaments protéiques régulatrices s'étendant sur tout le cytoplasme, appelé cytosquelette [16]. Il permet à la cellule de s'adapter et de répondre à une grande variété de stimulus intra et extracellulaire, de maintenir la morphologie cellulaire, d'effectuer des mouvements coordonnés et de contrôler le trafic intracellulaire [17]. Les composants du cytosquelette sont les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (Figure 4). Chacun d'eux est formé d'un type différent de protéines, avec des diamètres, des longueurs et des niveaux de flexibilité spécifiques.

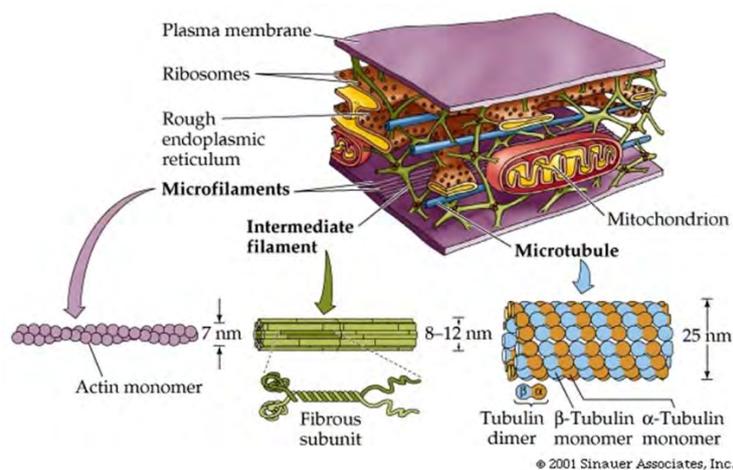


Figure 4 : Organisation du cytosquelette de la cellule, avec les 3 types de composants: les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules [18].

II.1.2 Fonctions de la membrane plasmique

Le rôle essentiel de la membrane cytoplasmique est de délimiter la cellule et de conserver son intégrité. Elle permet également la reconnaissance cellulaire spécifique et transmet des informations de l'environnement cellulaire vers l'intérieur de la cellule. Aussi, la membrane contrôle les échanges moléculaires et particulaires entre la cellule et le milieu environnant : une cellule a besoin de nutriments pour se développer, se diviser, se mouvoir, et elle doit également évacuer les déchets de son métabolisme. Il existe des molécules qui traversent passivement la membrane vu leurs propriétés biochimiques, tel que l'eau, l'urée, l'oxygène et le dioxyde de carbone. D'autres molécules ont besoin de canaux et de pompes protéiques placés dans la

membrane. C'est cette propriété de perméabilité sélective qui permet l'entrée contrôlée de certaines molécules et s'oppose au transfert d'autres molécules.

III. Electroporation : bases et mécanismes

L'interaction entre le champ électrique et le vivant est étudiée depuis des siècles. Néanmoins la première fois où le terme électroporation est apparu fût en 1958 dans une étude sur les cellules excitables. Stampfli a reporté l'effet des impulsions de champ électrique sur les nœuds de Ranvier [19]. En 1967, des espèces de bactéries sous forme végétative et des levures non-excitables étaient tuées avec l'application du champ électrique intense [20]. Des expériences avec des bicouches lipidiques planaires [21] et des vésicules lipidiques [22] ont été réalisées en 1979 et 1981, respectivement. Il a été observé aussi que l'application du champ électrique pulsé induit un changement dans la structure de la membrane cellulaire en créant un chemin préférentiel pour les petites particules [23]–[25]. Au début des études, seule la perméabilisation irréversible IRE a été induite (la membrane cellulaire est endommagée d'une manière non réversible), mais quelques années plus tard, il a été démontré que la modification de la structure de la membrane cellulaire peut l'être d'une manière réversible. Ce phénomène permet à certaines molécules, malgré leur nature hydrophile ou à leur taille importante, de traverser la membrane. Dans certaines conditions, telles que l'application contrôlée d'un champ électrique pulsé, l'intégrité de la membrane est perturbée temporairement et le réarrangement de ses composants conduit à un changement dans la structure membranaire ce qui augmente le transport de molécules à travers la membrane normalement imperméable (Figure 5).

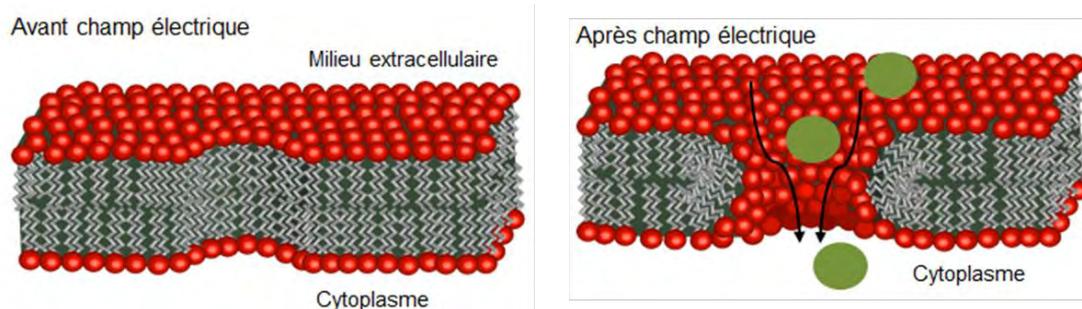


Figure 5: Les changements dans la structure et l'organisation de la bicouche de phospholipides de la membrane cellulaire avant et après application d'un champ électrique pulsé.

III.1 Effet du potentiel membranaire

Le gradient de concentration d'ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Tableau 1) est à l'origine du potentiel de repos ($\Delta\Psi_0$):

Tableau 1 : Distribution ionique dans les compartiments intracellulaire et extracellulaire pour une cellule humaine.

Concentration ionique [mM]	K⁺	Na⁺	Mg⁺⁺	Ca⁺⁺	Cl⁻	HCO₃⁻
Intracellulaire	160	7-12	5	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	4-7	8
Extracellulaire	4	144	1-2	2	120	26-28

L'équation de Nernst établit le potentiel à travers la membrane cellulaire en se basant sur le gradient de concentration de chaque ion; elle détermine le potentiel de membrane E d'équilibre à laquelle chaque espèce ionique x est en équilibre:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}$$

où R est la constante universelle des gaz et est égal à 8,314 JK⁻¹ mol⁻¹, T est la température en degrés Kelvin, z est la valence de l'espèce ionique, F est la constante de Faraday égale à 96,485 C mol⁻¹, [X]_o est la concentration de l'espèce ionique dans le milieu extracellulaire et [X]_i sa concentration intracellulaire.

Le potentiel de repos ΔΨ₀ varie d'une cellule à l'autre et est une caractéristique intrinsèque de l'échantillon, par exemple pour les neurones sa valeur typique est -70mV, pour la cellule de muscle squelettique, il est -90mV et pour les cellules épithéliales sa valeur est d'environ -50mV. Lorsqu'on applique un champ électrique pulsé à des cellules vivantes, une accumulation de charges de signes opposés se produit sur les deux côtés de la membrane plasmique provoquant la création d'une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane. Ce potentiel est appelé potentiel transmembranaire induit (ΔΨ_i) [26]

$$\Delta\Psi_i = f \cdot E \cdot R \cdot \cos(\theta) \cdot [1 - e^{-t/\tau m}] \quad (1)$$

où f dépend des propriétés diélectriques et géométriques de la cellule, R est le rayon de la cellule, θ est l'angle entre le point où le ΔΨ est calculé et le champ électrique appliqué (Figure 6) et τm est le temps de charge de la membrane qui dépend de la conductivité de la membrane (σ_{mem}), du cytoplasme (σ_{cyt}) et du milieu environnant externe (σ_m) et de la permittivité (ε_{mem}) et l'épaisseur (e) de la membrane.

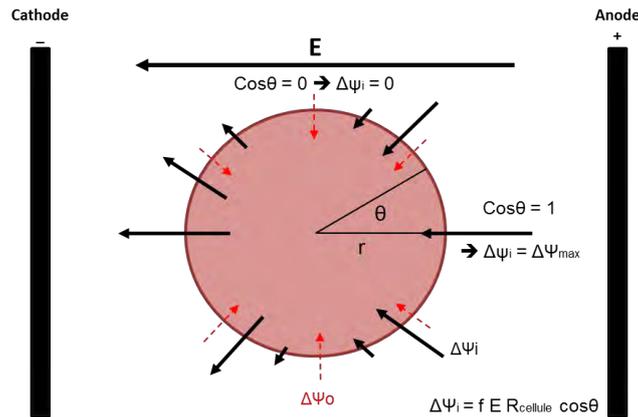


Figure 6: Champ électrique appliqué sur une cellule de rayon r . Les flèches en rouge représentent le potentiel transmembranaire de repos ($\Delta\Psi_0$) et les flèches noires le potentiel transmembranaire induit ($\Delta\Psi_i$) [27].

Dans le cas de cellules sphériques des cellules et pour des durées supérieures à la μs , l'équation se simplifie (équation de Schwan) [28], [29]:

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

Le potentiel transmembranaire s'ajoute au potentiel natif et une fois que la différence de potentiel transmembranaire dépasse une certaine valeur critique, appelée seuil de perméabilisation et estimée à environ 200mV pour la plupart des types cellulaires [30], la perméabilisation a lieu.

$$|\Delta\Psi_i + \Delta\Psi_o| \geq 200 \text{ mV} \quad (3)$$

Etant donné que la valeur seuil est la même pour la plupart des cellules, de l'ordre de -200 mV [30], cela signifie que la perméabilisation dépend d'une valeur seuil de l'intensité du champ électrique 'Ep', qui dépend des facteurs de forme et de taille de la cellule. D'après l'équation (1), plus la cellule est petite, plus le champ appliqué doit être élevé pour perméabiliser cette cellule, ce qui explique pourquoi le seuil de perméabilisation est plus bas pour des cellules adhérentes, plus grosses, que pour des cellules en suspension [31].

L'effet est dépendant de l'intensité du champ électrique, de la durée de l'impulsion, de l'endroit où l'on se trouve sur la membrane. Lors de l'application des impulsions électriques, les charges se réorganisent de part et d'autre de la membrane, ce qui provoque une hyperpolarisation du côté de l'anode et une dépolarisation du côté de la cathode participant ainsi au phénomène de la perméabilisation [Figure 7] [32].

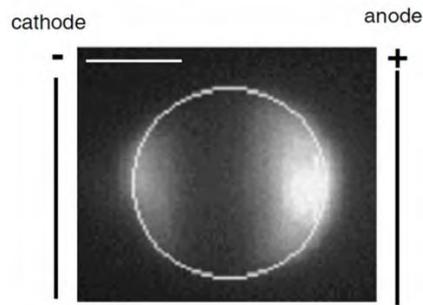


Figure 7: Localisation de la perméabilisation face aux électrodes détectée par l'entrée d'iodure de propidium (PI) dans une cellule après 10 impulsions de 5 ms, 1 Hz, 700 V/cm. Barre d'échelle : 10 µm [32].

Effet Joule

Lorsque le champ électrique pulsé est appliqué, un courant électrique est généré par les électrodes et circule à travers le milieu. Ce courant est à l'origine de l'effet Joule qui conduit à une augmentation de la température dans l'échantillon, qui doit être prise en compte et limitée pour préserver la viabilité cellulaire. Dans le cas des expérimentations *in vitro*, cette augmentation de la température peut être contrôlée ou limitée en utilisant une solution tampon à faible conductivité [33]. En outre, en considérant que l'augmentation de la température est en relation linéaire avec la durée de l'impulsion comme représenté par l'équation suivante, l'application des impulsions plus courtes est un moyen pour minimiser les effets délétères de la chaleur [33]:

$$\Delta T = \frac{\sigma_m E^2}{\rho C_p} t$$

où σ_m représente la conductivité du milieu, ρ représente la masse volumique, C_p est la chaleur spécifique et t est la durée de l'impulsion.

III.2 Influence des paramètres électriques

L'électroporation est influencée par plusieurs paramètres qui doivent être étudiés et optimisés afin de mieux comprendre ce phénomène. Ce sont les paramètres électriques [34], chimiques (composition du milieu de pulsation), et cellulaires (type et caractéristique de la cellule). Les paramètres électriques seront étudiés dans cette partie.

La valeur des paramètres électriques contrôle le phénomène de l'électroporation. Ces paramètres incluent l'intensité du champ électrique E , la durée T , la fréquence f et le nombre N des impulsions électriques (Figure 8).

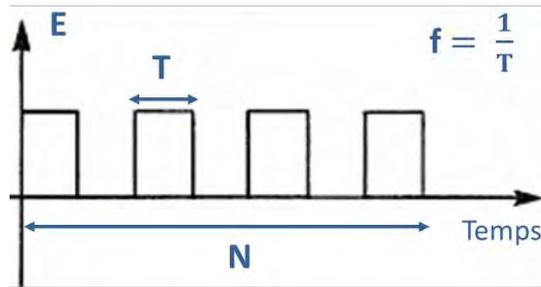


Figure 8 : Impulsions électriques avec les différents paramètres influençant l'électroporation, E : champ électrique, T : durée des impulsions, f : fréquence des impulsions, N : nombre d'impulsions.

L'intensité du champ électrique E joue un rôle important dans l'efficacité de l'électroporation. En effet, lorsque le champ appliqué E dépasse la valeur seuil du champ requis E_p ($E > E_p$), le potentiel transmembranaire atteint une valeur seuil de 0.2-1 V et donc l'électroporation a lieu [30]. Au-dessous de cette valeur, la membrane n'est pas altérée.

La durée des impulsions T électriques peut être modulée en fonction de l'application visée. Par exemple, lors de l'application d'un champ modéré pendant une longue durée, une migration électrophorétique des acides nucléiques est engendrée ; cela représente une étape clé du phénomène d'électrotransfection des cellules [35], [36]. Alors que l'application des champs plus importants couplés à de courtes durées d'impulsions peut être utilisée pour différentes applications. Avec des champs suffisamment intenses ($E > E_p$), une perméabilisation réversible des membranes, couplée à l'administration de molécules chimiothérapeutiques, a lieu (on parle donc de l'ECT). L'utilisation des champs très intenses ($E \gg E_p$) à courtes durées induit une rupture membranaire irréversible (IRE) [31], [34].

D'autres paramètres utilisés au cours de l'électroporation contrôlent ses effets : le nombre d'impulsions N et la fréquence des impulsions f [37], [38]. Le nombre d'impulsions appliquées affecte l'efficacité de la perméabilisation et la durée de vie de l'état perméable. Plus le nombre d'impulsions est élevé, plus le nombre de molécules transférées augmente et la durée de vie des « pores » est longue.

La fréquence de répétition des impulsions n'améliore pas le taux de perméabilisation mais le principal avantage de l'augmentation de la fréquence est la diminution de la contraction musculaire pendant les tests *in vivo*. De plus, elle est importante car le temps entre les impulsions peut diminuer l'échauffement de l'échantillon par effet Joule. Une fréquence de 1 ou 2 Hz est utilisée *in vitro*.

Par ailleurs, le choix des paramètres à utiliser dépendra du type d'application envisagé comme le montrent le Tableau 2 et la Figure 9.

Tableau 2 : Effet de l'intensité du champ électrique sur les cellules biologiques.

Champ électrique appliqué	Effet induit sur la cellule
Champ trop faible ($E < E_p$)	Pas d'effet
Champ suffisamment intense ($E > E_p$)	Electroperméabilisation réversible
Champ très intense ($E \gg E_p$)	Electroperméabilisation irréversible

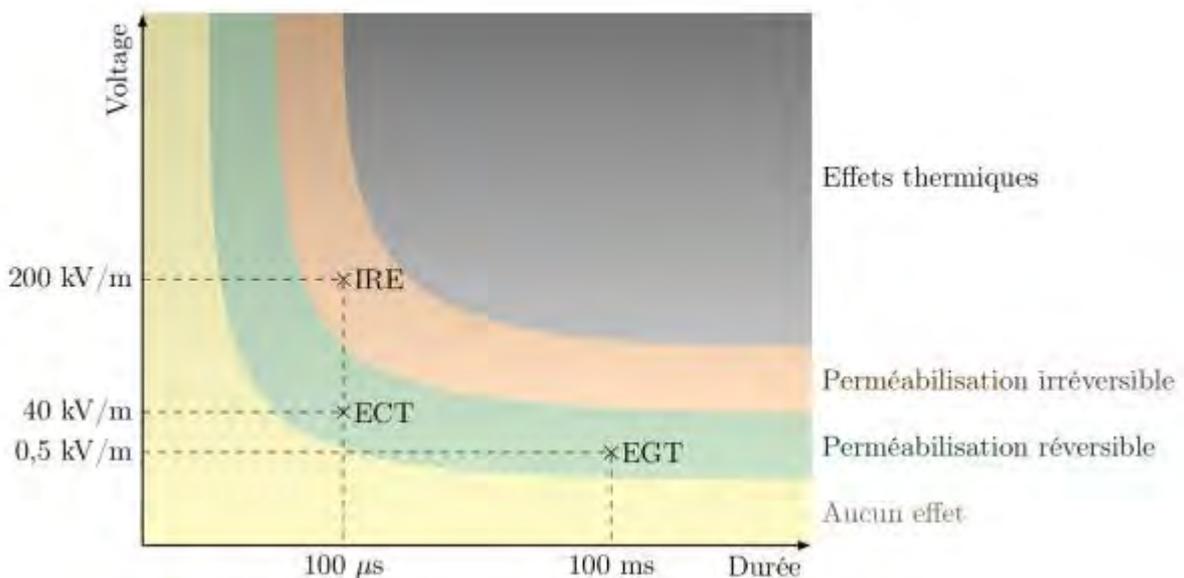


Figure 9: Modes d'électroperméabilisation en fonction de la durée et de l'amplitude des pulses électriques (sans échelle). Les croix indiquent des paramètres couramment utilisés pour l'électrochimiothérapie (ECT), l'électrotransfert de gènes (EGT) et l'électroporation irréversible (IRE) [39].

III.3 Description du phénomène

Bien que l'application des impulsions de champ électrique soit de plus en plus utilisée en clinique et dans l'industrie, les mécanismes responsables de ce phénomène restent pour la plupart indéterminés. Il est bien connu que la création de défauts dans la membrane facilite l'accès des grosses molécules à l'intérieur de la cellule, mais les phospholipides sont-ils seulement "déstabilisés" au sens physico-chimique, ou des structures particulières réelles (électropores) sont-elles vraiment créées ? Jusqu'à présent, la communauté scientifique n'a pas

statué sur le sujet et les deux théories coexistent. Ainsi, les deux termes « électroporation » et « électroperméabilisation » sont toujours utilisés pour expliquer le phénomène.

Afin de caractériser le phénomène d'électroperméabilisation de la membrane plasmique, des outils computationnels tels que les simulations en dynamique moléculaire (Figure 10) sont utilisés pour étudier les effets des impulsions électriques sur la bicouche lipidique [40]. Ces simulations montrent qu'en appliquant un champ électrique, les molécules d'eau pénètrent dans la bicouche, ce qui provoque une réorientation des lipides adjacents avec leurs groupes de têtes polaires vers ces molécules d'eau créant ainsi un pont hydrogène à travers la membrane : un électro-pore. Ces pores permettent la diffusion des molécules hydrophiles vers le cytoplasme ou vers le milieu extracellulaire. Cette étape de formation des pores a lieu aussi longtemps que le champ est appliqué. Une fois que le champ électrique est arrêté, une diminution de la dimension des pores est observée jusqu'au moment où les molécules d'eau migrent hors de l'intérieur de la membrane. Ce type de pores serait très peu stable et aurait une durée de vie très courte [41]. Ces pores n'ont pas encore été visualisés directement vu leur taille (quelques nanomètres) : ils sont trop petits pour les microscopes optiques et trop instables pour le prétraitement requis pour la microscopie électronique.

Cependant, la membrane cellulaire avec les différentes protéines et molécules qui s'y insèrent et l'entourent, est beaucoup plus complexe qu'une bicouche lipidique, et jusqu'à présent, une visualisation directe des pores dans les membranes cellulaires n'a jamais été effectuée. La théorie de création de pores suite à l'électroporation reste donc controversée [42].

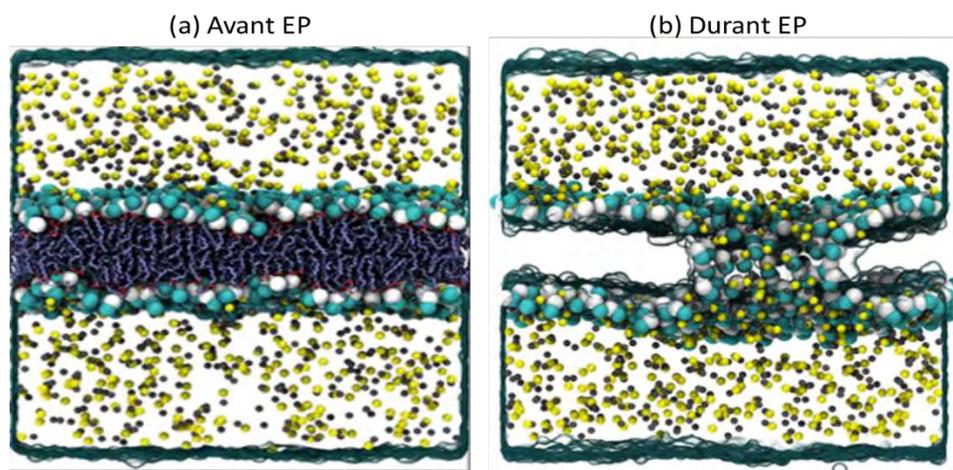


Figure 10: Simulation de la dynamique moléculaire d'une bicouche lipidique soumise à l'électroporation. Les parties polaires des phospholipides sont présentées en perles blanches et cyan, les parties apolaires sont représentées en bleu dans (a) et transparentes dans (b) ; des ions sodium et chlorure sont colorés en jaune et gris ; l'eau est transparente [43].

De nombreuses études de cinétique de la perméabilisation, réalisées à l'IPBS [42] ont conduit à une description du phénomène en 5 étapes :

- l'initiation: une augmentation du potentiel transmembranaire est induite par le champ électrique appliqué et cause des défauts locaux lorsqu'il atteint la valeur du seuil de perméabilisation
- l'expansion : une transition de la membrane se produit aussi longtemps que le champ est maintenu, cette étape est dépendante du nombre et de la durée des impulsions
- la stabilisation : un état perméable stable se maintient même après l'arrêt des impulsions
- la réimpermeabilisation : perte progressive de l'état perméable et retour à l'état initial
- la mémoire : la viabilité cellulaire est préservée malgré le fait que des différences dans les propriétés structurales et physiologiques des membranes restent présentes quelques heures après électropeméabilisation.

Les trois premières étapes qui conduisent au phénomène d'électropeméabilisation se déroulent en quelques millisecondes, la réimpermeabilisation en quelques dizaines de secondes à 37 °C, et l'état rémanent reste présent pendant quelques heures.

Néanmoins, quelque soit la nature des structures membranaires responsables de ce phénomène, l'augmentation de la perméabilisation de la cellule peut être induite par électroporation. Et c'est cet accès facilité au cytoplasme qui est à l'origine du nombre et de la diversité des applications de l'électroporation.

III.4 Modèles d'étude

Outre les simulations numériques *in silico*, différents modèles expérimentaux ont été mis en place et utilisés pour l'étude de l'électroporation au sein de l'équipe de biophysique cellulaire de l'IPBS, allant des membranes lipidiques au petit animal *in vivo* en augmentant graduellement leur complexité (Figure 11).

- *In silico* : La composition cellulaire et tissulaire réelle représentent un système très complexe, impossible à simuler. Pourtant, des études de modélisations et de calculs théoriques [44], [45], ainsi que des simulations numériques [46] permettent d'avoir une bonne prédiction du comportement membranaire. Certains travaux ont décrit la formation de pores [41], [40], et même prédit le comportement tissulaire suite à l'électroporation [47].
- Vésicules unilamellaires géantes (GUV) : Ce modèle d'étude de bicouche lipidique artificielle représente une version simplifiée de la membrane plasmique, adapté pour l'étude de l'électroporation. Elles ont permis d'observer le comportement lipidique après

électroporation [48], de déterminer le processus d'internalisation des molécules selon leur taille et leur charge [49] et d'étudier la fusion cellulaire induite par l'électroporation [50].

- *In vitro* : Le modèle phare pour l'étude de l'électroporation sur le vivant est le modèle cellulaire en culture 2D. La plupart des études sont réalisées avec ce modèle [31], [34], [51], [52].
- *Ex-vivo* : Afin de se mieux rapprocher de ce qui se passe *in vivo* après électroporation, le développement d'un nouveau modèle cellulaire est en plein essor : les sphéroïdes multicellulaires 3D sont capables de bien mimer le comportement tissulaire parce qu'il prend en compte les interactions cellule/cellule, la matrice extracellulaire et l'accessibilité des molécules. Plusieurs études ont permis de confirmer la réussite de leur utilisation pour étudier le mécanisme de l'électroporation des tissus [53], [54], [55].
- *In vivo* : Les tissus dans les organismes vivants sont plus complexes que les cellules *in vitro* 2D ou 3D. Pour cette raison, le petit animal (souris) reste le principal organisme d'étude de l'électroporation. Plusieurs travaux ont montré un électrotransfert efficace de nombreuses molécules *in vivo* [56], [57].

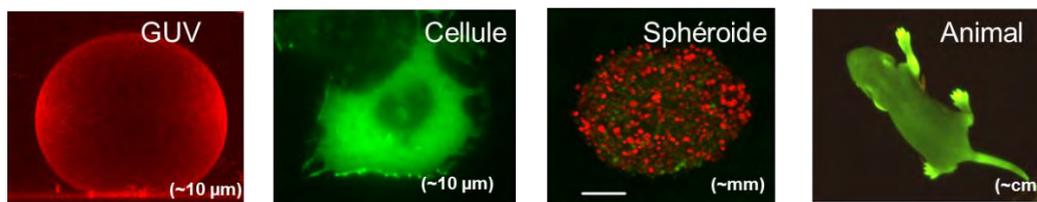


Figure 11 : Les modèles d'étude de l'électroporation, allant des vésicules unilamellaires géantes (GUV) jusqu'au petit animal.

III.5 Applications de l'électroporation

Qu'elle soit réversible ou irréversible, l'électroporation émerge comme une technique ayant beaucoup d'applications dans différents domaines en raison de sa facilité d'utilisation et de l'accès direct des molécules exogènes au compartiment intracellulaire. Cette technologie est utilisée dans de nombreux domaines de biotechnologie et de recherche fondamentale et clinique. L'électroporation induit une augmentation temporaire non sélective de la perméabilité, permettant une entrée ou une sortie des molécules et des espèces chimiques dépendante du gradient de leur concentration à travers la membrane, de leur taille et de leur charge.

III.5.1 Industrie Agroalimentaire

L'électroporation est une méthode largement utilisée dans l'industrie alimentaire dans le cadre de l'extraction des composants intracellulaires tels que le sucre à partir de betteraves [58], [59], des jus de fruits [60] et des lipides à partir des algues pour la production d'énergie renouvelable [61], [62] (Figure 12). L'électroporation a été aussi utilisée pour la cryopréservation des aliments (notamment les épinards) assurant une meilleure résistance des produits alimentaires aux dommages causés par la congélation [63].



Figure 12: Coupes des betteraves avant et après traitement avec le champ électrique, avec le rendement en jus obtenu correspondant [58].

Elle est également un outil prometteur utilisé pour la stérilisation de l'eau et la conservation des aliments [64]. En effet, l'intégrité et la morphologie des bactéries sont soutenues par la paroi cellulaire, cible des principaux processus d'inactivation microbienne. Une approche prometteuse de l'inactivation bactérienne est basée sur l'utilisation de champs électriques pulsés (PEF).

Les travaux de Pillet et al. [65] (Figure 13) ont montré que l'exposition des bactéries sous forme végétative aux impulsions de champ électrique conduit à une désorganisation structurale reliée à des altérations morphologiques et mécaniques de la paroi cellulaire. D'autre part, le traitement des spores avec le champ électrique pulsé induit une destruction partielle des nanostructures des protéines de l'enveloppe, associée à des altérations internes du cortex et du noyau.

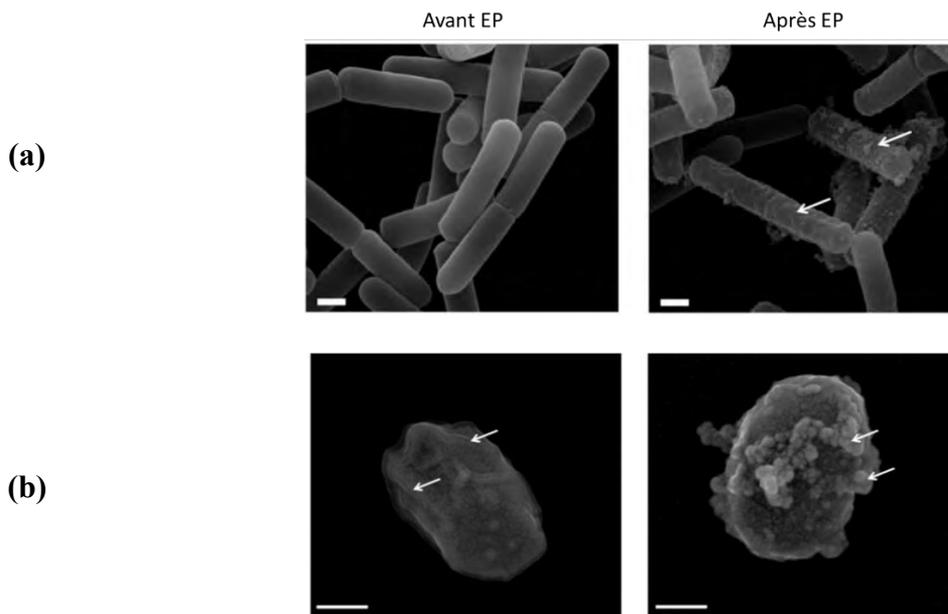


Figure 13 : Images en microscopie électronique à balayage avant et après électroporation montrant (a) la désorganisation de la paroi cellulaire des bactéries sous forme végétative après l'application des impulsions du champ électrique (1000 impulsions à 7.5 kV/cm). Les flèches blanches indiquent les dommages de surface, barres d'échelle : 500 nm. (b) les spores bactériennes altérés par le champ électrique (10 000 impulsions à 7.5 kV/cm). Barres d'échelle : 250 nm [65].

III.5.2 Applications biomédicales

En plus de l'industrie alimentaire, l'électroporation a trouvé de larges applications dans le domaine de la clinique humaine.

i. Electrogénothérapie

Cette approche est utilisée comme outil de laboratoire pour le transfert des gènes dans des bactéries (transformation) ou des cellules (transfection) [66], [67]. De plus, cet électrotransfert des gènes a été transposé à la médecine. La transfection génique consiste à introduire du matériel génétique depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire [49],[68],[35],[69]. L'information contenue dans le gène permet de synthétiser une protéine en particulier. L'entrée et l'expression *in vivo* des gènes rapporteurs sont augmentées de plusieurs ordres en les combinant à l'électroporation. Les Figure 14.a et Figure 14.b montrent l'expression de la β -galactosidase [70] et du « green fluorescent protein » GFP [71], respectivement, dans le muscle d'une souris *in vivo*.

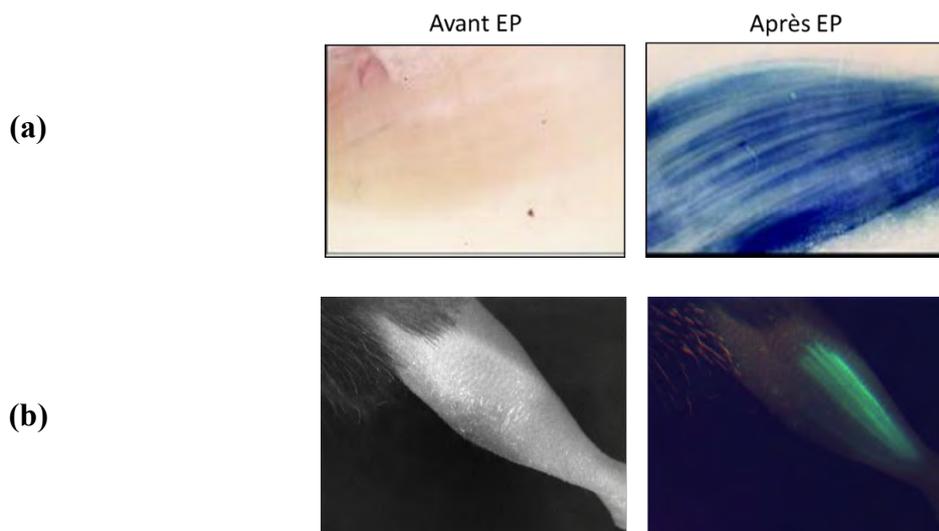


Figure 14: Images en fluorescence montrant l'expression des gènes après injection dans les muscles d'une souris avant et après application des impulsions du champ électrique. (a) Expression de la β -galactosidase [70], (b) Expression de la GFP [71].

L'électroporation a permis de s'affranchir de l'utilisation des virus pour la transfection et donc de diminuer les risques pour le patient [34], [35]. Le premier test clinique en Phase I d'électrotransfert de gènes sur des patients atteints de cancer est concluant [74].

Malgré les perspectives d'utilisation en médecine de l'EGT (notamment dans le domaine de la vaccination), les mécanismes sous-jacents ne sont pas complètement compris, le processus est plus complexe qu'une simple diffusion de l'ADN jusqu'au compartiment intracellulaire. L'entrée de l'ADN dans les cellules est en effet un processus à étapes multiples avec une étape initiale d'interaction de l'ADN avec la membrane. [75], [76], [77].

ii. Electrochimiothérapie

C'est une modalité de traitement antitumoral qui combine l'administration d'agents chimiothérapeutiques peu ou pas perméants, localement ou par voie systématique, avec l'application locale des impulsions électriques dans le but de faciliter la délivrance des drogues dans les cellules cancéreuses [78] (Figure 15). L'augmentation de la concentration de la drogue dans les cellules tumorales (jusqu'à plusieurs Log) permet l'augmentation de la toxicité de la molécule localement, au site de l'électroporation.

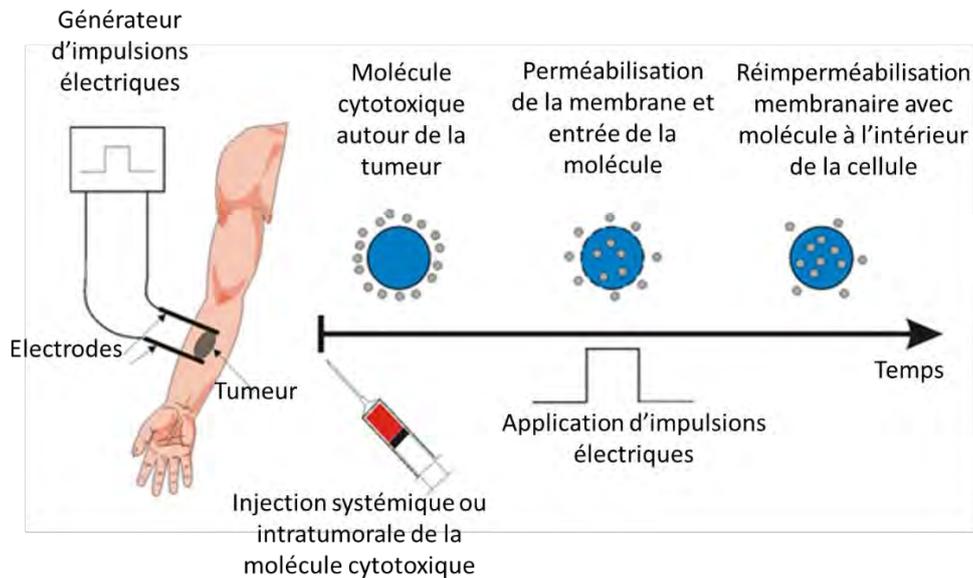


Figure 15 : Schéma classique de l'électrochimiothérapie ECT décrivant les différentes étapes de la procédure.

Suite à des premiers essais concluants *in vitro* [79], l'ECT a été appliquée avec succès à l'animal [80], [81] et des essais cliniques ont été effectués [82]. Les Figure 16 et Figure 17 montrent la réponse de tumeurs chez un cheval (sarcoïdes) [81] et une patiente (mélanome) ayant une métastase [83], respectivement, après combinaison de l'électroporation avec l'injection du cisplatine. Les résultats montrent une régression efficace des tumeurs avec un effet minimal sur les tissus sains.



Figure 16 : Images de sarcoïdes équins sur la paupière supérieure d'un cheval, (A) avant ECT, (B) 2 semaines après 3^{ème} session de ECT, (C) 18 semaines après 4^{ème} session de ECT [81].



Figure 17 : Réponse à l'électrochimiothérapie (Cisplatine) chez une patiente atteinte du mélanome [83].

En plus de la destruction des cellules induite par le médicament, l'électroporation est responsable de modifications vasculaires dans la région tumorale. Un «vascular lock», consistant en un réflexe de constriction des vaisseaux après application d'impulsions électriques, produit une réduction temporaire de la perfusion du tissu tumoral et d'un œdème interstitiel [84]. Cet effet de blocage vasculaire semble durer plus longtemps dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux. L'électrochimiothérapie utilise des doses plus faibles des médicaments cytotoxiques que la chimiothérapie classique : le traitement est beaucoup plus efficace même pour des doses 3 fois plus faibles, rendant inexistants les effets secondaires. Les cellules saines des tissus avoisinant les nodules tumoraux, et qui ne sont pas soumises aux impulsions électriques, sont protégées de l'action toxique [85].

En 2006, les protocoles ont été standardisés et des générateurs dédiés à l'électroporation ont été commercialisés (Cliniporateur™) [86]. De nos jours, plus de 150 centres cliniques en Europe, exécutent efficacement le traitement d'électrochimiothérapie.

iii. L'électroporation irréversible

Les thérapies d'ablation sont des alternatives intéressantes à l'excision chirurgicale traditionnelle en oncologie clinique. Beaucoup de ces thérapies utilisent l'induction thermique (chauffage ou refroidissement) pour tuer les volumes ciblés de cellules, telles que l'ablation par radiofréquence, la cryoablation, et les ultrasons de haute intensité [88], [89]. L'IRE est considérée comme une approche thérapeutique non thermique pour le traitement des tumeurs et l'ablation focale. Ce traitement offre un certain nombre d'avantages par rapport aux techniques thermiques parce que la nature non thermique des impulsions d'électroporation épargne la matrice extracellulaire, les grands vaisseaux, et d'autres structures sensibles [90],

[91]. Elle est très répandue en clinique pour l'ablation tumorale (notamment aux Etats Unis) [92], [93].

De plus, l'IRE est utilisée pour la stérilisation (inactivation microbiale) des matériels médicaux et pharmaceutiques. Cette stérilisation est habituellement accomplie par la stérilisation à la vapeur et le traitement à ultra-haute température, par l'utilisation des produits chimiques toxiques (exposition à l'oxyde d'éthylène) ou par irradiation [94]. Toutes ces méthodes présentent des inconvénients tels que la production de réactions toxiques secondaires ainsi que des changements des propriétés physiques, chimiques et mécaniques des produits traités.

III.6 Conclusion

Bien que l'utilisation de l'électroporation se développe dans l'industrie et en médecine, une compréhension à l'échelle cellulaire du phénomène est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Pouvoir prédire de façon précoce l'effet de l'électrochimiothérapie sur la cellule est ainsi d'un grand intérêt pour utiliser, d'une façon efficace et sûre, la méthode.

Cette étude à l'échelle cellulaire peut être envisagée grâce aux BioMEMS (microsystèmes à applications biomédicales) ou des LOC (lab-on-chip). Ces systèmes rendent possible la combinaison de plusieurs fonctions de détection, de synthèse, d'extraction et d'analyse sur une surface de quelques cm² (voire moins).

Dans la partie qui suivra, nous effectuerons une étude rapide des systèmes conçus pour différentes applications dans différents domaines.

IV. Lab-on-chip

L'histoire des Lab-on-chip est intrinsèquement liée à la microfluidique qui, à son tour, est liée au développement des microtechnologies des semi-conducteurs. L'histoire des microsystèmes commence en 1959 avec le discours visionnaire de Richard Feynman (1918-1988) intitulé « *There is plenty of room in the bottom* » [95]. Pendant son exposé, Feynman a sensibilisé son auditoire sur l'intérêt d'aller explorer le monde microscopique et nanoscopique. Ce fut l'étincelle de la révolution technologique fondée sur les systèmes issus de la microélectronique. Les chercheurs ont adapté les technologies photographiques pour créer la photolithographie afin de fabriquer des transistors miniaturisés et des circuits intégrés. Lors des

années 60, les chercheurs ont utilisé ces technologies pour fabriquer des structures micromécaniques appelés MEMS (Micro-Electro-Mechanical-Systems), permettant la production d'accéléromètres miniaturisés pour une utilisation dans les objets du quotidien. En effet, les accéléromètres sont présents dans les voitures modernes (actionneurs d'airbag) [96], [97], dans les systèmes GPS [98], [99], les têtes d'imprimantes [100], [101], les micro-miroirs des projecteurs vidéo [102], dans les téléphones portables et bien d'autres.

En utilisant ces techniques de fabrication, le premier Lab-on-chip réel a été créé en 1979 à l'Université de Stanford pour la chromatographie en phase gazeuse [103]. Cependant, la recherche sur les Lab-on-chip n'a véritablement commencé qu'à la fin des années 80 avec le développement de la microfluidique et l'adaptation des procédés de microfabrication pour la production de puces en polymère.

Lors des années 90, de nombreuses recherches se sont développées autour de l'exploration de la microfluidique et de la miniaturisation des opérations biologiques et biochimiques telles que la PCR. Cela n'a rien de surprenant quand on considère que les microcanaux étaient à la même échelle que celle des cellules. Ces progrès ont permis aux scientifiques d'effectuer facilement, pour la première fois, des opérations au niveau de la cellule unique.

Le terme « laboratoire sur puce » ou « Lab-on-chip » est employé pour décrire un dispositif miniaturisé qui intègre, dans un système de quelques centimètres carrés, une ou plusieurs opérations (mélange, réaction, séparation et manipulation des produits chimiques et des particules) classiquement réalisées dans des laboratoires de chimie ou de biologie. Ce type de dispositifs est aussi connu sous le nom de « microsystème d'analyse totale » (ou Micro Total Analysis System (μ TAS) [104]. Ces dispositifs regroupent non seulement un ensemble de micro-canaux, mais aussi des composants d'actionnement, de mesure et de détection (électrodes, pompes, champ électrique, etc.).

Une puce microfluidique fonctionnelle peut donc réaliser certaines fonctions, telles que le transport, le mélange (avec des réactifs), le traitement de l'échantillon (concentration, tri, détection). La Figure 18 donne un exemple d'une puce microfluidique générique [105].

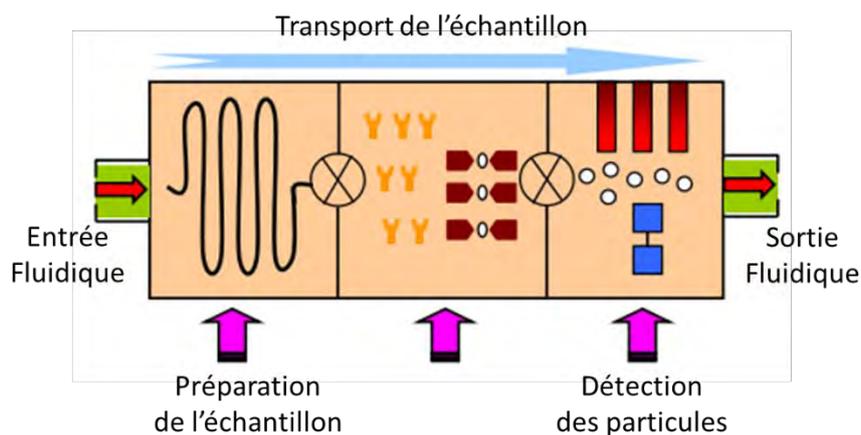


Figure 18 : Une puce microfluidique générique présentant la préparation de l'échantillon, la sélection et la détection des bio/nano/micro-particules.

IV.1 Avantages par rapport aux technologies classiques

La miniaturisation de telles opérations présente de nombreux avantages [106], [107] :

- La réduction des coûts : les microtechnologies vont diminuer le coût de l'analyse car l'intégration permettra la réalisation de nombreux tests sur la même puce, réduisant à un prix négligeable le coût de chaque analyse individuelle.
- La réduction des volumes utilisés (jusqu'à quelques picolitres) : ce qui limite l'utilisation de produits rares et coûteux ou réduit les risques induits par la manipulation pour l'expérimentateur (dans le cas de produits toxiques).
- Cette réduction des volumes de fluide se traduit par un rapport plus favorable entre surface et volume : une couche sensible de détection se caractérise par un meilleur rendement de capture.
- La parallélisation : grâce à sa capacité d'intégrer des microcanaux, la technologie du Lab-on-chip permet d'effectuer des dizaines d'analyse simultanément sur la même puce.
- La rapidité du temps d'analyse et du diagnostic : à l'échelle micrométrique, la diffusion de produits, du flux et de la chaleur est plus rapide.
- La possibilité d'utilisation dans des environnements extérieurs pour la surveillance de l'air et de l'eau sans nécessité d'une intervention humaine.
- La réduction de la production de déchets.
- La santé pour tout le monde : cette technologie permet de réduire les coûts de diagnostic et des infrastructures dédiées aux analyses, ce qui rendra la médecine moderne plus accessible aux pays en développement à des coûts raisonnables.

IV.2 Applications des Lab-on-chip

Beaucoup de recherches sont menées sur les laboratoires sur puces et les applications visées sont très diversifiées. La plupart des recherches se concentrent sur les technologies de diagnostic, pour lesquelles nous donnons ici quelques exemples parmi les plus prometteurs.

IV.2.1 Applications en biologie moléculaire

La technologie des Lab-on-chip offre des avancées permettant l'étude d'un nombre important de molécules et d'organismes biologiques. Vu que l'amplification de l'ADN par PCR repose sur des cycles thermiques, la capacité d'effectuer des changements thermiques à grande vitesse à l'échelle microscopique explique pourquoi le Lab-on-chip est devenu un moyen rapide pour faire la PCR. Ces gains élevés en termes de vitesse de détection se mettent en place tout en conservant le même niveau de spécificité. A titre d'exemple, ces micro-plateformes sont utilisées pour la détection des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), comme le montre la Figure 19. Les SNPs représentent la variation d'une seule paire de base nucléotidique au sein du génome entre les individus d'une même espèce. Les Lab-on-chip regroupent la miniaturisation d'un ensemble d'opérations : la préparation de l'échantillon, l'amplification des gènes et la détection des SNPs, simplifiant ainsi le processus du génotypage. L'échantillon biologique (tel le sang contenant l'ADN), est injecté à l'entrée de la région d'extraction de l'ADN. Ensuite, les cellules sanguines sont lysées et l'ADN brut est extrait avant de circuler jusqu'à la région où s'effectue la PCR. Le produit résultant de la PCR est finalement conduit jusqu'à la zone de détection pour la discrimination des SNPs [108].

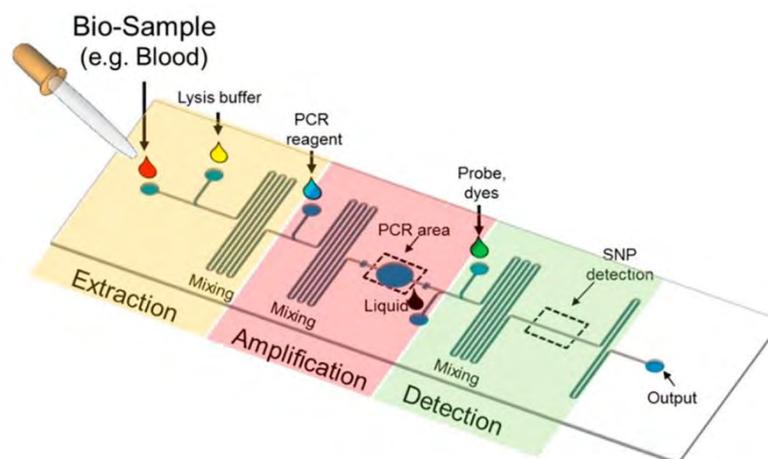
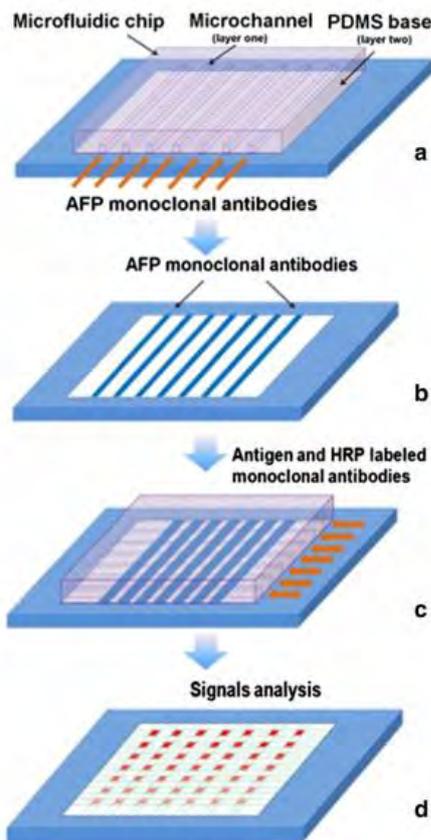


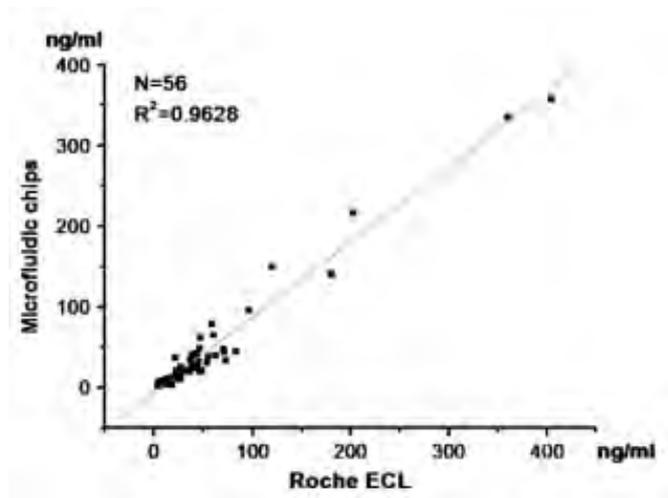
Figure 19 : Un Lab-on-Chip typique pour la détection des SNPs [108].

De plus, les Lab-on-chip fournissent un nouveau monde de possibilités pour le séquençage de l'ADN et de l'ARN. Les premiers projets du séquençage du génome humain ont pris des années et ont nécessité le travail de centaines de chercheurs [109]. Aujourd'hui, avec l'utilisation des Lab-on-chip intégrant un réseau de sondes d'ADN, nous sommes capables de séquencer les génomes des milliers de fois plus rapidement [110], [111], [112]. Toutes les opérations biomoléculaires effectuées sur les Lab-on-chip montrent un grand potentiel pour la détection des virus [113] et des bactéries [114], mais aussi pour l'identification de biomarqueurs de certaines pathologies (ADN et ARN) [115], [116]. Ces laboratoires sur puces présentent une grande sensibilité de détection de biomarqueurs et apparaissent donc comme des outils très prometteurs pour le diagnostic du cancer et d'autres maladies. Ils se présentent comme des techniques d'analyse rapides, simples et précises, capables de détecter des biomarqueurs du cancer colorectal [117], du cancer de la prostate [118], etc. A titre d'exemple, une étude faite en 2014 [119] montre le développement d'une méthode rapide, simple et à faible coût d'une puce microfluidique pour la détection de la protéine AFP (Alpha FetoProtein) présente abondamment chez les personnes atteintes d'un hépatocarcinome (cancer du foie). La détection de l'AFP se base sur l'utilisation des anticorps monoclonaux couplés à une molécule fluorescente, spécifiques de cette protéine. En plus de la réussite de la détection de cette protéine, même à très faible concentration (1.5 ng/ml), une bonne corrélation avec le kit commercial « Roche's electrochemiluminescence (ECL) » appuie les propos établis sur les avantages du Lab-on-chip (Figure 20).

En outre, les laboratoires sur puce détiennent d'énormes possibilités pour les essais immunologiques, qui peuvent être effectués en quelques dizaines de secondes au lieu des dizaines de minutes requises avec les technologies classiques [119].



(A)



(B)

Figure 20 : (A) Schéma de la puce microfluidique du test immunofluorescent de l'AFP. (a) Immobilisation de l'anticorps Ab1. Ab1 est introduit dans les micro-canaux, ce qui résulte en une formation de bandes parallèles d'anticorps sur le PDMS. (c) Réaction immunologique entre les antigènes AFP et les anticorps couplés à la molécule fluorescente HRP. (d) Mesure et analyse de la chimioluminescence. (B) Comparaison entre le test microfluidique et le kit Roche ECL commercial [119].

IV.2.2 Applications en protéomique

Dans le domaine de la protéomique, les Lab-on-chip offrent la possibilité d'effectuer des analyses de protéines tout en intégrant, là encore, toutes les étapes au sein de la même puce: extraction à partir de la cellule, séparation par électrophorèse et analyse par spectrométrie de masse. Ces processus intégrés montrent la capacité de réduire considérablement l'analyse des protéines de quelques heures avec des systèmes classiques à quelques minutes avec le laboratoire-sur-puce. Les Lab-on-chip montrent également un grand potentiel pour la cristallisation des protéines (révélation de la structure 3D d'une protéine). Avec l'utilisation des laboratoires sur puce, les chercheurs sont capables de contrôler simultanément et d'une manière rapide tous les paramètres permettant la cristallisation d'une protéine donnée [120]. Le facteur le plus important est la possibilité de paralléliser les conditions de cristallisation afin d'accélérer la découverte de conditions de cristallisation des protéines inconnues et d'étudier leurs structures (Figure 21).

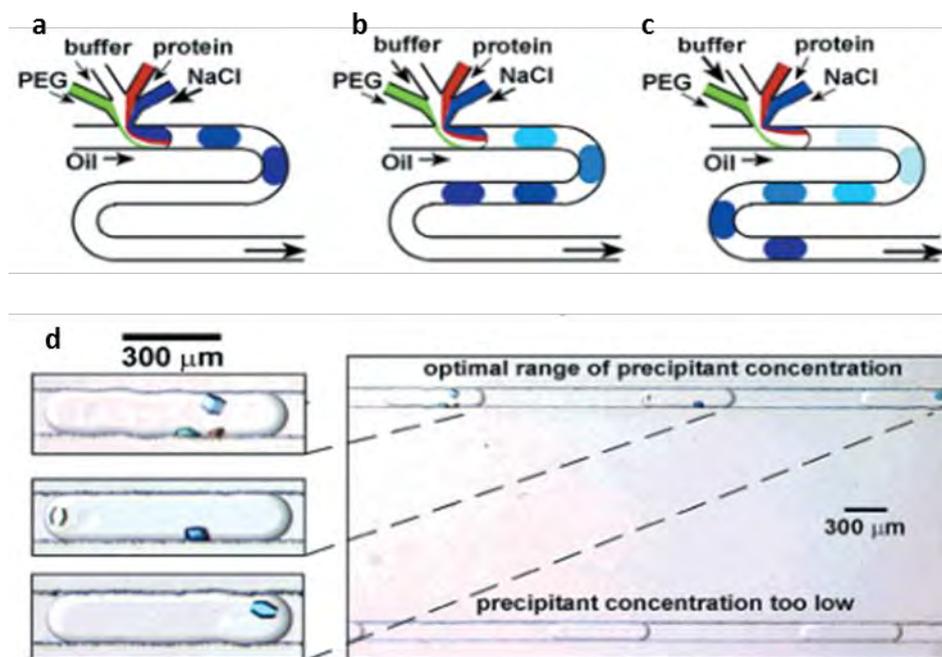


Figure 21: Système microfluidique à base de gouttes pour l'étude de la cristallisation des protéines. (a-c) Une représentation schématique: le débit d'écoulement du NaCl est réduit au fur et à mesure et le débit d'écoulement du tampon augmente ; le volume de la solution de NaCl injectée dans chaque gouttelette diminue (diminution de la concentration). L'ombre des gouttelettes représente la concentration de NaCl. Chaque gouttelette successive représente un essai qui teste un rapport différent des solutions mères. (d) Une microphotographie polarisée illustrant la cristallisation du lysozyme à l'intérieur des gouttelettes de composition variable sur une puce microfluidique [120].

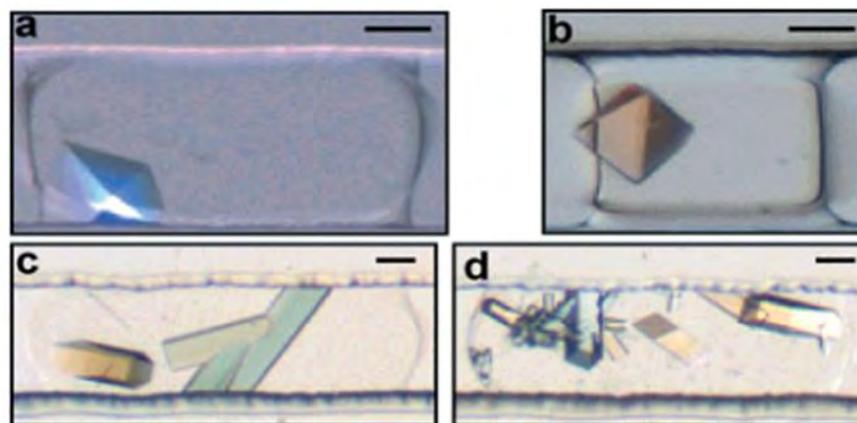


Figure 22 : micrographies à lumière polarisée de cristaux de protéines obtenus à l'intérieur des gouttelettes sur une puce microfluidique. Barre d'échelle est de 50 μm . (a, b) Thaumatine, (c) Catalase du foie bovin, et (d) la glucose-isomérase. Le cristal en (b) a été obtenu en permettant une évaporation partielle des gouttelettes [120].

IV.2.3 Applications en chimie

La possibilité de contrôler la température à l'échelle micrométrique permet une plus grande efficacité dans certaines réactions chimiques. Par conséquent, beaucoup de recherches ont été menées sur l'utilisation de laboratoires sur puce comme réacteurs chimiques miniaturisés et hautement parallélisables. Les Lab-on-chip peuvent également être intéressants pour traiter et utiliser des composés dangereux et explosifs en travaillant avec de plus petits volumes. De

plus, dans le cadre de la sécurité sanitaire des aliments et de l'analyse chimique environnementale, ils sont développés pour contrôler la qualité de la nourriture ou la pollution de l'eau [121].

IV.2.4 Applications en biologie cellulaire

Les microdispositifs sont de petites dimensions (canaux, électrodes) ce qui les rend appropriés pour travailler avec de faibles volumes de solutions. La technologie Lab-on-chip se développe vers la biologie cellulaire car une seule cellule peut être traitée à la fois et cela en quelques secondes. De plus, la faible distance entre les microélectrodes permet la réduction de la valeur de la tension utilisée, ce qui simplifie les dispositifs à mettre en œuvre. En outre, l'effet Joule résultant de l'emploi des champs électriques est considérablement réduit en microvolume. Il existe ainsi plusieurs applications des microsystèmes en biologie cellulaire : le Patch Clamp au niveau micrométrique, le contrôle de la différenciation des cellules souches [122], la cytométrie en flux haut débit [123] et le tri cellulaire [124], [125].

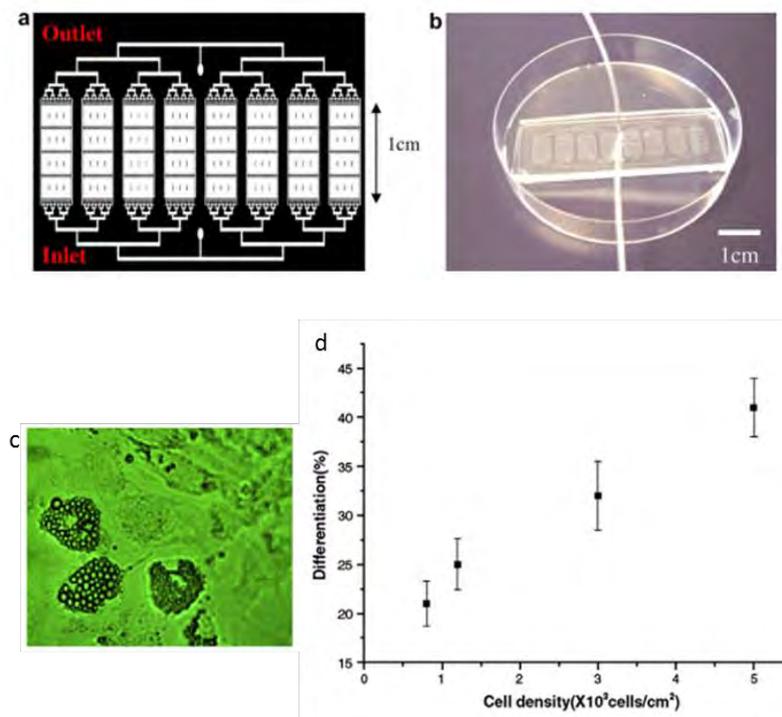


Figure 23 : (a) Représentation schématique d'une puce microfluidique pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines en adipocytes. Huit chambres parallèles avec une entrée et une sortie. Chaque chambre est divisée en quatre compartiments par trois rangées. (b) Photographie de la puce microfluidique. (c) microphotographie des adipocytes différenciés, (d) le pourcentage de la population d'adipocytes après 14 jours de différenciation sur puce [122].

Un autre domaine de recherche actif concerne les Lab-on-chip pour la recherche pharmaceutique vu leur capacité de réaliser des criblages parallélisés haut débit pour la découverte des médicaments [126], [127].

Ces puces sont donc utilisées pour l'étude d'une grande gamme de entités biologiques, tel que l'ADN [128], les protéines et les peptides [129], et les cellules [130].

IV.3 Intégration des systèmes d'analyse on-chip

La plupart des microsystèmes développés jusqu'à présent nécessitent l'emploi de matériels importants pour l'analyse subséquente, tel que la microscopie, la fluorescence et la spectrométrie de masse, etc. Il n'est pas facile d'intégrer ces derniers sur les microsystèmes, d'où l'intérêt des méthodes d'analyse électriques. En effet, ces derniers présentent plusieurs avantages pour l'étude et l'analyse des cellules « on-chip ». En premier lieu, la détection électrique ne nécessite pas un marquage des molécules ou des cellules cibles, qui est souvent nécessaire dans d'autres méthodes de détection, une étape qui peut ajouter de la complexité au travail et pouvant avoir des effets altérant les cellules étudiées. Les cellules ne sont donc plus utilisables après marquage, ce qui n'est pas le cas avec la détection électrique. De plus, les propriétés électriques des échantillons biologiques fournissent de l'information sur un nombre de processus cellulaires tel que les activités des canaux ioniques et des neurones. Ce type d'information est difficile à obtenir avec les autres approches. Enfin, les outils de mesure électriques sont facilement intégrables sur les microsystèmes, surtout avec le développement de l'industrie de la microélectronique. Toutes ces caractéristiques font des systèmes microfluidiques à base de détection électrique une alternative attractive et compétitive dans le domaine d'études biologiques. Certains travaux existants dans la littérature en font un bon exemple. Eker et al. [131] ont présenté un système à base de mesure d'impédance (Figure 24.a) capable d'une part de distinguer entre des cellules cancéreuses résistantes ou non aux drogues et d'autre part de suivre la réponse des deux groupes de cellules à la doxorubicin. Aussi, les travaux de Gawad et al. [132] ont permis de développer un cytomètre en flux micrométrique à base de mesures impédancemétriques adapté pour le comptage et la séparation cellulaire. Les cellules sont conduites, par un flux fluidique, à travers la zone de mesure. Les signaux d'impédance des cellules sont mesurés par une paire différentielle d'électrodes avec le milieu de culture pris comme référence (Figure 24.b).

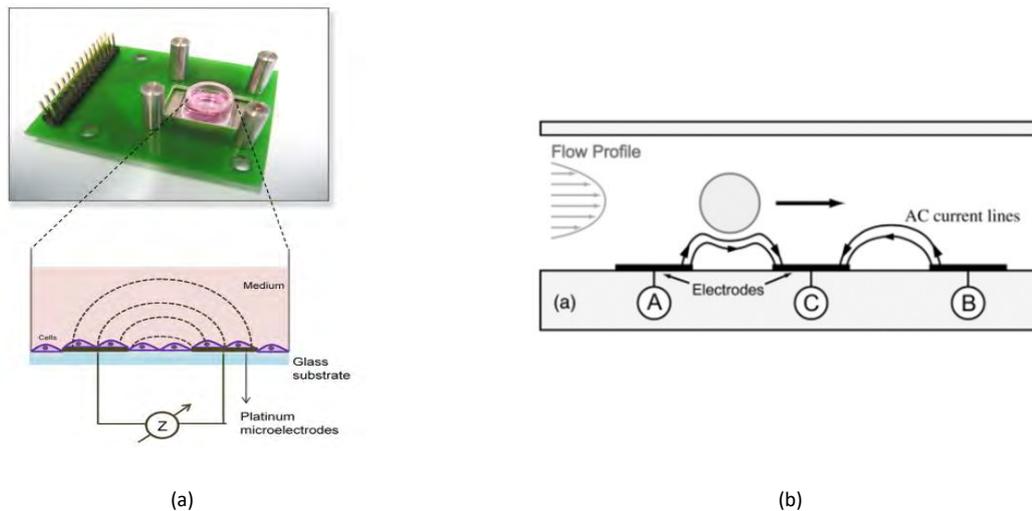


Figure 24 : (a) Plateforme d'étude de la résistance des cellules aux drogues par la spectroscopie d'impédance (haut). Schéma de la culture cellulaire sur les électrodes (bas) [131], (b) Vue schématique du système microfluidique de mesures d'impédance, montrant une particule qui passe en dessus de 3 électrodes (A, B et C) [132].

Une autre méthode d'analyse électrique des échantillons biologiques, l'électrorotation, est présentée dans le travail de Trainito et al. [133]. Elle consiste en l'identification des propriétés diélectriques des échantillons biologiques, en étudiant leur vitesse de rotation, une fois placés dans un champ électrique rotationnel. Dans ce travail, l'échantillon est capturé par diélectrophorèse négative (nDEP) et étudié électriquement par l'électrorotation, afin d'extraire la conductivité et la permittivité membranaire et cytoplasmique.

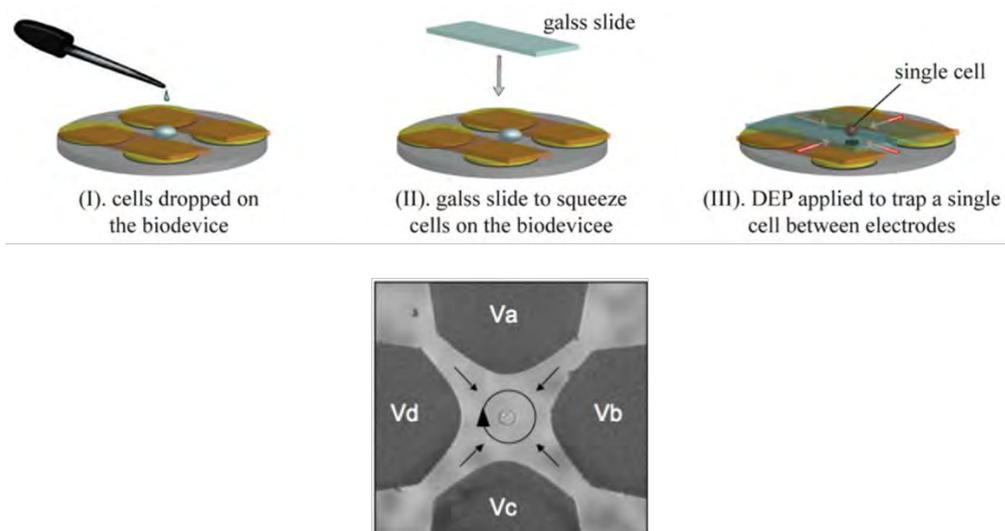


Figure 25 : La procédure de dépôt des cellules sur le microcomposant, développé par [133], afin de capturer une seule cellule dans la zone de détection. V (a,b,c et d) sont les 4 valeurs de voltage utilisées pour la fonction voulue (capture de la cellule par nDEP ou électrorotation).

Dans la partie qui suit, nous présenterons une autre méthode d'analyse répondant aux exigences du principe de miniaturisation et du « lab-on-chip » : la spectroscopie diélectrique hyperfréquence.

V. La spectroscopie diélectrique HyperFréquence

V.1 Historique

Les propriétés diélectriques des matériaux biologiques en fonction de la fréquence sont depuis très longtemps étudiées. Dans les années 1850, l'intérêt d'étudier ces propriétés est né à partir du moment du développement d'appareils permettant une mesure précise des résistances et des capacités électriques [134]. Au début des années 1900, la mesure de la réponse des matériaux biologiques excités par des courants alternatifs sinusoïdaux est devenue possible, grâce aux progrès technologiques des appareils électriques, et elle montrait une dépendance complexe des propriétés diélectriques des tissus avec la fréquence. Stewart a mesuré la résistivité du sang à basses fréquences [135] et a conclu que les érythrocytes se comportent comme des particules non conductrices. Les travaux d'Höber [136] sur la conductivité de solutions sanguines en fonction de la fréquence ont mis en évidence l'existence et l'effet de la membrane cellulaire en fonction de la fréquence mais aussi d'identifier le mécanisme de dispersion β : phénomène associé à la capacité d'une membrane cellulaire qui filtre les champs électriques à basse fréquence et permet à ces derniers à haute fréquence de passer à travers. Ensuite, Tesla proposa que les tissus se comportent comme des condensateurs dans une gamme de fréquence allant de 10 à 100 kHz, c'est-à-dire qu'ils offrent une faible résistivité à quelques dizaines de kHz [137]. A cette époque, les tissus sont donc considérés comme des conducteurs d'électricité dont la résistivité varie en fonction de la fréquence et les membranes cellulaires jouent effectivement un rôle important dans les propriétés diélectriques des tissus.

A partir des années 1920, une nouvelle étape dans l'étude des propriétés diélectriques des matériaux biologiques prit place. En 1926, les valeurs de la résistivité et de la capacitance du sang dans la gamme fréquentielle de 266 Hz à 2 MHz ont été publiées [138]. Pendant les années 1920 à 1930, une instrumentation poussée d'évaluation des propriétés diélectriques de tissus sur une gamme importante de fréquences a été développée par Fricke, Curtis et Cole. A l'issue de la contribution de ces travaux, de nouvelles solutions à certains problèmes biologiques ont été proposées. A titre d'exemple, il a été établi que la spectroscopie diélectrique jusqu'à 1 GHz peut constituer une méthode de diagnostic de tumeurs malignes [139]. Cette période se caractérisa donc par une augmentation du spectre fréquentiel d'analyse pour l'étude des propriétés diélectriques ainsi qu'une augmentation de la diversité des matériaux biologiques analysés.

Les années 1940 témoignent d'un développement rapide des technologies microondes (surtout des guides d'ondes et des oscillateurs opérant aux fréquences microondes). En 1948, Rajewsky et Schwan [140] mesuraient la permittivité complexe du sang à des fréquences allant jusqu'à 1 GHz. Ces mesures furent confirmées et étendues en fréquence par Cook [141]. Ce fut alors le début de la période d'étude des propriétés diélectriques des systèmes biologiques aux fréquences microondes [142] – [144]. Grâce à des mesures par sondes coaxiales, il a été montré que la permittivité et la conductivité varient d'un tissu à l'autre, ce qui permet de discriminer différents types cellulaires par l'étude de leurs propriétés diélectriques. De plus, il a été établi que la spectroscopie diélectrique présente un grand potentiel en termes de discrimination cellulaire et de diagnostic (Figure 26), car les propriétés diélectriques des cellules cancéreuses sont significativement différentes de celle des cellules saines [145].

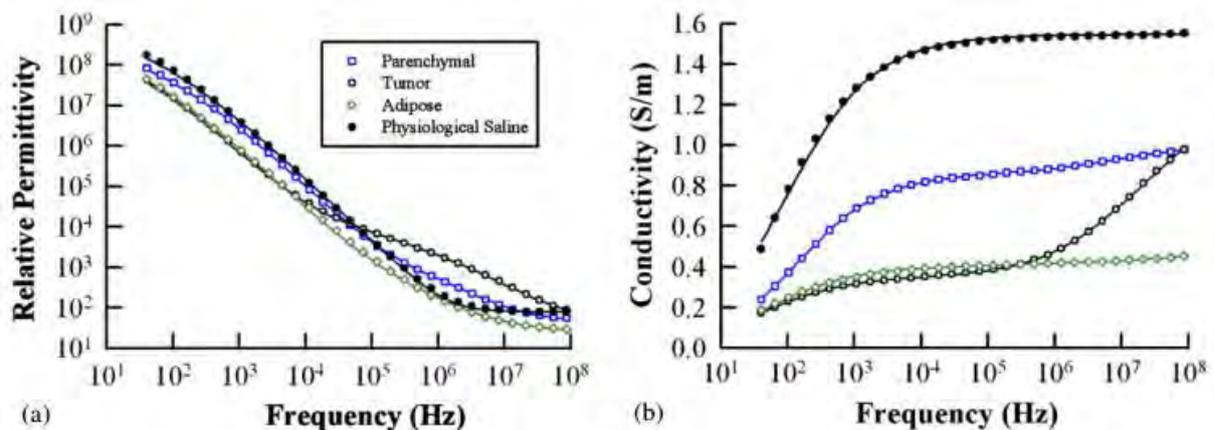


Figure 26 : (a) Permittivité relative et (b) conductivité en fonction de la fréquence des échantillons excisés du sein humain normales (parenchymateux et adipeux) et cancéreux et pour le sérum physiologique. Les données expérimentales (points) et théoriques sont présentées [145].

Les deux paragraphes suivants présentent les fondements physiques/théoriques de la spectroscopie diélectrique de matériaux. Nous nous limitons ici à la description de liquides aqueux polaires qui constituent l'ensemble des échantillons biologiques de nos travaux.

V.2 Polarisation des matériaux et propriétés diélectriques : Notions fondamentales

Quand un milieu contenant des charges est soumis à un champ électrique, le déplacement des charges se produit d'une façon dépendante du fait que ces dernières sont libres ou liées (à un atome ou à une molécule). Si les charges sont libres, comme dans le cas des électrons dans les métaux et des ions dans les électrolytes, le déplacement des charges positives se fera dans

la même direction du champ et celui des charges négatifs dans la direction opposée. Le courant résultant du déplacement de ces charges libres est appelé courant de conduction.

Un milieu isolant, ne contenant pas de charges libres, n'est donc pas le siège d'un courant de conduction. Cependant, des paires de charge positive et négative liées au sein d'atomes ou de molécules peuvent exister dans ces milieux. En effet, pour certaines molécules neutres (i.e. non chargées), il peut exister une asymétrie dans la distribution des charges électroniques liées. Cette asymétrie, qui peut être permanente ou induite par un champ électrique externe, forme un dipôle qui se caractérise par son moment dipolaire dont l'amplitude est le produit de la charge par la distance séparant les deux pôles (Figure 27). Suite à l'application d'un champ électrique, il y aura une induction d'une rotation des dipôles d'une façon à ce que ces derniers s'alignent parallèlement au champ électrique. On appelle ce phénomène la polarisation.

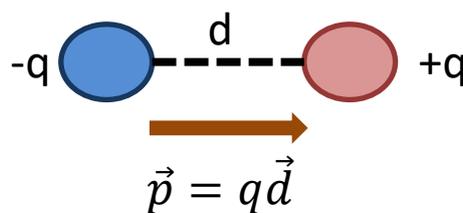


Figure 27 : Moment dipolaire induit par un champ électrique exogène.

V.2.1 Les différents phénomènes de polarisation

La polarisation totale du matériau est la somme des polarisations de chacune des entités du matériau : les molécules, les atomes et les électrons. Il existe ainsi trois catégories de mécanismes de polarisation :

- la polarisation électronique,
- la polarisation atomique,
- la polarisation permanente des dipôles.

La polarisation électronique est le résultat de la modification de la répartition des charges internes à chaque atome (le noyau est chargé positivement et le nuage électronique est chargé négativement). Cette polarisation est toujours présente quelque soit l'état du matériau (solide, gazeux ou liquide).

La polarisation atomique résulte du déplacement des atomes au sein d'une molécule, par rapport à leur position d'équilibre.

La polarisation d'orientation dipolaire concerne les édifices atomiques ou moléculaires qui possèdent un moment dipolaire permanent. A titre d'exemple, on trouve la molécule polaire de l'eau H_2O . La somme géométrique des moments dipolaires se trouvant dans la molécule n'est pas nulle, ce qui fait que la molécule d'eau présente un dipôle permanent (de moment dipolaire \vec{p}), comme le montre la Figure 28.

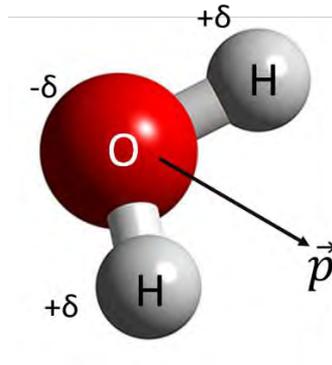


Figure 28: Moment dipolaire d'une molécule d'eau.

Cette polarisation est le cœur de l'analyse diélectrique de liquide. En effet, en absence du champ électrique, les dipôles sont orientés de façon aléatoire. Par contre, lors de l'application d'un champ électrique, tous ces dipôles ont tendance à s'aligner dans la direction du champ électrique (Figure 29) et ceci d'autant plus facilement que l'on est en milieu liquide au sein duquel les molécules (d'eau notamment) sont libres de tous mouvements.

En milieu aqueux, la polarisation d'orientation dipolaire est plus de dix fois supérieure à celles des autres polarisations, ce qui fait de ce phénomène : le cœur de l'analyse diélectrique de liquide.

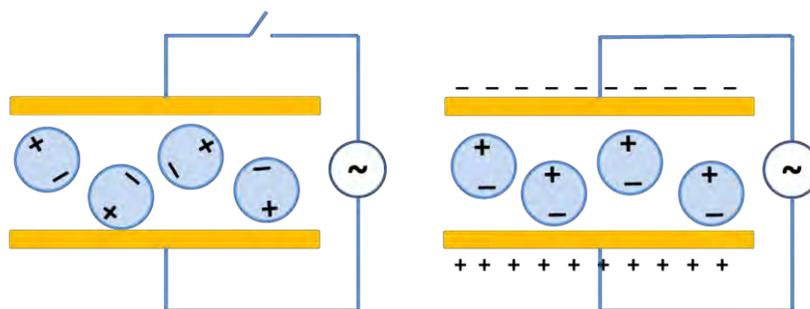


Figure 29: Polarisation d'orientation des particules sous champ électrique.

Afin de quantifier l'impact de ce(s) phénomène(s) sur la réponse électromagnétique des matériaux, calculons la densité volumique de polarisation totale, qui est définie par :

$$\vec{P} = \chi_e \epsilon_0 \vec{E}$$

Où χ_e représente la susceptibilité du matériau et ε_0 la permittivité diélectrique du vide avec une valeur constante : $\varepsilon_0 \approx 8,854 \cdot 10^{-12}$ F/m.

Le déplacement électrique \vec{D} sert à quantifier la superposition du champ électrique externe \vec{E} , et de celui induit par la polarisation. Son expression est :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \cdot \vec{E} + \vec{P} \rightarrow \vec{D} = \varepsilon_0(1 + \chi_e)\vec{E}$$

Cette relation indique que le champ électrique externe \vec{E} induit un déplacement électrique \vec{D} qui lui est proportionnel et fonction de la nature du matériau étudié. Dans un matériau linéaire, ce coefficient de proportionnalité se nomme permittivité du matériau :

$$\vec{D} = \varepsilon \cdot \vec{E} = \varepsilon_0(1 + \chi_e)\vec{E} \rightarrow \varepsilon = \varepsilon_0(1 + \chi_e)$$

Enfin, la permittivité relative est définie comme étant le rapport de la permittivité du matériau à celle du vide :

$$\varepsilon_r = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} = 1 + \chi_e$$

La spectroscopie va donc consister en la mesure de la permittivité relative ε_r des matériaux en fonction de la fréquence.

V.2.2 Le phénomène de relaxation diélectrique

La polarisation est un processus qui n'est pas instantané et qui présente (1) un régime transitoire pendant lequel les moments dipolaires rentrent en rotation sous l'effet du champ électrique qui les alignent (2) suivi d'un régime permanent atteint quand les dipôles trouvent leurs nouvelles orientations d'équilibre déterminées par l'équilibre des forces du champ intermoléculaires et thermiques.

La rotation des dipôles s'oppose en effet aux forces de frottement lorsque les molécules n'arrivent pas à se retourner en phase avec le champ électrique, des forces de rappel qui s'exercent sur le nuage électronique séparé de son noyau, ainsi qu'au mouvement des atomes et des molécules dû à la température ambiante. Cela induit des conséquences lorsque le champ électrique appliqué est variable et à haute fréquence :

- une consommation de l'énergie, prélevée sur l'énergie électrique, qui se dissipe dans le matériau sous forme de chaleur. Un milieu diélectrique absorbe donc de l'énergie par ce mécanisme de polarisation diélectrique,
- un retard dans l'orientation des dipôles qui est négligeable à basse fréquence, alors qu'il devient significatif lorsque la fréquence augmente, accompagné d'un déphasage entre le déplacement électrique \vec{D} et le champ électrique \vec{E} .

Pour tenir compte de ces effets, on introduit une partie imaginaire ε'' à la permittivité du matériau qui reflète les pertes diélectriques. La permittivité devient alors complexe et se définit comme suit :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega)$$

A partir d'une certaine fréquence spécifique de chaque type de polarisation, les entités polarisées ne sont plus capables de suivre la variation du champ électrique externe, ce qui engendre une baisse dans la polarisation totale du matériau (Figure 30). Cela est accompagné d'une réduction de la partie réelle de la permittivité relative (ε'_r) reflétant une réduction de la capacité du matériau à se polariser. Quant à la partie imaginaire de la permittivité relative (ε''_r), une augmentation aux voisinages de ces fréquences spécifiques traduit des pertes importantes lorsque les dipôles correspondants commencent à ne plus pouvoir « suivre les battements » du champ électrique.

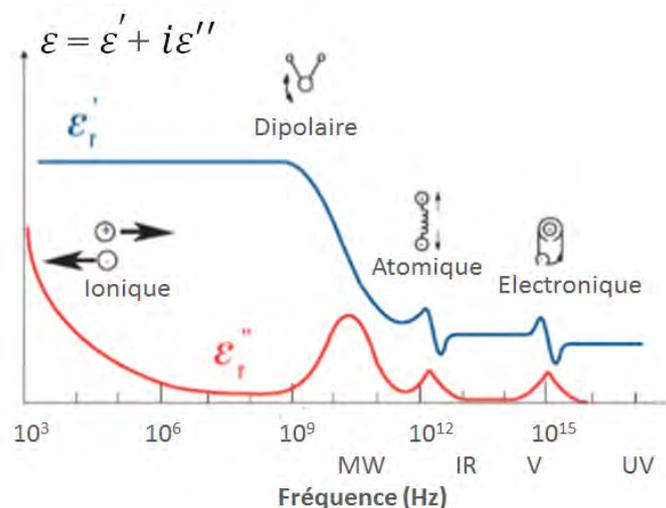


Figure 30: Evolution de la permittivité en fonction de la fréquence et mise en évidence des différents mécanismes de relaxation des matériaux diélectriques [146].

V.2.3 Conduction ionique

Les milieux biologiques apparaissent comme des matériaux à la fois conducteurs ioniques et diélectriques à perte. La présence des charges libres (les ions) dans les tissus biologiques rend possible la création des courants de conduction (de densité J_c). La mobilité de ces ions est fonction de la fréquence du champ appliqué. Le caractère diélectrique à perte des tissus biologiques se juge quant à lui par une partie imaginaire de la permittivité donnant naissance à un courant dit de déplacement (de densité J_d). La densité du courant dans le milieu résulte alors de la somme du courant de conduction et du courant de déplacement :

$$\vec{J} = \vec{J}_c + \vec{J}_d = \sigma E - j\varepsilon'' \frac{\delta E}{\delta t} = \sigma E + \omega \varepsilon'' E$$

Où σ représente la conductivité, ε_r la permittivité relative, et ε_0 la permittivité électrique du vide.

Afin d'homogénéiser la prise en compte des pertes, il est coutume en spectroscopie diélectrique d'intégrer dans la partie imaginaire de la permittivité la contribution des courant de conduction :

$$\sigma + \omega \varepsilon'' = \omega \varepsilon_{total}'' \rightarrow \varepsilon_{total}'' = \varepsilon'' + \frac{\sigma}{\omega} \rightarrow \varepsilon_{r total}'' = \varepsilon_r'' + \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega}$$

V.2.4 Modèle électrique d'une cellule

Ainsi, fort des propriétés diélectriques ($\varepsilon_r = \varepsilon_r' - j\varepsilon_r''$) des différents constituants aqueux d'une cellule (membrane, contenu intracellulaire, milieu extracellulaire), nous pouvons bâtir un modèle électrique équivalent d'une cellule biologique.

D'un point de vue électrique, la membrane est une couche isolante entourée des deux côtés par des solutions aqueuses d'électrolytes. Les protéines membranaires sont des molécules chargées électriquement et, comme tout élément porteur de charges, peuvent conduire un courant électrique. Cette propriété peut être schématisée par une conductance ou par une opposition au passage du courant, soit par une résistance (inverse de la conductance : $R = 1/g$). D'autre part, la bicouche lipidique constituée de phospholipides non conducteurs, donne à la membrane des propriétés capacitives, qui peuvent être représentées par un condensateur (deux éléments conducteurs séparés par un isolant) de capacité C_m :

$$C_m = \frac{\varepsilon_m \varepsilon_0}{e}$$

Avec e l'épaisseur de la membrane plasmique et ϵ_m sa permittivité relative.

De ce fait, la membrane cytoplasmique est souvent décrite comme un diélectrique. Les valeurs données dans la littérature sont de l'ordre de $\epsilon_{mem}=11\epsilon_0$ pour la permittivité relative, et de $\sigma_{mem}=10^{-8}$ S/m pour la conductivité [147]. La cellule peut être assimilée à un circuit électrique composé d'une capacité C_{mem} représentant la membrane (modélisation du phénomène de polarisation apparaissant à l'interface) reliée en série avec une résistance R_i représentant le milieu intracellulaire ou plutôt les charges libres internes à la cellule [148], [149]. Le milieu externe est symbolisé par une résistance R_m en parallèle avec une capacité C_m (Figure 31.a) [150]. La cellule est une structure hétérogène composée d'un cytoplasme (milieu interne noté i) de rayon R , entouré d'une membrane (notée mem) d'épaisseur d immergée dans un milieu externe (noté m) (Figure 31.b).

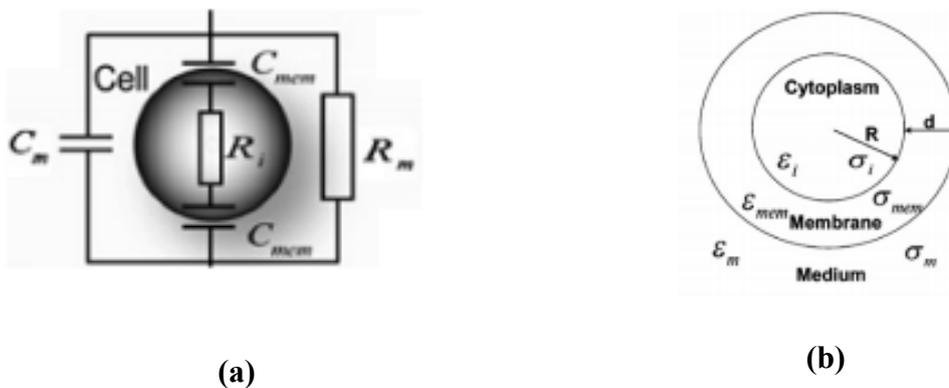


Figure 31: (a) Modèle de circuit équivalent pour une cellule en suspension [150], (b) Modèle monocouche d'une cellule de forme supposée sphérique.

V.3 Spectroscopie diélectrique

La complexité et l'inhomogénéité des matériaux biologiques (tissu ou cellule) ajoutent des niveaux supplémentaires de polarisation à celle décrite à la section V.2. En observant l'évolution des parties réelles de la permittivité et de la conductivité en fonction de la fréquence (Figure 32) [151], trois phénomènes de relaxation peuvent être mis en évidence : α , β et γ , plus une dispersion plus discrète δ se situant entre les dispersions β et γ . Ce phénomène de dispersion δ a été mis en évidence par Schwan [151].

La dispersion α intervient dans la gamme des basses fréquences, entre quelques hertz et quelques kilohertz. Elle est liée à l'apparition d'un courant électrique de surface lié à la conductivité ionique des milieux intra et extracellulaires. A ces fréquences, l'effet capacitif de

la membrane inhibe le passage du courant dans le milieu intracellulaire. Cette dispersion se traduit par une baisse de la permittivité tout en gardant une conductivité quasi constante.

La dispersion β intervient dans la gamme de fréquences de 0.1 à 100 MHz. L'orientation dipolaire des protéines dans les tissus à ces fréquences et le chargement capacitif de la membrane cellulaire, induisent ce type de dispersion [152]. A ces valeurs de fréquences, la membrane plasmique présente une impédance de plus en plus faible et les lignes de courant électrique pénètrent de plus en plus dans le milieu intracellulaire. Il en résulte donc une augmentation de la conductivité du milieu (intra et extracellulaire).

La dispersion γ surgit à la gamme de fréquence des microondes, de 0.1 à 100 GHz. Elle est associée à la relaxation dipolaire des molécules d'eau. A ces fréquences, la membrane devient diélectriquement transparente et le milieu intracellulaire est considéré comme une solution d'électrolyte.

Une faible dispersion δ peut se rajouter entre β et γ : elle résulte de la relaxation des molécules d'eau liées à des protéines, polypeptides, polysaccharides, etc.

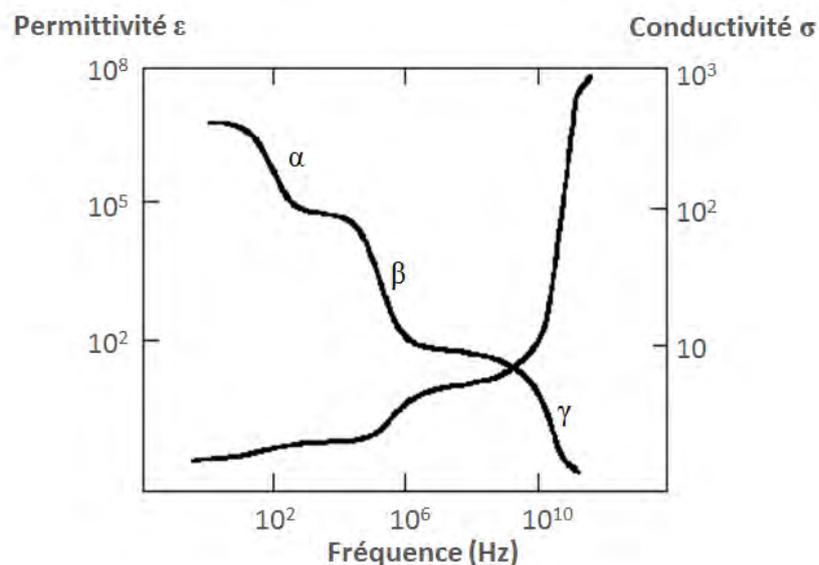


Figure 32: Permittivité et conductivité d'un tissu biologique typique en fonction de la fréquence [151].

Une solution aqueuse, une suspension cellulaire, du tissu biologique présentent des réponses spécifiques au champ électromagnétique, traduisant leurs capacités de stocker et de dissiper de l'énergie électromagnétique quand un champ électrique externe leur est appliqué. La spectroscopie diélectrique est donc l'étude de la réponse d'un matériau à un champ électrique oscillant à des fréquences variant sur une large plage. Un large intervalle fréquentiel allant de

10^{-6} à 10^{12} Hz est utilisé pour l'analyse diélectrique [105]. Vu l'étendue de cet intervalle, l'étude à basse fréquence diffère bien de celle à haute fréquence. En travaillant à basse fréquence, on peut mesurer les paramètres tensions/courants donc l'impédance, alors qu'à haute fréquence, la mesure des coefficients de réflexion et de transmission de l'onde électromagnétique permettent l'extraction des paramètres permittivité (dont la partie réelle est liée à la polarisabilité des molécules et atomes constituant le matériau et la partie imaginaire est liée au l'aptitude du matériau à dissiper l'énergie).

VI. Conclusions et objectifs du travail

Dans ce premier chapitre, nous avons introduit un phénomène extrêmement intéressant et prometteur aussi bien dans l'industrie que pour la clinique : l'électroporation cellulaire. Nous avons exposé ce qui est connu de ce phénomène et présenté les paramètres critiques de la perméabilisation cellulaire suite à l'application d'un champ électrique pulsé.

Malgré les progrès réalisés dans ce domaine, élargir nos connaissances sur le mécanisme de l'électroporation des cellules et de la cinétique associée à l'ECT reste un besoin pressant tant sur les plans théorique que pratique. En effet, l'électroporation affecte principalement l'organisation et la perméabilité des membranes cellulaires, mais elle pourrait aussi avoir des effets intracellulaires, qu'ils seraient intéressants de révéler pour mieux comprendre l'ensemble des phénomènes survenants. De plus, dans le cadre d'électrochimiothérapies, tous les patients ne répondent pas de la même manière. Pour cette raison, une nécessité d'évaluer l'efficacité de l'ECT, à des temps plus précoces, s'impose. Cela ouvrira une voie pour la médecine personnalisée contre le cancer, qui consiste à traiter chaque patient de façon individualisée en fonction des spécificités génétiques et biologiques de sa tumeur mais également en tenant compte de l'environnement du patient, de son mode de vie, etc.

L'évaluation de l'effet de l'EP sur les cellules (perméabilité et viabilité cellulaire) est essentiellement réalisée avec des techniques classiques telles que la microscopie optique (usage des marqueurs et des colorants), les tests biochimiques, etc. Ces méthodes sont performantes et efficaces mais s'avèrent laborieuses à mettre en œuvre: temps de préparation non négligeable, volumes utilisés conséquents, et invasion de l'échantillon étudié.

C'est pour cette raison, que de nouvelles méthodes biophysique sont toujours en voie de développement. Notamment, les techniques « Lab-on-chip » semblent être très prometteuses

vue leurs nombreux avantages qui contribuent à enrichir notre vision de la cellule tout en assurant facilité, reproductibilité et bas coût des études.

La mesure des propriétés diélectriques des échantillons biologiques est indéniablement attendue comme d'intérêt pour analyser à la fois la membrane et le contenu intracellulaire des cellules biologiques en fonction de la gamme de fréquences utilisée. Lors de l'utilisation de la spectroscopie diélectrique hyperfréquence (au-delà des centaines de MHz), la membrane devient transparente et c'est donc l'état interne de la cellule qui est révélé.

Le but de notre travail de thèse est de valider que les ondes hyperfréquences HF révèle effectivement les effets de l'EP sur les cellules vivantes, et cela en opérant dans le milieu de culture, sans marquage et sans contact.

Le chapitre 2 de ce manuscrit montrera la faisabilité de l'EP on chip, ce qui rejoint donc le principe du Lab-on-chip (intégration de plusieurs fonctionnalités sur un seul système).

Dans la dernière partie de notre travail, nous exploiterons un biocapteur microfluidique de spectroscopie diélectrique hyperfréquence, opérant au niveau de la cellule unique, permettant d'analyser et de suivre les effets intracellulaires de l'électroporation (sous différentes intensités de champ électrique) et de l'électrochimiothérapie sur des cellules vivantes.

VII. Références du Chapitre I

- [1] M. Perouansky, "The Overton in Meyer–Overton: a biographical sketch commemorating the 150th anniversary of Charles Ernest Overton's birth," *Br. J. Anaesth.*, vol. 114, no. 4, pp. 537–541, Apr. 2015.
- [2] P. A. Leventis and S. Grinstein, "The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 39, pp. 407–427, 2010.
- [3] G. M. Cooper, "Structure of the Plasma Membrane," 2000.
- [4] K. Simons and E. Ikonen, "Functional rafts in cell membranes," *Nature*, vol. 387, no. 6633, pp. 569–572, Jun. 1997.
- [5] K. Simons and D. Toomre, "Lipid rafts and signal transduction," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 31–39, Oct. 2000.
- [6] A. J. Laude and I. A. Prior, "Plasma membrane microdomains: organisation, function and trafficking," *Mol. Membr. Biol.*, vol. 21, no. 3, pp. 193–205, 2004.
- [7] B. Razani, S. E. Woodman, and M. P. Lisanti, "Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology," *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, no. 3, pp. 431–467, Sep. 2002.
- [8] K. Simons and R. Ehehalt, "Cholesterol, lipid rafts, and disease," *J. Clin. Invest.*, vol. 110, no. 5, pp. 597–603, Sep. 2002.
- [9] Z. Korade and A. K. Kenworthy, "Lipid rafts, cholesterol, and the brain," *Neuropharmacology*, vol. 55, no. 8, pp. 1265–1273, Dec. 2008.
- [10] L. J. Pike, "The challenge of lipid rafts," *J. Lipid Res.*, vol. 50, no. Suppl, pp. S323–S328, Apr. 2009.
- [11] E. Yamada, "Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. J Biophys. Biochem. Cytol. 1, 445-458," *ResearchGate*, vol. 1, no. 5, pp. 445–58, Sep. 1955.
- [12] T. V. Kurzchalia *et al.*, "VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles," *J. Cell Biol.*, vol. 118, no. 5, pp. 1003–1014, Sep. 1992.
- [13] K. G. Rothberg, J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, and R. G. Anderson, "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats," *Cell*, vol. 68, no. 4, pp. 673–682, Feb. 1992.
- [14] I. R. Nabi, "Cavin fever: regulating caveolae," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 789–791, Jul. 2009.
- [15] R. G. Parton and A. A. Richards, "Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms," *Traffic Cph. Den.*, vol. 4, no. 11, pp. 724–738, Nov. 2003.
- [16] D. A. Fletcher and R. D. Mullins, "Cell mechanics and the cytoskeleton," *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 485–492, Jan. 2010.
- [17] P. Janmey, "Chapter 17. Cell Membranes and the Cytoskeleton," *ResearchGate*, vol. 1, Dec. 1995.
- [18] "Cells." [Online]. Available: <http://course1.winona.edu/kbates/bio241/cells.htm>. [Accessed: 19-Dec-2016].
- [19] R. Stampfli, "Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node," *ResearchGate*, vol. 30, Jan. 1958.
- [20] A. J. H. Sale and W. A. Hamilton, "Effects of high electric fields on microorganisms," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 148, no. 3, pp. 781–788, Dec. 1967.
- [21] R. Benz, F. Beckers, and U. Zimmermann, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: A charge-pulse relaxation study," *J. Membr. Biol.*, vol. 48, no. 2, pp. 181–204, Jun. 1979.
- [22] J. Teissie and T. Y. Tsong, "Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 20, no. 6, pp. 1548–1554, Mar. 1981.
- [23] U. Zimmermann, G. Pilwat, and F. Riemann, "Dielectric Breakdown of Cell Membranes," in *Membrane Transport in Plants*, P.-D. D. U. Zimmermann and P. D. J. Dainty, Eds. Springer Berlin Heidelberg, 1974, pp. 146–153.

- [24] E. Neumann and K. Rosenheck, "Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes," *J. Membr. Biol.*, vol. 10, no. 3, pp. 279–290, Dec. 1972.
- [25] J. M. Crowley, "Electrical Breakdown of Bimolecular Lipid Membranes as an Electromechanical Instability," *Biophys. J.*, vol. 13, no. 7, pp. 711–724, Jul. 1973.
- [26] V. H. Pauly and H. P. Schwan, "Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale," *Z. Für Naturforschung B*, vol. 14, no. 2, pp. 125–131, 1959.
- [27] M.-P. Rols, M. Golzio, C. Delteil, and J. Teissié, "In Vitro Delivery of Drugs and Other Molecules to Cells," in *Electrochemotherapy, Electrogenotherapy, and Transdermal Drug Delivery*, vol. 37, New Jersey: Humana Press, 2000, pp. 83–97.
- [28] T. Kotnik, F. Bobanović, and D. Miklavčič, "Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—A theoretical analysis," *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 43, no. 2, pp. 285–291, Aug. 1997.
- [29] H. P. Schwan, "Electrical properties of tissues and cell suspensions: mechanisms and models," in *Proceedings of the 16th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 1994. Engineering Advances: New Opportunities for Biomedical Engineers, 1994*, pp. A70–A71 vol.1.
- [30] J. Teissié and M. P. Rols, "An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization," *Biophys. J.*, vol. 65, no. 1, pp. 409–413, Jul. 1993.
- [31] M. P. Rols and J. Teissié, "Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon," *Biophys. J.*, vol. 58, no. 5, pp. 1089–1098, Nov. 1990.
- [32] J.-M. Escoffre, T. Portet, L. Wasungu, J. Teissié, D. Dean, and M.-P. Rols, "What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues," *Mol. Biotechnol.*, vol. 41, no. 3, pp. 286–295, Mar. 2009.
- [33] J. Teissié, N. Eynard, B. Gabriel, and M. . Rols, "Electropermeabilization of cell membranes," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 3–19, Jan. 1999.
- [34] M.-P. Rols and J. Teissié, "Electropermeabilization of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration," *Biophys. J.*, vol. 75, no. 3, pp. 1415–1423, Sep. 1998.
- [35] M. Golzio, J. Teissié, and M.-P. Rols, "Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 3, pp. 1292–1297, Feb. 2002.
- [36] C. Rosazza, A. Buntz, T. Rieß, D. Wöll, A. Zumbusch, and M.-P. Rols, "Intracellular Tracking of Single-plasmid DNA Particles After Delivery by Electroporation," *Mol. Ther.*, vol. 21, no. 12, pp. 2217–2226, Dec. 2013.
- [37] G. J and M. Lm, "Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 261, no. 2, pp. 377–380, 1999 1999.
- [38] G. Pucihar, L. M. Mir, and D. Miklavcic, "The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electropermeabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy," *Bioelectrochemistry Amst. Neth.*, vol. 57, no. 2, pp. 167–172, Sep. 2002.
- [39] M. L. Yarmush, A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, and D. Miklavčič, "Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 16, pp. 295–320, Jul. 2014.
- [40] M. Tarek, "Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 6, pp. 4045–4053, Jun. 2005.
- [41] Z. A. Levine and P. T. Vernier, "Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation," *J. Membr. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 27–36, Jul. 2010.
- [42] J. Teissie, M. Golzio, and M. P. Rols, "Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1724, no. 3, pp. 270–280, Aug. 2005.
- [43] M. Casciola, M. A. Kasimova, L. Rems, S. Zullino, F. Apollonio, and M. Tarek, "Properties of lipid electropores I: Molecular dynamics simulations of stabilized pores by constant charge imbalance," *Bioelectrochemistry Amst. Neth.*, vol. 109, pp. 108–116, Jun. 2016.

- [44] S. Corovic, I. Lackovic, P. Sustaric, T. Sustar, T. Rodic, and D. Miklavcic, "Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation," *Biomed. Eng. Online*, vol. 12, p. 16, Feb. 2013.
- [45] K. S and N. E, "Ionic conductivity of electroporated lipid bilayer membranes.," *Bioelectrochemistry Amst. Neth.*, vol. 56, no. 1–2, pp. 163–166, 2002 2002.
- [46] M. Tokman, J. H. Lee, Z. A. Levine, M.-C. Ho, M. E. Colvin, and P. T. Vernier, "Electric field-driven water dipoles: nanoscale architecture of electroporation," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e61111, 2013.
- [47] D. Sel, D. Cukjati, D. Batiuskaite, T. Slivnik, L. M. Mir, and D. Miklavcic, "Sequential finite element model of tissue electroporation," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 52, no. 5, pp. 816–827, May 2005.
- [48] T. Portet *et al.*, "Destabilizing giant vesicles with electric fields: an overview of current applications," *J. Membr. Biol.*, vol. 245, no. 9, pp. 555–564, Sep. 2012.
- [49] T. Portet, C. Favard, J. Teissié, D. S. Dean, and M.-P. Rols, "Insights into the mechanisms of electromediated gene delivery and application to the loading of giant vesicles with negatively charged macromolecules," *Soft Matter*, vol. 7, no. 8, pp. 3872–3881, Apr. 2011.
- [50] C. Mauroy *et al.*, "Interaction between GUVs and cationic nanocontainers: new insight into spontaneous membrane fusion," *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 53, pp. 6648–6650, Jun. 2012.
- [51] A. Paganin-Gioanni, E. Bellard, J. M. Escoffre, M. P. Rols, J. Teissié, and M. Golzio, "Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 26, pp. 10443–10447, Jun. 2011.
- [52] G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavčič, and J. Teissié, "Kinetics of Transmembrane Transport of Small Molecules into Electroporated Cells," *Biophys. J.*, vol. 95, no. 6, pp. 2837–2848, Sep. 2008.
- [53] C. B. Arena, C. S. Szot, P. A. Garcia, M. N. Rylander, and R. V. Davalos, "A three-dimensional in vitro tumor platform for modeling therapeutic irreversible electroporation," *Biophys. J.*, vol. 103, no. 9, pp. 2033–2042, Nov. 2012.
- [54] L. Wasungu, J.-M. Escoffre, A. Valette, J. Teissie, and M.-P. Rols, "A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation," *Int. J. Pharm.*, vol. 379, no. 2, pp. 278–284, Sep. 2009.
- [55] L. Gibot and M.-P. Rols, "Progress and prospects: the use of 3D spheroid model as a relevant way to study and optimize DNA electrotransfer," *Curr. Gene Ther.*, vol. 13, no. 3, pp. 175–181, Jun. 2013.
- [56] S. Chabot, J. Teissié, and M. Golzio, "Targeted electro-delivery of oligonucleotides for RNA interference: siRNA and antimiR," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 81, pp. 161–168, Jan. 2015.
- [57] M. Golzio, J.-M. Escoffre, and J. Teissié, "shRNA-mediated gene knockdown in skeletal muscle," *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 798, pp. 491–501, 2012.
- [58] N. López, E. Puértolas, S. Condón, J. Raso, and I. Álvarez, "Enhancement of the solid-liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 42, no. 10, pp. 1674–1680, Dec. 2009.
- [59] "Pilot study of countercurrent cold and mild heat extraction of sugar from sugar beets, assisted by pulsed electric fields." [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877410004620>. [Accessed: 11-Jul-2016].
- [60] "Pulsed electric field treatment of apple tissue during compression for juice extraction." [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877400002351>. [Accessed: 11-Jul-2016].
- [61] Q. Hu *et al.*, "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances," *Plant J. Cell Mol. Biol.*, vol. 54, no. 4, pp. 621–639, May 2008.
- [62] M. D. A. Zbinden *et al.*, "Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 110, no. 6, pp. 1605–1615, Jun. 2013.
- [63] P. Y. Phoon, F. G. Galindo, A. Vicente, and P. Dejmek, "Pulsed electric field in combination with vacuum impregnation with trehalose improves the freezing tolerance of spinach leaves," *J. Food Eng.*, vol. 88, no. 1, pp. 144–148, Sep. 2008.

- [64] *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials*. New York, NY: Springer New York, 2009.
- [65] F. Pillet, C. Formosa-Dague, H. Baaziz, E. Dague, and M.-P. Rols, "Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 19778, Feb. 2016.
- [66] A. Taketo, "DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 949, no. 3, pp. 318–324, Mar. 1988.
- [67] H. Potter, "Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation," *Anal. Biochem.*, vol. 174, no. 2, pp. 361–373, Nov. 1988.
- [68] M. P. Rols, C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros, and J. Teissie, "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma," *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 168–171, Feb. 1998.
- [69] M. Cemazar, I. Wilson, G. U. Dachs, G. M. Tozer, and G. Sersa, "Direct visualization of electroporation-assisted in vivo gene delivery to tumors using intravital microscopy - spatial and time dependent distribution," *BMC Cancer*, vol. 4, p. 81, Nov. 2004.
- [70] L. M. Mir *et al.*, "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 8, pp. 4262–4267, Apr. 1999.
- [71] C. Faurie, M. Golzio, P. Moller, J. Teissié, and M.-P. Rols, "Cell and Animal Imaging of Electrically Mediated Gene Transfer," *DNA Cell Biol.*, vol. 22, no. 12, pp. 777–783, Dec. 2003.
- [72] L. M. Mir, P. H. Moller, F. André, and J. Gehl, "Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues," *Adv. Genet.*, vol. 54, pp. 83–114, 2005.
- [73] L. M. Mir, "Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future," *Mol. Biotechnol.*, vol. 43, no. 2, pp. 167–176, Oct. 2009.
- [74] A. I. Daud *et al.*, "Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 36, pp. 5896–5903, Dec. 2008.
- [75] M. Golzio *et al.*, "Observations of the mechanisms of electromediated DNA uptake--from vesicles to tissues," *Curr. Gene Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 256–266, Aug. 2010.
- [76] C. Faurie *et al.*, "Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation," *J. Gene Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 117–125, Jan. 2010.
- [77] J.-M. Escoffre *et al.*, "New insights in the gene electrotransfer process: evidence for the involvement of the plasmid DNA topology," *Curr. Gene Ther.*, vol. 12, no. 5, pp. 417–422, Oct. 2012.
- [78] A. Testori *et al.*, "Electrochemotherapy for cutaneous and subcutaneous tumor lesions: a novel therapeutic approach," *Dermatol. Ther.*, vol. 23, no. 6, pp. 651–661, Dec. 2010.
- [79] S. Orlowski, J. Belehradek, C. Paoletti, and L. M. Mir, "Transient electropermeabilization of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 37, no. 24, pp. 4727–4733, Dec. 1988.
- [80] M. P. Rols, Y. Tamzali, and J. Teissié, "Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report," *Bioelectrochemistry*, vol. 55, no. 1–2, pp. 101–105, Jan. 2002.
- [81] Y. Tamzali, L. Borde, M. P. Rols, M. Golzio, F. Lyazrhi, and J. Teissie, "Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study of 48 cases," *Equine Vet. J.*, vol. 44, no. 2, pp. 214–220, Mar. 2012.
- [82] L. M. Mir, S. Orlowski, J. Belehradek, and C. Paoletti, "Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses," *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 27, no. 1, pp. 68–72, 1991.
- [83] M. Marty *et al.*, "Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study," *Eur. J. Cancer Suppl.*, vol. 4, no. 11, pp. 3–13, Nov. 2006.
- [84] J. Gehl, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 177, no. 4, pp. 437–447, Apr. 2003.
- [85] V. Kodre, M. Cemazar, J. Pecar, G. Sersa, A. Cor, and N. Tozon, "Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours," *Vivo Athens Greece*, vol. 23, no. 1, pp. 55–62, Feb. 2009.

- [86] L. M. Mir *et al.*, "Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes," *EJC Suppl.*, vol. 4, no. 11, pp. 14–25, Nov. 2006.
- [88] A. N. Mirza *et al.*, "Radiofrequency ablation of solid tumors," *Cancer J. Sudbury Mass*, vol. 7, no. 2, pp. 95–102, Apr. 2001.
- [89] M. S. Sabel *et al.*, "Cryoablation of early-stage breast cancer: work-in-progress report of a multi-institutional trial," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 11, no. 5, pp. 542–549, May 2004.
- [90] G. Onik, P. Mikus, and B. Rubinsky, "Irreversible electroporation: implications for prostate ablation," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 6, no. 4, pp. 295–300, Aug. 2007.
- [91] K. R. Thomson *et al.*, "Investigation of the safety of irreversible electroporation in humans," *J. Vasc. Interv. Radiol. JVIR*, vol. 22, no. 5, pp. 611–621, May 2011.
- [92] R. V. Davalos, I. L. M. Mir, and B. Rubinsky, "Tissue ablation with irreversible electroporation," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 33, no. 2, pp. 223–231, Feb. 2005.
- [93] B. Al-Sakere *et al.*, "Tumor Ablation with Irreversible Electroporation," *PLoS ONE*, vol. 2, no. 11, Nov. 2007.
- [94] D. J. Dempsey and R. R. Thirucote, "Sterilization of Medical Devices: A Review," *J. Biomater. Appl.*, vol. 3, no. 3, pp. 454–523, Jul. 1988.
- [95] "'Plenty of room' revisited," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 12, pp. 781–781, Dec. 2009.
- [96] K. H. L. Chau, S. R. Lewis, Y. Zhao, R. T. Howe, S. F. Bart, and R. G. Marcheselli, "An Integrated Force-balanced Capacitive Accelerometer For Low-G Applications," in *The 8th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, 1995 and Eurosensors IX.. Transducers '95*, 1995, vol. 1, pp. 593–596.
- [97] L. Zimmermann *et al.*, "Airbag application: a microsystem including a silicon capacitive accelerometer, CMOS switched capacitor electronics and true self-test capability," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 46, no. 1, pp. 190–195, Jan. 1995.
- [98] J. G. Hanse, "Honeywell MEMS inertial technology product status," in *Position Location and Navigation Symposium, 2004. PLANS 2004*, 2004, pp. 43–48.
- [99] K. H. Kim, J. S. Ko, Y.-H. Cho, K. Lee, B. M. Kwak, and K. Park, "A skew-symmetric cantilever accelerometer for automotive airbag applications," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 50, no. 1, pp. 121–126, Aug. 1995.
- [100] R. Allen, "Thermodynamics and Hydrodynamics of Thermal Ink Jets," *ResearchGate*.
- [101] Y. Fujino, K. Kitagawa, T. Furukawa, and H. Ishii, "Development of vehicle intelligent monitoring system (VIMS)," 2005, p. 148.
- [102] W. O. Davis, R. Sprague, and J. Miller, "MEMS-based pico projector display," in *2008 IEEE/LEOS International Conference on Optical MEMs and Nanophotonics*, 2008, pp. 31–32.
- [103] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, Dec. 1979.
- [104] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 244–248, Jan. 1990.
- [105] N. Islam and S. Sayed, *MEMS Microfluidics for Lab-on-a-Chip Applications*. 2011.
- [106] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, Jul. 2006.
- [107] H. Andersson and A. van den Berg, "Microfluidic devices for cellomics: a review," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 92, no. 3, pp. 315–325, Jul. 2003.
- [108] C.-W. Huang *et al.*, "Efficient SNP Discovery by Combining Microarray and Lab-on-a-Chip Data for Animal Breeding and Selection," *Microarrays*, vol. 4, no. 4, pp. 570–595, Nov. 2015.
- [109] I. H. G. S. Consortium, "Finishing the euchromatic sequence of the human genome," *Nature*, vol. 431, no. 7011, pp. 931–945, Oct. 2004.
- [110] G. G. Nestorova and E. J. Guilbeau, "Thermoelectric method for sequencing DNA," *Lab. Chip*, vol. 11, no. 10, pp. 1761–1769, May 2011.

- [111] Y.-J. Chen, E. E. Roller, and X. Huang, "DNA sequencing by denaturation: experimental proof of concept with an integrated fluidic device," *Lab Chip*, vol. 10, no. 9, pp. 1153–1159, May 2010.
- [112] E. T. Lam *et al.*, "Genome mapping on nanochannel arrays for structural variation analysis and sequence assembly," *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, no. 8, pp. 771–776, Aug. 2012.
- [113] H. Cai *et al.*, "Optofluidic analysis system for amplification-free, direct detection of Ebola infection," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 14494, Sep. 2015.
- [114] S. Bouguelia *et al.*, "On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria," *Lab. Chip*, vol. 13, no. 20, pp. 4024–4032, Oct. 2013.
- [115] E. Lopez-Crapez, T. Livache, J. Marchand, and J. Grenier, "K-ras mutation detection by hybridization to a polypyrrole DNA chip," *Clin. Chem.*, vol. 47, no. 2, pp. 186–194, Feb. 2001.
- [116] A. Maitra *et al.*, "The Human MitoChip: a high-throughput sequencing microarray for mitochondrial mutation detection," *Genome Res.*, vol. 14, no. 5, pp. 812–819, May 2004.
- [117] D. Sefrioui *et al.*, "Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer," *Dig. Liver Dis.*, vol. 47, no. 10, pp. 884–890, Oct. 2015.
- [118] C. Parra-Cabrera, J. Samitier, and A. Homs-Corbera, "Multiple biomarkers biosensor with just-in-time functionalization: Application to prostate cancer detection," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 77, pp. 1192–1200, Mar. 2016.
- [119] F. Fan, H. Shen, G. Zhang, X. Jiang, and X. Kang, "Chemiluminescence immunoassay based on microfluidic chips for α -fetoprotein," *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 431, pp. 113–117, Apr. 2014.
- [120] B. Zheng, L. S. Roach, and R. F. Ismagilov, "Screening of Protein Crystallization Conditions on a Microfluidic Chip Using Nanoliter-Size Droplets," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 37, pp. 11170–11171, Sep. 2003.
- [121] J. G. E. Gardeniers and A. van den Berg, "Lab-on-a-chip systems for biomedical and environmental monitoring," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 378, no. 7, pp. 1700–1703, Apr. 2004.
- [122] X. F. Ni *et al.*, "On-chip differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes," *Microelectron. Eng.*, vol. 85, no. 5–6, pp. 1330–1333, May 2008.
- [123] C. Liu, T. Stakenborg, S. Peeters, and L. Lagae, "Cell manipulation with magnetic particles toward microfluidic cytometry," *J. Appl. Phys.*, vol. 105, no. 10, p. 102014, May 2009.
- [124] J. Chen, J. Li, and Y. Sun, "Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation," *Lab. Chip*, vol. 12, no. 10, pp. 1753–1767, Apr. 2012.
- [125] H. Shafiee, J. L. Caldwell, M. B. Sano, and R. V. Davalos, "Contactless dielectrophoresis: a new technique for cell manipulation," *Biomed. Microdevices*, vol. 11, no. 5, pp. 997–1006, Oct. 2009.
- [126] M.-H. Wu, S.-B. Huang, and G.-B. Lee, "Microfluidic cell culture systems for drug research," *Lab. Chip*, vol. 10, no. 8, pp. 939–956, Apr. 2010.
- [127] A. Doryab, G. Amoabediny, and A. Salehi-Najafabadi, "Advances in pulmonary therapy and drug development: Lung tissue engineering to lung-on-a-chip," *Biotechnol. Adv.*
- [128] H. Ben-Yoav, P. H. Dykstra, W. E. Bentley, and R. Ghodssi, "A controlled microfluidic electrochemical lab-on-a-chip for label-free diffusion-restricted DNA hybridization analysis," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 64, pp. 579–585, Feb. 2015.
- [129] L. Lind, J. Ärnlov, B. Lindahl, A. Siegbahn, J. Sundström, and E. Ingelsson, "Use of a proximity extension assay proteomics chip to discover new biomarkers for human atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 242, no. 1, pp. 205–210, Sep. 2015.
- [130] O. I. Berthuy, L. J. Blum, and C. A. Marquette, "Cells on chip for multiplex screening," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 76, pp. 29–37, Feb. 2016.
- [131] B. Eker, R. Meissner, A. Bertsch, K. Mehta, and P. Renaud, "Label-Free Recognition of Drug Resistance via Impedimetric Screening of Breast Cancer Cells," *PLOS ONE*, vol. 8, no. 3, p. e57423, Mar. 2013.
- [132] S. Gawad, L. Schild, and P. H. Renaud, "Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing," *Lab. Chip*, vol. 1, no. 1, pp. 76–82, Sep. 2001.

- [133] C. I. Trainito, E. Bayart, E. Bisceglia, F. Subra, O. Français, and B. L. Pioufle, "Electrorotation as a Versatile Tool to Estimate Dielectric Properties of Multi-scale Biological Samples: from Single Cell to Spheroid Analysis," in *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies*, T. Jarm and P. Kramar, Eds. Springer Singapore, 2016, pp. 75–78.
- [134] C. Polk and E. Postow, *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, Third Edition - 2 Volume Set*. CRC Press, 1995.
- [135] G. N. Stewart, "The relative volume or weight of corpuscles and plasma in blood," *J. Physiol.*, vol. 24, no. 5, pp. 356–373, Jul. 1899.
- [136] R. Höber, "Ein zweites Verfahren, die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen," *Pflüg. Arch. Für Gesamte Physiol. Menschen Tiere*, vol. 148, no. 4–5, pp. 189–221, Oct. 1912.
- [137] N. Tesla, "High frequency oscillators for electro-therapeutic and other purposes," *Proc. IEEE*, vol. 87, no. 7, p. 1282, Jul. 1999.
- [138] J. F. McClendon, W. the technical assistance of R. Rufe, and J. B. and F. Fetter, "Colloidal Properties of the Surface of the Living Cell II. Electric Conductivity and Capacity of Blood to Alternating Currents of Long Duration and Varying in Frequency from 260 to 2,000,000 Cycles Per Second," *J. Biol. Chem.*, vol. 69, no. 2, pp. 733–754, Aug. 1926.
- [139] C. Vedruccio, "Ultra High Frequency and Microwave Non-linear Interaction Device for Cancer Detection and Tissue Characterization," *ResearchGate*.
- [140] B. Rajewsky and H. Schwan, "Die Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit des Blutes bei ultrahohen Frequenzen," *Naturwissenschaften*, vol. 35, no. 10, pp. 315–316, Oct. 1948.
- [141] H. F. Cook, "Dielectric Behaviour of Human Blood at Microwave Frequencies," *Nature*, vol. 168, no. 4267, pp. 247–248, Aug. 1951.
- [142] K. R. Foster and H. P. Schwan, "Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review," *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 17, no. 1, pp. 25–104, 1989.
- [143] S. Gabriel, R. W. Lau, and C. Gabriel, "The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz," *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, no. 11, p. 2251, 1996.
- [144] C. Gabriel, S. Gabriel, and E. Corthout, "The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey," *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, no. 11, p. 2231, 1996.
- [145] M. R. Stoneman *et al.*, "Correction of electrode polarization contributions to the dielectric properties of normal and cancerous breast tissues at audio/radiofrequencies," *Phys. Med. Biol.*, vol. 52, no. 22, pp. 6589–6604, Nov. 2007.
- [146] "Agilent Basics of Measuring the Dielectric Properties of Materials. Application note." [Online]. Available: <http://docplayer.net/20857877-Agilent-basics-of-measuring-the-dielectric-properties-of-materials-application-note.html>. [Accessed: 21-Nov-2016].
- [147] H. Morgan, T. Sun, D. Holmes, S. Gawad, and N. G. Green, "Single cell dielectric spectroscopy," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 1, p. 61, 2007.
- [148] J. Gimsa, "Particle characterization by AC-electrokinetic phenomena: 1. A short introduction to dielectrophoresis (DP) and electrorotation (ER)," *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 149, no. 1–3, pp. 451–459, Apr. 1999.
- [149] H. Fricke, "The Electric Capacity of Suspensions of Red Corpuscles of a Dog," *Phys. Rev.*, vol. 26, no. 5, pp. 682–687, Nov. 1925.
- [150] T. Sun, S. Gawad, C. Bernabini, N. G. Green, and H. Morgan, "Broadband single cell impedance spectroscopy using maximum length sequences: theoretical analysis and practical considerations," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 18, no. 9, p. 2859, 2007.
- [151] H. P. Schwan, "Electrical properties of tissue and cell suspensions," *Adv. Biol. Med. Phys.*, vol. 5, pp. 147–209, 1957.
- [152] "Wiley: RF / Microwave Interaction with Biological Tissues - André Vander Vorst, Arye Rosen, Youji Kotsuka." [Online]. Available: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-047173277X.html>. [Accessed: 11-Jul-2016].

- [153] A. Schönhals and F. Kremer, “Broadband Dielectric Measurement Techniques (10-6 Hz to 1012 Hz),” in *Broadband Dielectric Spectroscopy*, P. D. F. Kremer and P.-D. D. A. Schönhals, Eds. Springer Berlin Heidelberg, 2003, pp. 35–57.

Chapitre II : Développement de l'Electroporation « On-Chip »

I. Introduction

L'étude bibliographique présentée dans le chapitre précédent nous a permis de montrer que l'électroporation est une méthode physique prometteuse, déjà utilisée en clinique humaine et dans l'industrie agroalimentaire. Nous avons également décrit des études montrant l'intérêt que peuvent avoir les microsystèmes et la miniaturisation dans le domaine de la biologie.

Dans ce contexte, nous présenterons dans ce chapitre notre travail visant à miniaturiser l'électroporation. Nous allons tirer profit d'un composant micrométrique développé au sein de l'équipe MH2F du LAAS-CNRS pour réaliser l'électroporation « on-chip ».

Ce chapitre est composé de quatre parties :

La première partie de ce chapitre sera dédiée à une revue des microsystèmes existants utilisés pour l'électroporation miniaturisée. Ils sont très nombreux, nous n'étudierons que quelques-uns.

Dans la deuxième partie, nous présenterons les différents dispositifs électriques et les matériels utilisés, ainsi que les différents protocoles mis au point afin d'effectuer l'électroporation « on-chip ».

Au cours de la troisième partie, nous présenterons l'architecture de nos microcomposants et les procédés de fabrication, réalisés au sein de la plateforme technologique du LAAS-CNRS.

Une présentation des résultats obtenus et des objectifs atteints sera faite lors de la dernière partie de ce chapitre. Après une étape d'expérimentations à l'échelle macrométrique (électroporation classique), nous présenterons nos résultats d'électroporation à l'échelle micrométrique tout en vérifiant la réussite de la perméabilisation et la préservation de la viabilité cellulaire.

II. L'électroporation « on-chip »

Au cours des deux dernières décennies, nous avons été témoins d'un développement massif de microsystèmes qui présentent une capacité d'interaction avec le vivant. Ces micro-laboratoires intègrent un grand nombre de fonctions sur le même composant et contribuent à

l'augmentation de l'efficacité et du rendement de certaines analyses médicales. La puce à ADN est un exemple très représentatif de l'importance de cette révolution [1]. Il existe également d'autres exemples, tels que la culture bactérienne sur puces [2], l'analyse du matériel biologique [3], [4], le tri de cellules sur puce [5], etc.

Comme déjà discuté lors du chapitre 1, les microtechnologies apportent plusieurs avantages dans le domaine de l'analyse de matériel biologique. Elles permettent notamment l'étude et l'analyse, de phénomènes connus ou nouveaux à une échelle de dimension micrométrique/cellulaire, voir même nanométrique/moléculaire.

Dans la littérature sur les laboratoires sur puce, il existe un grand nombre de travaux qui présentent des biomicrosystèmes intégrant des fonctions électriques, pour le traitement (ce chapitre) ou l'analyse (voir chapitre suivant), comme nous allons le voir. Les microsystèmes dédiés au traitement des cellules par l'électroporation tirent profit du changement d'échelle qui se traduit par de nombreux avantages par rapport à l'électroporation classique [6], [7], [8]. En effet, l'inconvénient majeur de la technologie d'électroporation classique est l'utilisation des champs électriques intenses (kV/cm), qui nécessite l'utilisation de haute tension (kV) aux échelles macroscopiques (cm). Les microsystèmes peuvent surmonter cet état du fait : une diminution des dimensions de 3 ordres de grandeur se traduit par une diminution d'un facteur 1000 de la tension nécessaire, réduisant le coût relativement élevé des générateurs d'impulsions à haute tension. D'autre part, l'augmentation de la température de la solution échantillon est un autre effet secondaire des systèmes classiques d'EP. En effet, l'application du champ électrique engendre un échauffement par l'effet Joule, ce qui peut, en plus de l'effet provoqué par l'EP elle-même, endommager thermiquement les cellules. Grâce à la miniaturisation, le risque potentiel l'échauffement peut être minimisé, la chaleur se dissipant plus efficacement et rapidement au sein du microcomposant en raison du grand rapport surface/volume (gain d'un facteur 1000 en passant d'une EP macroscopique -cm- à une EP « on-chip » - μm -). De plus, l'utilisation d'électrodes en or ou en platine diminue les effets électrochimiques engendrés par des électrodes en aluminium utilisées dans des cuvettes commerciales. Les microdispositifs d'électroporation peuvent enfin induire et contrôler l'électroporation au niveau de la cellule unique, ce qui est particulièrement promettant pour la compréhension plus poussée des mécanismes sous-jacents.

Dans la suite de cette section, nous allons donner un aperçu non-exhaustif des microsystèmes développés pour réaliser l'électroporation cellulaire.

Il existe une grande variété de microcomposants conçus pour l'électroporation et développés au cours de ces vingt dernières années, depuis que Murakami et al. ont utilisé un système micrométrique pour électrotransférer des œufs fécondés de poissons en 1994 [9]. Les applications envisagées sont très variées, et à travers cette partie, nous citerons notre étude bibliographique sur des composants récemment développés et dédiés aux applications biomédicales.

Une multitude de composants micrométriques a été conçue dans le but de rendre plus performant et plus rapide le choix des différentes conditions à utiliser pour l'électroporation de cellules. Rubinsky et al ont développé le premier microcomposant dans lequel des cellules peuvent être électroporées individuellement [7], [10], [11]. Les cellules sont incorporées dans le microcomposant et capturées grâce à une différence de pression entre deux canaux, les attirant ainsi vers les micro-orifices du composant. L'information en temps réel de la perméabilisation membranaire est obtenue d'une part en visualisant les cellules sous microscope et d'autre part en mesurant les courants traversant le composant, et donc les cellules. Dans leurs expériences, les courants électriques qui traversent des cellules vivantes et des cellules électroporées sont significativement différents. Cela fournit ainsi des informations d'une manière simple, quantitative et instantanée sur la viabilité cellulaire.

Plusieurs équipes se sont alors penchées sur la réalisation de systèmes plus complexes et permettant le traitement et l'analyse d'un plus grand nombre de cellules. A titre d'exemple, He et al [12] ont développé une matrice de capture et d'électroporation de cellules comme montré dans la Figure 33. Grâce à ce système, ils ont déterminé les paramètres électriques optimaux en termes d'intensité du champ électrique et durée d'impulsions, pour transférer différents types de molécules dans des cellules HeLa [13] et cela en réduisant les temps d'étude, par le criblage rapide facilité par les microtechnologies.

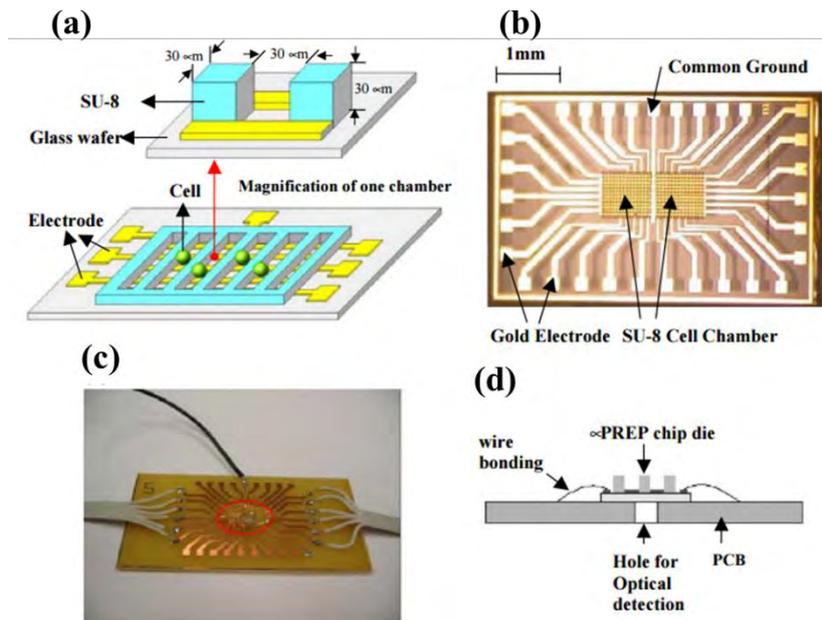


Figure 33: Microsystème intégré pour l'électroporation de cellules μ PREP. (a) Schéma 3D du microcomposant. (b) Image du système. Les électrodes verticales sont utilisées pour l'application des champs électriques perméabilisants alors que les électrodes horizontales sont utilisées pour détecter le courant durant l'électroporation. (c) Système final empaqueté. (d) Schéma du système final empaqueté pour la détection optique [12].

La plupart des microcomposants pour l'EP sont conçus pour des cellules en suspension. Cependant, comme la majorité des cellules doivent adhérer sur une surface solide pour croître, des dispositifs destinés aux cellules adhérentes ont été développés. La Figure 34.a présente une puce en silicium avec un ensemble de 60 microélectrodes cylindriques en or, ayant la taille de la cellule, pour électroporer les cellules se développant sur ces électrodes. Chaque électrode est adressée de manière indépendante par un programme LabVIEW. L'état de chaque cellule est déterminé par mesure de l'impédance cellule / électrode [14]. Un autre exemple d'électroporation de cellules adhérentes est décrit à la Figure 34.b. La puce, développée par [15], est construite par la fixation d'un insert de membrane microporeuse d'alumine (taille de pores $0,02 \mu\text{m}$) sur un film PDMS qui comporte un ou plusieurs trous. Cette puce est ensuite placée entre deux électrodes planes pour l'EP. Le champ électrique se concentre au niveau des trous du film de PDMS, provoquant l'électroporation sélective des cellules localisées au-dessus des trous. La taille des trous contrôle le champ électrique.

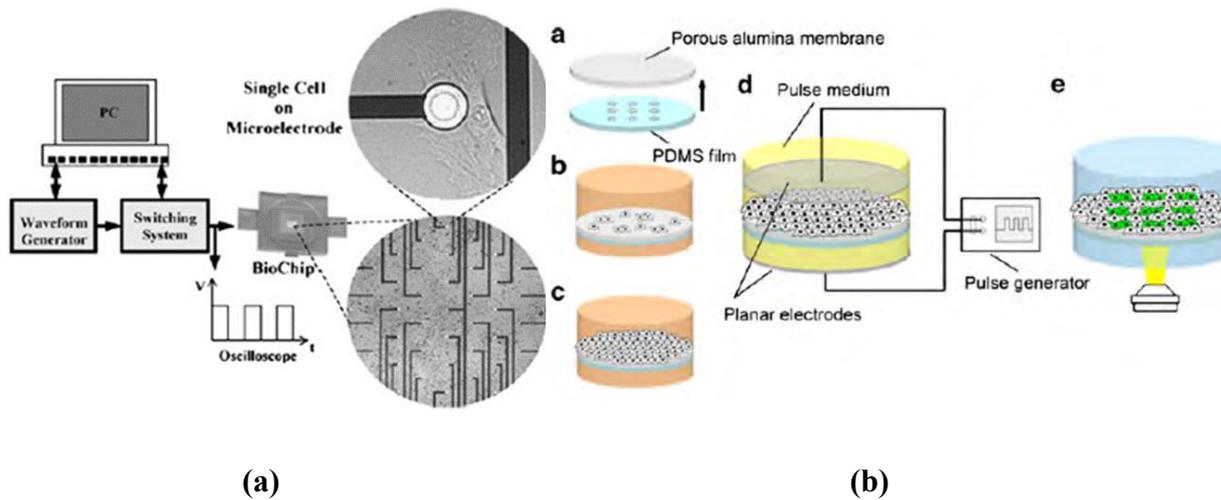


Figure 34: Exemples de microcomposants pour électroporation de cellules adhérentes. (a) système de microélectrodes circulaires en or [14], (b) Electrodes planaires 3D [15].

D'autres dispositifs ont été conçus pour induire une électroporation irréversible, phénomène qui, comme nous l'avons vu précédemment, trouve plusieurs applications dans le domaine de la recherche biologique et médicale. L'IRE peut être utilisée dans les domaines du traitement du cancer, de l'industrie alimentaire et du diagnostic clinique. Cette dernière application se base sur l'extraction efficace et l'analyse subséquente des composants intracellulaires qui représentent des substances clés contenant des informations sur les caractéristiques génétiques et les maladies [16]. Jusqu'à présent, divers dispositifs microfluidiques effectuant la lyse cellulaire par électroporation ont été proposés [17], [18], [19], [20], [21]. Lee et al [22] ont développé un dispositif de lyse cellulaire à une faible tension faible continue, réalisant l'électroporation des cellules. Ils ont mis en place un rétrécissement des micro-canaux afin de générer un champ électrique localisé et intense engendrant la lyse des globules rouges. Un autre type de microcomposants a été reporté par Jen et al. [23]. Ils présentent une puce microfluidique à micropuits de 30 μm de diamètre (Figure 35), dans lesquels ils effectuent un suivi de la lyse cellulaire d'une cellule unique. Ce type de dispositifs peut être intéressant par exemple pour le suivi des niveaux des protéines ou d'activités enzymatiques au niveau de la cellule unique.

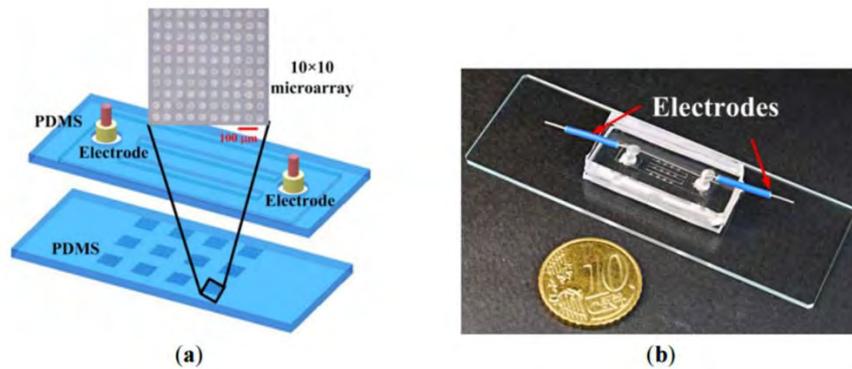


Figure 35: (a) Schéma du composant microfluidique proposé pour les biopuces à cellules uniques; (b) Photo du composant rassemblé [23].

Parmi les différents microdispositifs pour électroporation, les électrodes planaires 2D sont généralement utilisées pour effectuer la lyse des cellules, ce qui conduit néanmoins à une grande non-uniformité du champ électrique. Pour surmonter cela, Lu et al. [24] ont conçu des électrodes cylindriques comme le montre la Figure 36. Ils ont étudié l'effet de ces électrodes 3D sur le taux de lyse cellulaire, et ont trouvé que ce dernier augmente jusqu'à 30%, un vrai gain d'efficacité comparé aux 8% obtenus avec les électrodes 2D planaires.

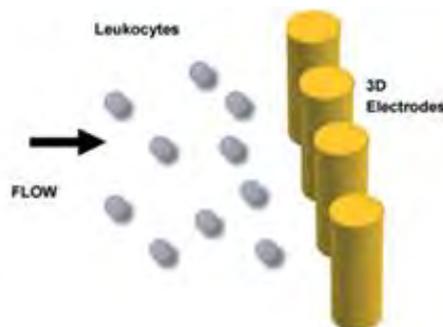


Figure 36: Schématisation des leucocytes approchant des électrodes 3D. Le diamètre et la hauteur de chaque électrode sont de 50 μm [24].

L'électroporation réversible quant à elle, est largement utilisée dans le domaine de la transfection cellulaire. Cependant, les protocoles de traitement ne sont pas toujours bien adaptés à chaque type cellulaire, nécessitant des impulsions électriques de longue durée (ms) avec des champs électriques relativement faibles, qui peuvent affecter un grand nombre de cellules. De plus, les cellules exposées au champ électrique peuvent être affectées à cause des substances solubilisées à partir des électrodes, tel que Al^{3+} pour des électrodes en aluminium [25]. Dans les dispositifs microfluidiques, ces problèmes sont solutionnés et l'on peut efficacement optimiser l'efficacité de la transfection. Plusieurs systèmes microfluidiques ont été publiés, certains visant la transfection de la cellule unique, et d'autres la transfection d'un grand nombre

de cellules à la fois [26], [27]. Les premiers composants représentaient, néanmoins, des versions miniaturisées des systèmes d'électroporation conventionnels [8], [28]. Malgré un manque de contrôle durant l'expérience d'électroporation, les résultats ont démontré le potentiel de la microfabrication dans la réduction de la tension utilisée et l'amélioration de l'efficacité de l'électroporation et de la viabilité des cellules. En effet, Lin et al. [29], [30] ont mis en place un composant microfluidique fabriqué sur un substrat en verre avec des électrodes interdigitées (Figure 37.a), permettant de transférer des cellules adhérentes par le champ électrique (Figure 37.b). Leurs travaux montrent un taux de transfection entre 13 et 36% pour des tensions allant de 2 à 8 V, avec un taux de viabilité pour la tension la plus élevée de 39%, comparables aux expériences d'électroporation « classique ».

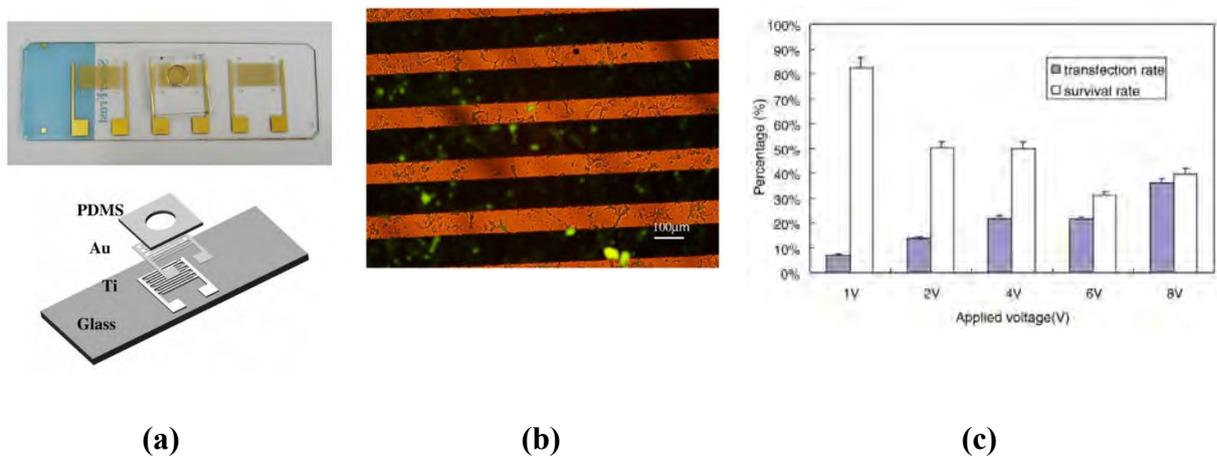


Figure 37 (a) Image globale et détaillée du microcomposant, (b) Image de cellules HUVEC transfectées (GFP) avec 2 impulsions à 6 V sur le composant, (c) Comparaison du taux de transfection et de viabilité des HUVEC après application des impulsions électriques [29].

Quant à Huang et Rubinsky [31], ils ont utilisé le microdispositif déjà conçu en 1999 et évoqué ultérieurement, pour réaliser la transfection d'une cellule unique (Figure 38). Après injection dans le microcanal, la cellule est véhiculée dans le canal microfluidique par force hydrodynamique, électroporée (10 V, 100 ms) en présence du gène de la « enhanced green fluorescent protein EGFP », avant de ressortir de l'autre côté du microcanal.

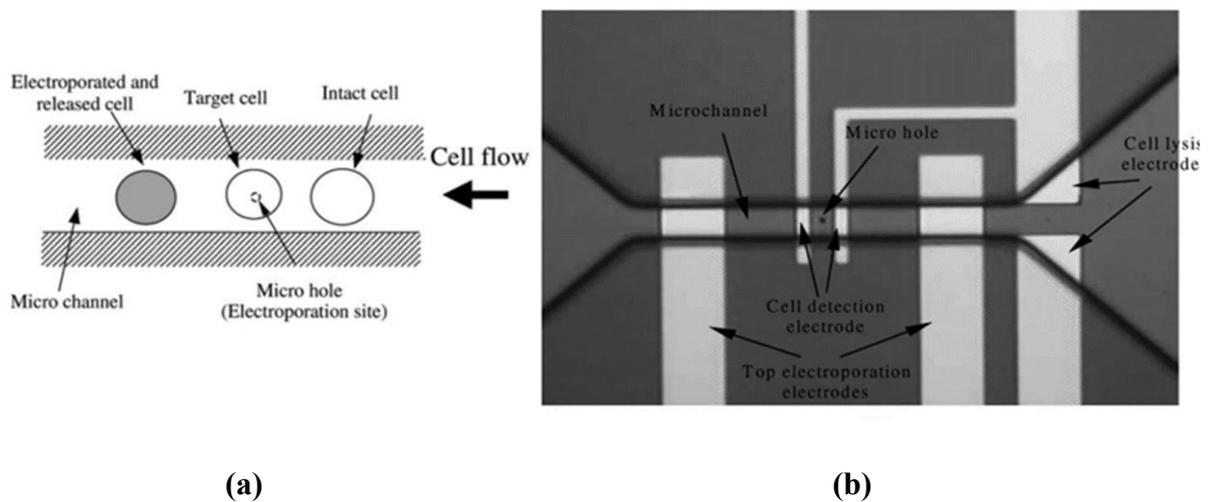


Figure 38: Concept de la puce microfluidique pour micro-électroporation, (b) Image de la disposition des micro-trous, du micro-canal et des électrodes intégrées [31].

La plupart des travaux se basant sur la miniaturisation des systèmes d'électroporation se sont majoritairement focalisés sur les applications de lyse cellulaire et de transfection génique. Toutefois, il existe quelques chercheurs qui se sont intéressés à étudier l'ECT en exploitant les microtechnologies. En effet, l'électrochimiothérapie représente l'une des applications les plus prometteuses de l'électroporation. Les études *in vitro* sur des cellules traitées par ECT sont considérées comme une étape incontournable dans la recherche et son application clinique : il faut correctement évaluer l'effet de différentes conditions de traitement, suivant la spécificité du type cellulaire comme le type et la concentration de la drogue, les conditions électriques d'EP ainsi que d'autres facteurs environnementaux. Dans ce but, Choi et al. [32] ont développé un microcomposant (Figure 39.a) dédié à l'étude de l'électrochimiothérapie, en miniaturisant l'électropulsateur largement utilisé en clinique. Ils ont transformé les électrodes en aiguille (« needle electrodes ») en électrodes planaires en 2D, en préservant la bonne distribution du champ électrique. Tous les essais ont été conduits sur ce même microcomposant, ayant 6 sites d'électroporation : allant de la culture cellulaire, passant par l'électroporation et finissant par l'évaluation des effets consécutifs à l'ECT. Cette évaluation se fait en se servant de molécules fluorescentes (tel que le CellTrackerTM green) et de la microscopie, comme le montre la Figure 39.b.

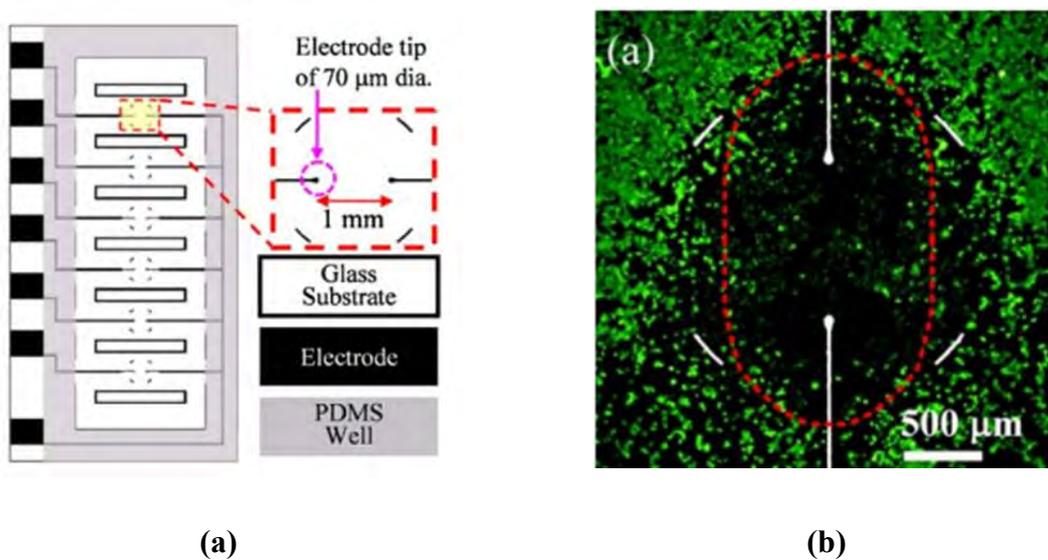


Figure 39: (a) Représentation schématique du microcomposant développé par Choi et al, (b) Distribution des cellules vivantes marquées avec CellTracker™ green, 48h après le traitement avec ECT (pulses à 1 kV/cm, 5×10^{-6} M de bléomycine) [32].

De la même manière, un autre exemple des microcomposants conçus pour l'ECT est le travail de Wu et al. [33]. Ils ont développé un microcomposant (Figure 40.a et Figure 40.b) utilisable pour déterminer les paramètres optimaux pour l'ECT *in vitro* d'une manière rapide, une étape cruciale avant de passer aux applications *in vivo*. En comparant les cellules soumises à EP seule (100 V) à la Figure 40.c à celles traitées à l'ECT (100 V + 10^{-4} M de bléomycine) à la Figure 40.d, ils ont trouvé que les cellules sont endommagées, à proximité des électrodes, par l'effet combiné du champ électrique et de la molécule chimiothérapeutique.

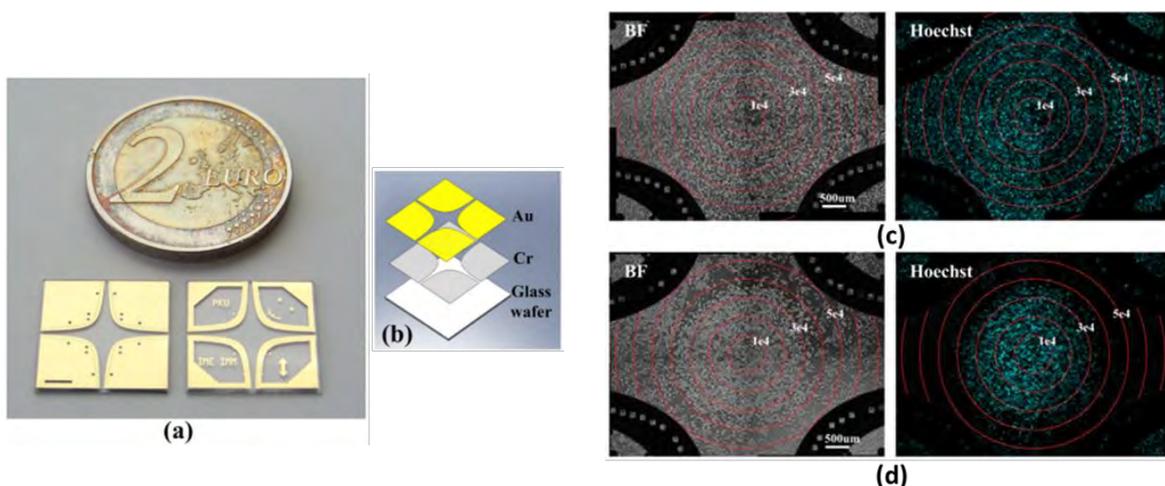


Figure 40: (a) La photo du microcomposant proposé par Wu et al. (b) Vue schématique détaillée du microcomposant, (c) et (d) Images en lumière blanche et en fluorescence avec Hoechst des cellules MCF-7 soumises à EP seul (100 V) ou à ECT (100 V+ 10^{-4} M de bléomycine) [33].

En s'inspirant de ces travaux, nous avons décidé de tirer profit d'un microcomposant existant, développé au sein de l'équipe MH2F par Tong CHEN [34], dans le but de l'employer et d'optimiser les conditions de sa mise en œuvre pour un autre type d'application que celui prévu au moment de sa conception : l'électroporation « on-chip ». L'objectif étant de démontrer, qu'un composant développé pour la spectroscopie diélectrique hyperfréquence et intégré par les micro-technologies du LAAS-CNRS, permet une électroporation efficace à l'échelle cellulaire.

III. Matériels et méthodes

Ce paragraphe décrit l'ensemble de dispositifs et de matériels utilisés ainsi que les différents protocoles mis en œuvre pour nos expériences.

III.1 Culture cellulaire

Les cellules HCT-116 (ATCC # CCL-247) sont des cellules humaines épithéliales à haute capacité proliférative, dérivant d'un cancer colorectal. Elles sont cultivées sur flacons de culture dans le milieu de culture « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenant 4,5 g/L de glucose, L-glutamine et pyruvate et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et un mélange pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL). Le passage des cellules est réalisé tous les deux ou trois jours, lorsque les cellules atteignent la confluence. Elles sont utilisées jusqu'au vingtième passage. Au-delà, une nouvelle ampoule à faible passage est décongelée.

III.2 Electroporation classique macrométrique

Dans ce travail, nous nous intéressons aux applications cliniques de l'électroporation. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec les paramètres électriques suivants :

- ✓ Amplitude du champ électrique : 0.2 kV/cm à 1.4 kV/cm
- ✓ Durée des impulsions : 100 µs
- ✓ Fréquence des impulsions : 1 Hz
- ✓ Nombre des impulsions : 8.

Durant les expériences, nous avons utilisé deux types de générateurs de tension, adaptés aux deux types d'applications :

- Macrométrie : générateur classiquement utilisé lors d'expériences en laboratoire et en clinique
- Micrométrie : générateur associé à notre microcomposant et adapté à l'électroporation on-chip (dans le paragraphe suivant).

Lors du choix du générateur, il faut prendre en compte un certain nombre de caractéristiques : l'amplitude, la durée des impulsions et leur fréquence de répétition. Tout au long des expérimentations, nous utiliserons des paramètres électriques préalablement optimisés, pour perméabiliser de façon efficace et non délétère les cellules : 8 impulsions, de durée de 100 μ s, appliquées à une fréquence de 1 Hz.

En électroporation classique, les impulsions électriques sont délivrées par un générateur d'impulsions haute tension unipolaire (ELECTRO cell S20) de Betatech (France), grâce à des électrodes planes et parallèles en acier inoxydable espacées de 4 mm (Figure 41). Les impulsions sont visualisées sur un écran LCD grâce à un logiciel intégré de pilotage des impulsions. Ce générateur peut délivrer de 1 à 10000 impulsions, de 0 à 2000 V pour des durées de 5 à 50000 μ s. La fréquence de répétition peut varier de 0.1 Hz à 1 kHz.



(a)



(b)

Figure 41: Photo du système d'électroporation macrométrie (a) le générateur ELECTRO cell S20 de Betatech, et (b) les électrodes en acier inoxydable.

III.3 Détermination de la perméabilité

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre et incubées pendant 24 heures à 37°C sous 5% de CO₂. Après aspiration du milieu de culture, 1 ml de milieu de pulsation est ajouté en présence de 0,1 mM de l'iodure de propidium (PI). Les impulsions électriques sont alors délivrées avec le générateur Betatech dans la gamme (0-2

kV/cm). Le PI (P4170 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, λ_{max} excitation = 493 nm, λ_{max} émission = 617 nm), est une petite molécule (668 Dalton) non perméante utilisée pour mettre en évidence l'électroporabilité. Elle s'intercale dans les acides nucléiques (ADN ou ARN) des cellules électroporabilisées. La composition du milieu de pulsation ZAP est la suivante : 8.1 mM K_2HPO_4 , 1.9 mM KH_2PO_4 , 1 mM $\text{MgCl}_2/6\text{H}_2\text{O}$, 250 mM Saccharose, pH 7,4). Cette composition faiblement ionique le rend faiblement conducteur et donc bien adapté à l'électroporation, réduisant les effets induits sur la viabilité cellulaire. Lors de l'application du champ électrique, la membrane est déstabilisée ce qui facilite la pénétration du PI et son interaction avec le noyau. Le rendement quantique du PI augmente de plusieurs Log lorsqu'il s'intercale dans l'ADN, ce qui en fait un excellent marqueur de perméabilisation. Les cellules dans lesquelles le PI est détecté sont perméabilisées. Les photos sont prises sur plusieurs plans, en lumière blanche et en fluorescence à l'aide du microscope DMIRB-Cool Snap FxHQ2 et le pourcentage des cellules positives est obtenu par simple comptage. Afin d'estimer le temps de refermeture des pores (« resealing ») après EP, les cellules sont incubées après électroporation pendant différentes durées avant d'ajouter l'iodure de propidium et d'analyser les résultats au microscope.

III.4 Détermination de la viabilité

III.4.1 Test de clonogénicité

Ce test de survie par clonogénie a été décrit pour la première fois en 1956, par Puck et Marcus [35]. Ils ont mis au point ce test d'évaluation de la capacité d'une cellule unique à former une colonie. Une cellule qui conserve sa capacité de synthétiser des protéines et qui passe par une ou deux mitoses, mais qui est incapable de se diviser au-delà et de former une colonie n'est pas une cellule viable. La capacité d'une seule cellule à former une colonie est la preuve qu'elle a conservé sa capacité à se reproduire. Ce test de clonogénicité est le test de viabilité par excellence. Néanmoins, il est fastidieux car il nécessite plusieurs jours de culture. Il est utilisé pour un large nombre d'études avec différents types cellulaires (cellules normales, cellules souches [36], cellules provenant des tumeurs d'animaux [37], etc.

III.4.2 Test de comptage cellulaire

Pour estimer la viabilité cellulaire des cellules cultivées en monocouche après électroporation, nous utilisons aussi une autre approche de comptage du nombre de cellules adhérant au support (les cellules mortes ne sont plus capables d'adhérer au support duquel elles se détachent). Après l'application du champ électrique, le milieu de pulsation ZAP est remplacé

par le milieu de culture et les cellules sont remises dans l'incubateur pour 24 heures (un temps qui correspond au temps de génération de la lignée cellulaire utilisée). Plusieurs zones de la boîte de Pétri sont observées en contraste de phase dans la zone de pulsation à l'aide du microscope Leica DMRIB. La viabilité cellulaire est alors déterminée par comptage du nombre de cellule par plan en comparaison à la condition où les cellules n'ont pas été traitées (contrôle négatif).

De même, afin d'évaluer le taux de viabilité cellulaire après électroporation sur le microcomposant, nous procédons à un comptage du nombre de cellules 24 heures post EP. Nous considérons que la présence des cellules dans la zone de pulsation 24 heures après EP est un signe de leur résistance au champ électrique.

Enfin, à travers la partie qui suivra, nous allons voir brièvement l'architecture, la fabrication ainsi que la mise en œuvre de notre microcomposant.

IV. Microcomposant électro-microfluidique

Dans ce chapitre, les composants utilisés sont ceux conçus et développés par Tong CHEN [34] et fabriqués dans la salle blanche du LAAS-CNRS. Cette fabrication s'appuie sur les procédés traditionnels de microtechnologie, tels que la photolithographie, la gravure, le dépôt des films, etc. La biocompatibilité des matériaux utilisés représente le premier critère à respecter, mais aussi, une transparence du support (substrat) permettant une visualisation sous les microscopes inversés. Pour ces raisons, un substrat en quartz, des canaux microfluidiques en SU-8 et des électrodes en or ont été choisis. En effet, l'or est largement inerte, biocompatible et employé dans diverses applications biomédicales. Quant à la résine SU-8, c'est un matériau très utilisé et donc maîtrisé en microfluidique.

1) Architecture du microcomposant

La Figure 42 présente le microcomposant avec les électrodes interdigitées, entre lesquelles des impulsions de champ électrique sont appliquées. La Figure 43 et le Tableau 1 résument les dimensions du composant.

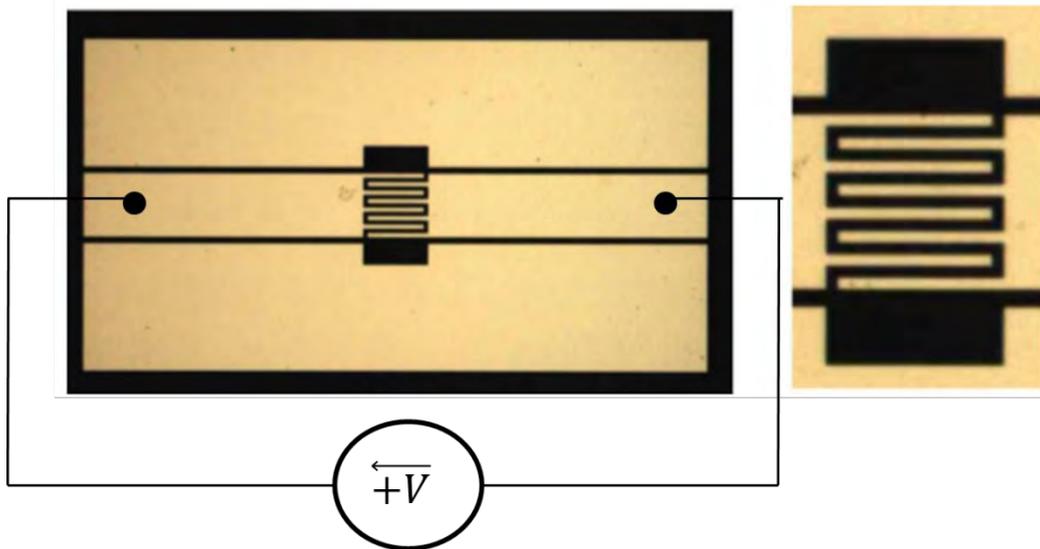


Figure 42: Le circuit électrique : Photographie du microcomposant avec les électrodes interdigitées (gauche) et zoom sur les électrodes (droite).

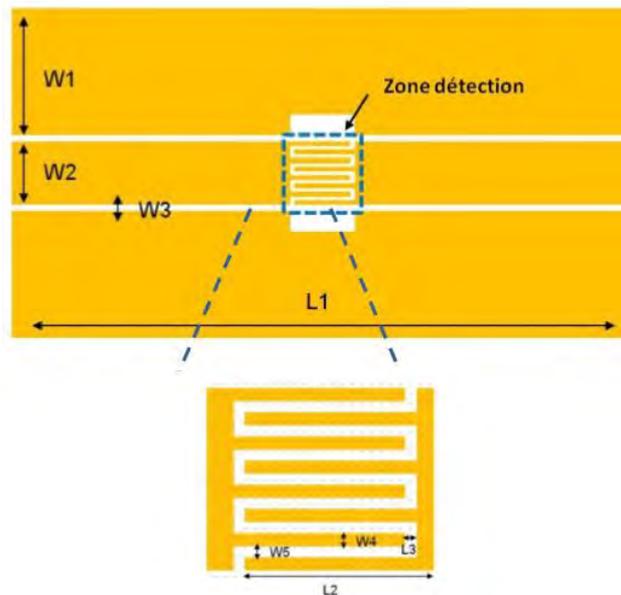


Figure 43: Schéma du microcomposant formé des lignes coplanaires avec un zoom sur les électrodes interdigitées.

Tableau 1: Valeurs des différentes dimensions du composant.

	L1	L2	L3	W1	W2	W3	W4, W5
Valeurs (μm)	1450	140	10	300	150	15	10
Dispersion (μm)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

2) Technologie de fabrication du microcomposant

Le biocapteur est constitué de deux parties bien distinctes : le circuit hyperfréquence avec le guide d'onde coplanaire métallique en or et le canal microfluidique avec des murs fabriqués d'une résine photosensible négative : la SU-8.

- 1- Le circuit hyperfréquence est un guide d'onde coplanaire dont la configuration se présente en 3 électrodes : masse - signal - masse. Les pointes de mesure permettent la connexion entre ces électrodes et l'analyseur de réseau vectoriel. Les ondes hyperfréquences sont alors délivrées et mesurées en transmission et en réflexion.
- 2- Le canal microfluidique est constitué de murs en SU-8.

Par la suite, je vais résumer les différentes parties de la fabrication qui se décomposent en deux étapes principales :

- La fabrication du circuit HF coplanaire de détection
- L'élaboration du canal microfluidique réalisé de la résine SU-8.

La première étape dans le processus de la fabrication consiste à mettre en place le guide d'onde coplanaire dont la zone de détection est rétrécie pour être compatible avec la taille d'une cellule unique ($\sim 12 \mu\text{m}$). La Figure 44 résume les différentes étapes nécessaires pour le fabriquer et le mettre en place. Le substrat choisi pour cette étape est le quartz. Il présente plusieurs propriétés intéressantes, qui le rendent approprié pour ce type d'applications. La transparence du quartz peut être importante pour les systèmes de manipulation des fluides ou des particules, où l'observation visuelle des objets biologiques présente un intérêt. De plus, la propriété isolante du quartz peut être avantageuse, surtout pour les dispositifs dans lesquels aucun courant de fuite entre les métallisations ne doit exister [38].

Afin d'obtenir notre guide d'onde, la photolithographie représente la technique clé : c'est un processus qui vise à transférer des motifs prédéfinis présents sur un masque à l'aide de la lumière Ultraviolet UV, vers le substrat. Après nettoyage et séchage du substrat et du masque, une résine NLOF est déposée sur le substrat, cette résine facilitera l'élimination des éléments indésirables à la fin de la fabrication. A l'aide du masque correspondant aux circuits désirés et après exposition aux UV, les motifs sont maintenant définis sur la résine. Cette dernière est ensuite développée par un solvant spécifique. Ensuite, un dépôt de la couche métallique (en or) par-dessus de la résine est établi. Ceci est fait par évaporation de manière à avoir une couche

de 300 nm d'épaisseur. Le choix de l'or pour former nos électrodes se base sur sa bonne conductivité électrique, sa biocompatibilité [39] et sa faible réactivité chimique. La dernière étape de cette fabrication consiste à éliminer les parties indésirables par un bain d'acétone qui attaque la résine : c'est le procédé lift-off. Les guides d'onde sont alors prêts à être rassemblés après un dernier lavage à l'eau DI.

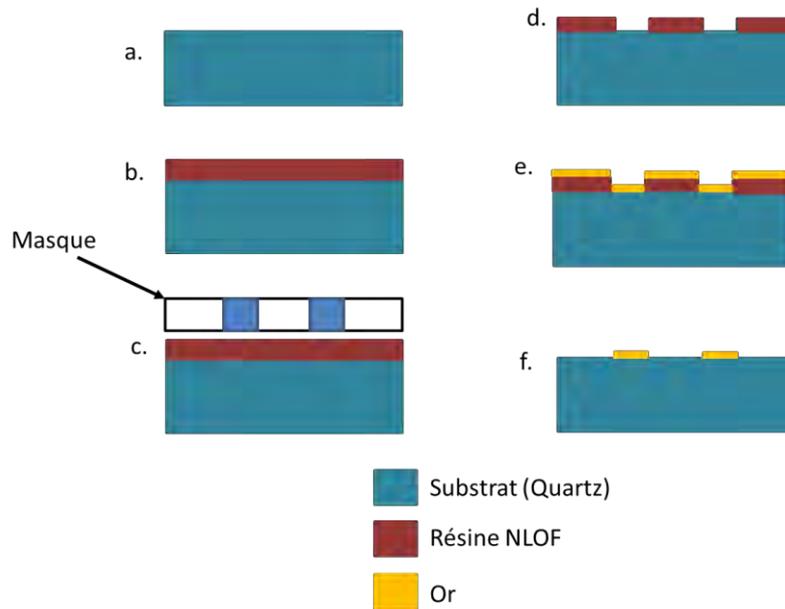


Figure 44: Procédure de fabrication du guide d'onde coplanaire par la photolithographie, (a) Nettoyage du substrat, (b) Dépôt de la résine photosensible, (c) Photolithographie par UV, (d) Développement de la résine, (e) Évaporation du métal, (f) Suppression de la résine, Les électrodes sont prêtes [40].

Afin de compléter la fabrication du composant, il faut après procéder à l'élaboration de la partie microfluidique composée des murs du canal. L'ensemble des murs est fabriqué, par photolithographie, avec la résine photosensible SU-8, utilisée dans d'autres travaux pour la fabrication des micro-canaux [41], [42].

Les cellules sontensemencées dans le canal microfluidique du microcomposant, qui présente une bonne biocompatibilité avec les cellules *in vitro*. En effet, la Figure 45 montre des photos, prises par (a) le microscope HIROX KH-3000 et par (b) le microscope électronique à balayage, de cellules HCT116ensemencées dans le microcanal et qui présentent une morphologie normale.

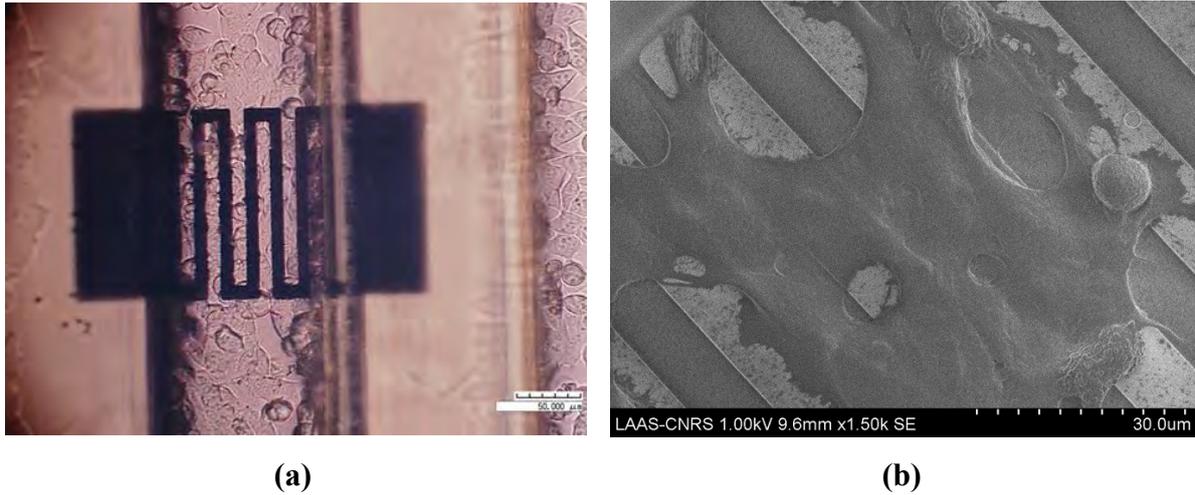
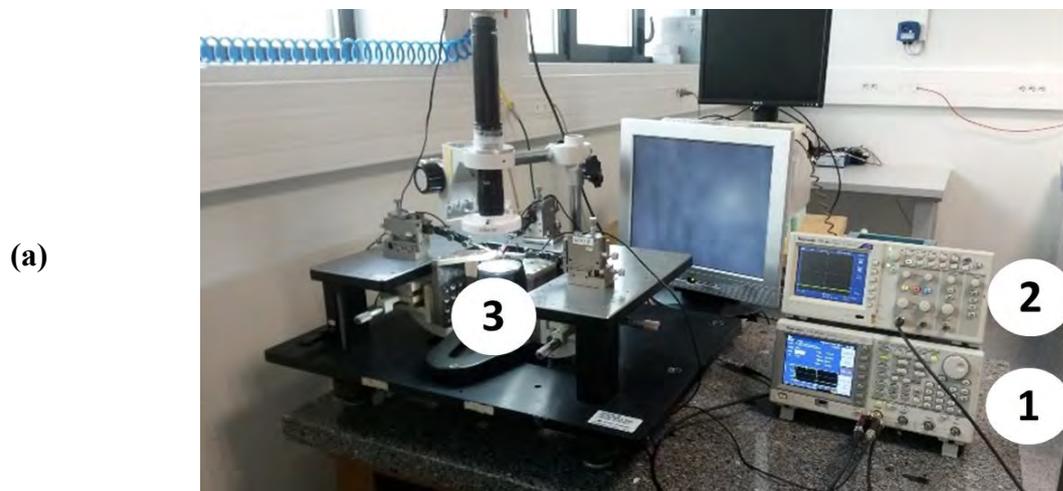


Figure 45: Images des cellules HCT116ensemencées dans le microcanal du microcomposant (a) avec le microscope Hirox et (b) en microscopie électronique à balayage MEB.

3) Mise en œuvre du microcomposant

La Figure 46.a représente l'ensemble du matériel utilisé pour l'EP « on-chip ». Le générateur utilisé pour l'application d'impulsions sur des cellules au sein de microsystèmes est le modèle AFG3022C de Tektronix (1). Les distances entre les électrodes étant réduites (facteur 1000) par rapport au système conventionnel, l'amplitude à appliquer doit elle aussi être réduite pour obtenir des champs électriques utiles équivalents. Ce générateur permet de générer des impulsions de 16 ns à 10^3 s avec des amplitudes pouvant atteindre 10 Vp-p (peak-to-peak). Le système est sous le contrôle d'un oscilloscope Tektronix TDS 210 (2). Le générateur délivre les impulsions électriques au microcomposant grâce à des électrodes en aiguilles placées en contact avec les lignes de transmission coplanaire (voir configuration de polarisation à la Figure 42) de ce dernier (3). Une vue des électrodes reliées au microcomposant est présentée dans la Figure 46.b.



(b)

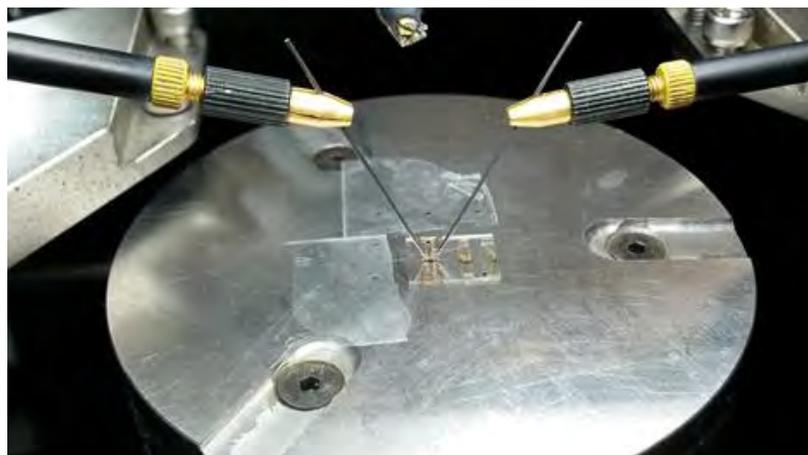


Figure 46: Photo du système d'électroporation micrométrique, (a) vue d'ensemble avec (1) générateur AFG 3022C de Tektronix, (2) oscilloscope Tektronix TDS 210 et (3) électrodes reliées au microcomposant, (b) vue proche des électrodes avec le microcomposant.

V. Résultats expérimentaux

V.1 Perméabilisation cellulaire par électroporation "conventionnelle"

Avant de se lancer dans l'optimisation de l'utilisation de notre microcomposant pour effectuer l'électroporation « on-chip », nous avons exploré les effets potentiels de l'EP sur l'internalisation de molécules exogènes (iodure de propidium PI dans notre cas) après une électroporation "conventionnelle". Nous nous sommes penchés sur la contribution de ces impulsions dans la perméabilisation de la membrane plasmique ainsi que les effets que cela peut engendrer sur la viabilité des cellules traitées.

V.1.1 Perméabilité membranaire

Suite à l'application des impulsions électriques (gamme de 0.2 kV/cm - 1.4 kV/cm) à l'aide du générateur Betatech et des électrodes en acier inoxydable, nous évaluons la perméabilité membranaire des cellules par pénétration de l'iodure de propidium PI des cellules. La Figure 47 montre les cellules HCT116 en lumière blanche et en fluorescence, après application du champ électrique en présence du PI. Nous pouvons observer que dès 0.4 kV/cm le nombre de cellules positives augmente considérablement avec l'intensité du champ électrique.

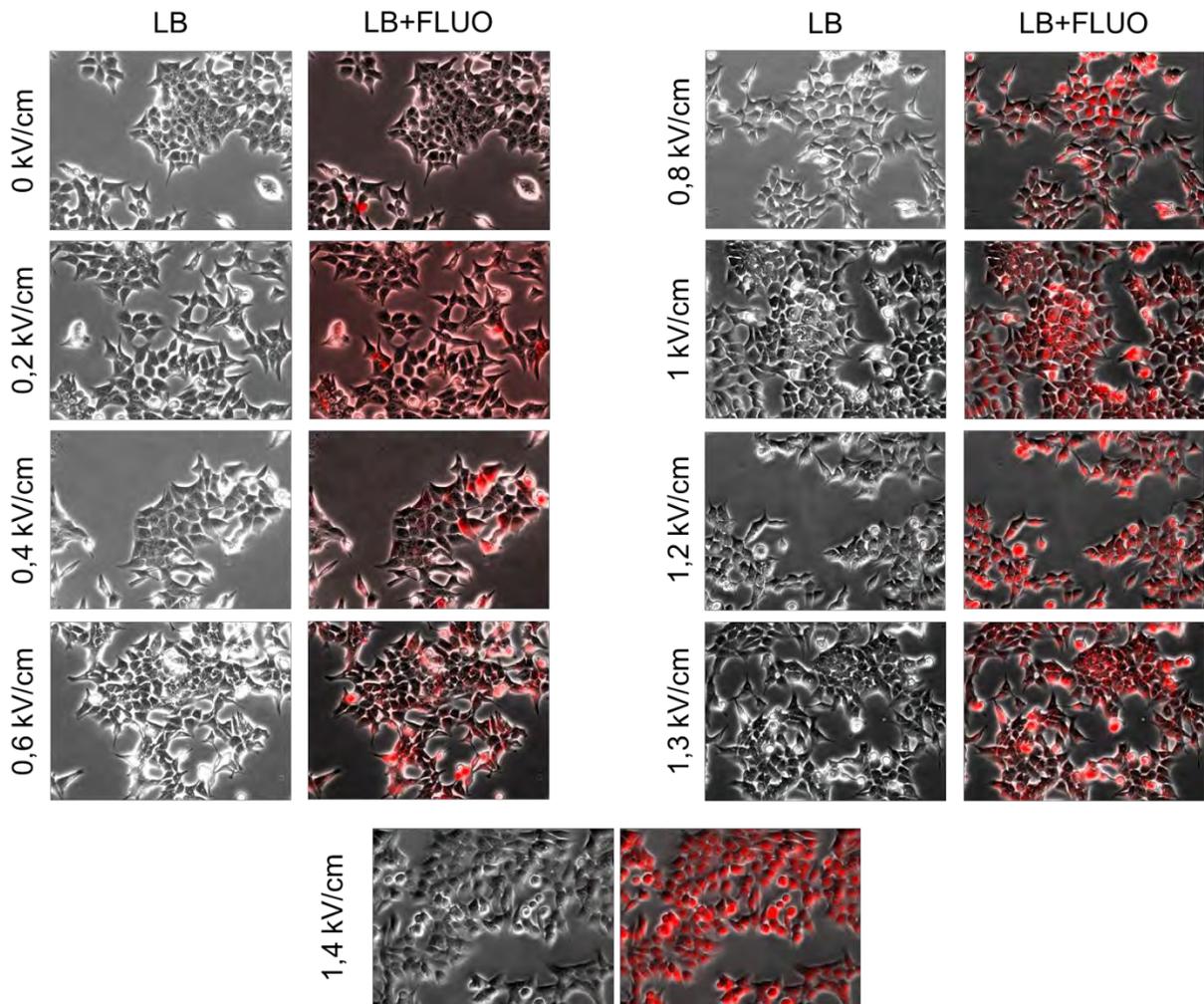


Figure 47: Visualisation de la fluorescence du PI internalisé dans les cellules HCT116 adhérentes en fonction de l'intensité du champ électrique, LB : Filtre de la lumière blanche, Fluo : Filtre de la fluorescence.

Afin de quantifier cette perméabilisation, nous utilisons l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de perméabilisation (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules PI positif}}{\text{Nombre total de cellules}} \times 100$$

Cela nous permet d'obtenir la Figure 48 dans laquelle est reporté le pourcentage de perméabilisation en fonction de l'intensité du champ électrique. Nous vérifions bien qu'à partir de 0.4 kV/cm, la perméabilisation des membranes cellulaires devient bien apparente, et qu'elle est quasiment maximale à partir de 0.8 kV/cm.

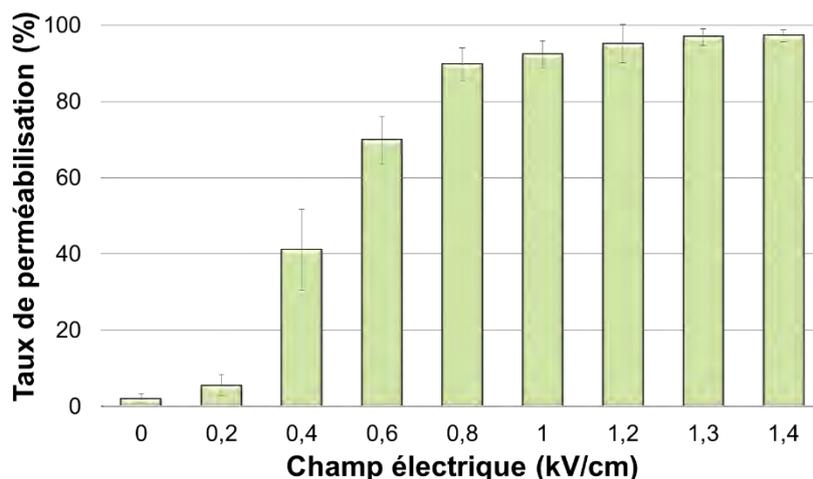


Figure 48: Evaluation de la perméabilisation des cellules HCT116 avec la pénétration du PI. Les histogrammes représentent le pourcentage des cellules perméabilisées en fonction de l'intensité du champ électrique en présence du PI (n=3).

V.1.2 Test de viabilité

Nous avons ensuite procédé à l'étude de la réponse des cellules aux impulsions de champ électrique. Cette étude est menée tout d'abord avec le test de viabilité le plus fiable : le test de survie par clonogénicité. Nous avons étudié ensuite la viabilité en évaluant la densité cellulaire par comptage et comparaison à la condition contrôle négatif. Nous comparons enfin les résultats obtenus par les deux méthodes afin d'estimer la fiabilité de la deuxième méthode par rapport au test de clonogénicité.

V.1.2.a Test de clonogénicité

Le protocole expérimental comporte 9 étapes :

- 1) Après lavage avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, ph=7.2), les cellules sont mises en présence de la Trypsine-EDTA (10X à 250 UI/mg), une enzyme qui sert à détacher les cellules adhérentes de leur support solide.
- 2) Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'un hématimètre (la cellule de Malassez).
- 3) Après dilution, les cellules sont traitées avec différentes conditions de champ électrique (0.2 kV/cm jusqu'à 2 kV/cm)
- 4) Après ce traitement, 250 cellules par condition sont cultivées en triplicata (n=3) en présence du milieu de culture dans des plaques 6 puits.
- 5) Les cellules sont cultivées, 7 à 8 jours, temps nécessaire à l'obtention de colonies suffisamment grandes.
- 6) Après ce temps de culture, les cellules sont lavées avec du PBS.

- 7) Une solution de Crystal violet à 0.2% est ajoutée aux cellules. Le Crystal violet est un colorant qui diffuse librement à travers la membrane des cellules.
- 8) Après 20 minutes d'incubation sous agitation douce, l'excès du Crystal violet est éliminé et les cellules sont lavées délicatement avec de l'eau.
- 9) Les cellules sont séchées à l'air libre, avant de procéder au comptage du nombre de colonies formées.

La Figure 49 regroupe les images des puits contenant les cellules HCT116 exposées à différentes valeurs du champ électrique.

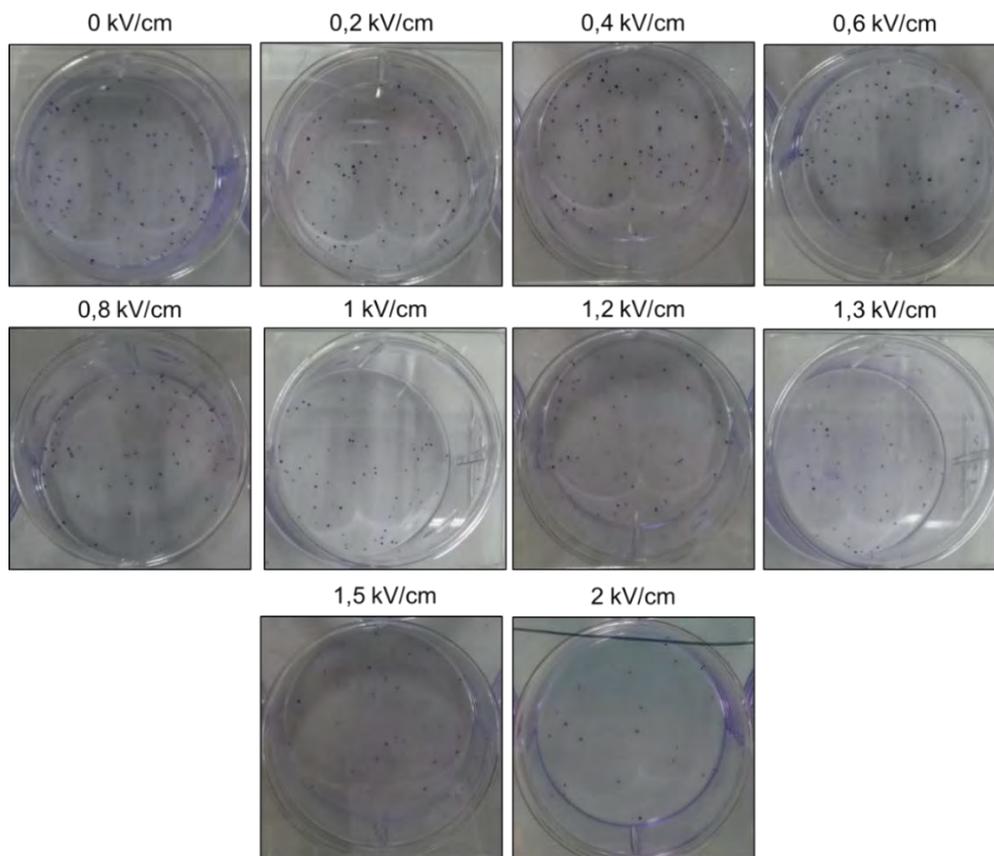


Figure 49: Test de viabilité par clonogénie des HCT116 exposées à différentes valeurs de champ électrique. Les conditions électriques sont : 0.2 kV/cm - 2kV/cm, 100 μ s, 1 Hz, n=8. Chaque point violet représente une colonie cellulaire formée à partir d'une cellule.

Après comptage du nombre de colonies formées dans chaque puit, nous procédons au calcul de l'efficacité de l'ensemencement (Plating Efficiency PE) et de la fraction de survie (Surviving Fraction SF) des cellules.

PE est le rapport entre le nombre de colonies formées et le nombre de cellules non traitées (contrôle négatif) ensemencées au départ:

$$PE = \frac{\text{Nombre de colonies formées}}{\text{Nombre de cellulesensemencées}} \times 100$$

Différentes lignées cellulaires présentent différentes valeurs de PE. Le Tableau 2 montre quelques exemples de PE de différentes lignées cellulaires [43].

A l'issue de ce test (n=3), nous pouvons conclure que le pourcentage de PE pour les cellules HCT116 se situe entre 40 et 60% (dernière ligne du Tableau 2), une valeur semblable à celle des DLD1, les deux lignées provenant du même cancer colorectal.

Tableau 2: Valeurs de PE (Plating Efficiency) de différentes lignées cellulaires [43].

Lignée cellulaire	Type cellulaire	Milieu de culture	PE (%)
SW1573	Carcinome pulmonaire	L-15	50-80
Gli-6	Glioblastome	D-MEM	50-80
RKO	Carcinome du côlon	McCoys 5A	70-90
DLD1	Adénocarcinome colorectal	RPMI	40-60
AG1522	Fibroblaste	D-MEM/F12	10
PC3	Cancer du Prostate	RPMI	50-60
DU-145	Cancer du Prostate	RPMI	50-60
HCT116	Carcinome colorectal	DMEM	40-60

Après l'exposition des cellules au champ électrique, la fraction SF peut être calculée en fonction de la PE par l'équation suivante :

$$SF = \frac{\text{Nombre de colonies formées après traitement}}{\text{Nombre de cellulesensemencées} \times PE} \times 100$$

A l'issue des expérimentations, nous obtenons le graphe représenté à la Figure 50, qui représente la variation de la fraction SF en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué. L'électroporabilité peut avoir des effets délétères sur la cellule. Si la membrane n'arrive pas à réparer les dommages qu'elle a subi, sa viabilité peut être altérée. De ce fait, une

augmentation de l'intensité du champ électrique peut engendrer une augmentation du nombre de cellules affectées, donc des cellules perdant la capacité à proliférer, d'où le pourcentage faible de la fraction survivante, pour une intensité de champ électrique supérieure à 1.3 kV/cm.

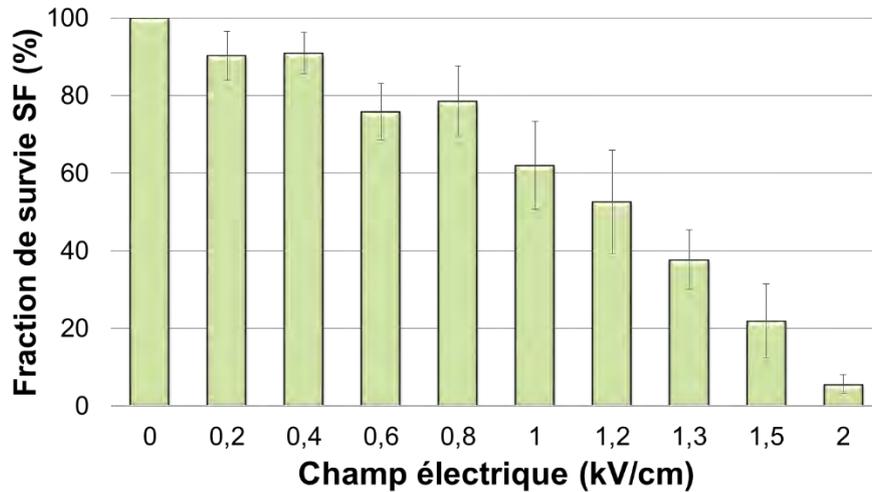


Figure 50: Graphe représentant la fraction de survie SF des HCT116 après EP avec différents champ électrique, obtenu à l'issue du test de clonogénicité.

Le résultat obtenu par le test de clonogénicité représente le résultat le plus juste que l'on peut obtenir pour l'évaluation de l'effet du champ électrique sur la viabilité des HCT116 adhérentes.

V.1.2.b Test de comptage

Lors de nos travaux, nous avons également une autre modalité d'évaluation de la viabilité cellulaire suite à l'électroporation. Cette méthode se base elle aussi sur le taux de prolifération des cellules à temps court (correspondant au temps de génération de cellules), et cela en comparant les cellules traitées à des cellules qui n'ont vu aucun traitement (le contrôle négatif). De la même manière que précédemment décrite, les cellules après électroporation sont remises en culture en présence du milieu de culture, à 37°C. Après 24 heures, qui correspond au temps de doublement des HCT116, les cellules sont visualisées au microscope optique et les images prises sont traitées par le logiciel Image J.

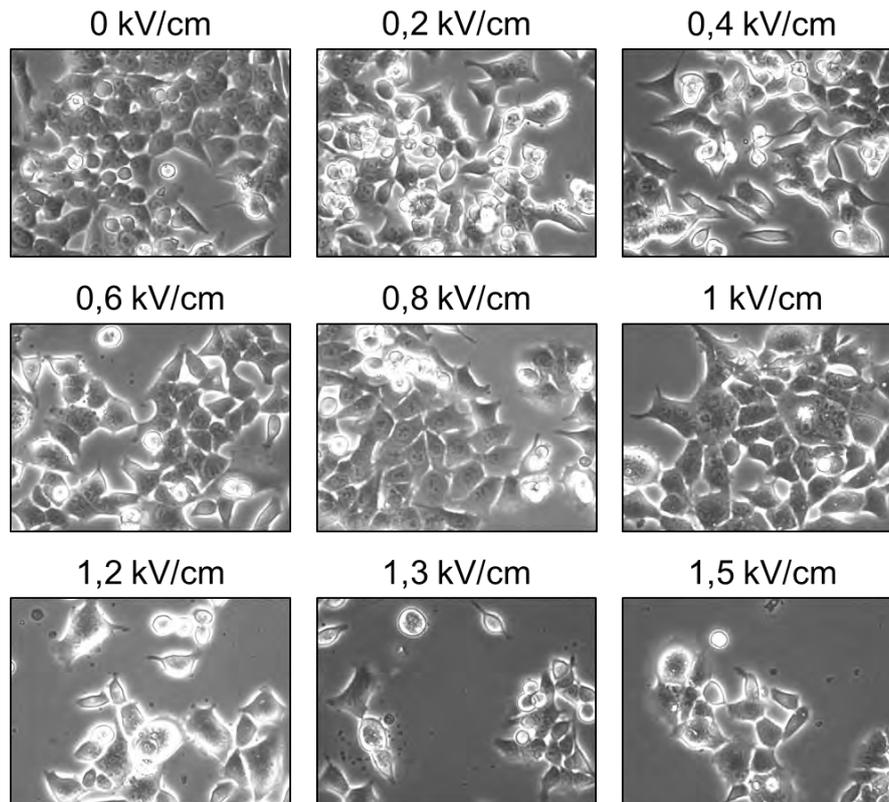


Figure 51: Images en microscopie optique des cellules HCT116 après différents conditions d'électroporation (0,2 - 1,5 kV/cm).

Par comparaison aux cellules non-traitées (contrôle négatif), les cellules commencent à présenter une morphologie différente lorsque l'intensité du champ électrique d'électroporation augmente. A partir de 1 kV/cm, un phénomène de fusion cellulaire apparaît. Ce phénomène bien décrit [44], [45], [46], appelé électrofusion, se produit après l'application du champ électrique et permet la fusion des membranes des cellules adjacentes. Les paramètres électriques requis pour introduire de petites molécules à l'intérieur de la cellule et pour l'électrofusion sont similaires. La différence principale entre les deux processus est l'intensité du champ électrique, qui est plus élevée pour l'électrofusion que pour l'électroporation classique [47], [48].

Outre le changement de morphologie des cellules, l'électroporation s'accompagne d'une diminution de la densité cellulaire. La densité cellulaire dans chaque condition d'EP est comparée à celle du contrôle négatif, ce qui nous permet de déterminer le pourcentage de la viabilité en fonction de l'intensité du champ électrique.

Vu que le test de clonogénicité est le test le plus fiable pour l'estimation de la viabilité cellulaire, Nous avons comparé les résultats obtenus avec le test de comptage cellulaire (de prolifération), 24 heures après le traitement, et le test de clonogénicité, comme montre la Figure 52. Une

augmentation du champ électrique induit, une augmentation du nombre de cellules affectées. En effectuant une étude statistique de corrélation entre ces deux types de test, nous pouvons conclure que :

- 1- Un facteur de corrélation $R^2=0.942$ est obtenu entre les deux types de test, une valeur forte positive de corrélation, indiquant la concordance et la similitude des résultats.
- 2- Le test de clonogénicité reste bien le test de viabilité par excellence, mais cette bonne corrélation avec le test de comptage de prolifération cellulaire, fait de ce dernier un test rapide, validé et fiable pour estimer l'effet de différents types de traitement sur les cellules.

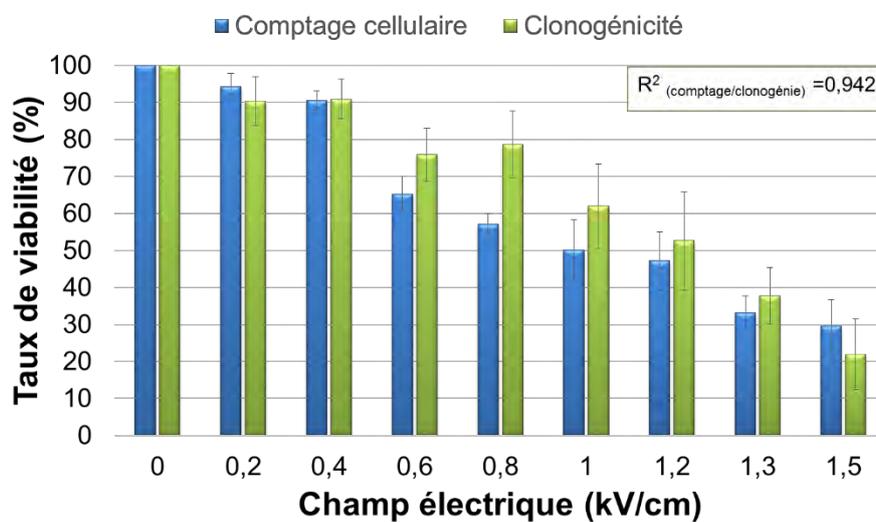


Figure 52: Evaluation du taux de viabilité des cellules HCT116 après électroporation par la méthode de comptage de la prolifération cellulaire.

V.2 Perméabilisation cellulaire par électroporation "on-chip"

Dans cette partie du travail, nous allons décrire l'étude que nous avons menée afin de transposer l'électroporation classique macrométrique sur un composant micrométrique avec une zone active ne dépassant pas les 150 μm et une distance interélectrodes de 10 μm . Pour cela, nous avons tout d'abord effectué des simulations numériques en utilisant un logiciel à éléments finis (COMSOL Multiphysics) dans le but de réaliser une cartographie de la distribution du champ électrique appliqué dans le composant. Ensuite, nous avons utilisé, comme dans la partie précédente, l'iodure de propidium PI comme marqueur de perméabilisation membranaire et nous avons suivi son internalisation après exposition à des impulsions électriques. Nous avons ensuite complété l'étude par une évaluation de la viabilité des cellules suite à l'EP.

V.2.1 Cartographie de la distribution du champ électrique

La distribution du champ électrique est évaluée en utilisant le logiciel commercial de simulations par éléments finis, COMSOL Multiphysics 4.2, COMSOL Ltd., USA. Notre microcomposant comporte 4 paires d'électrodes interdigitées (voir Figure 42 et Figure 43).

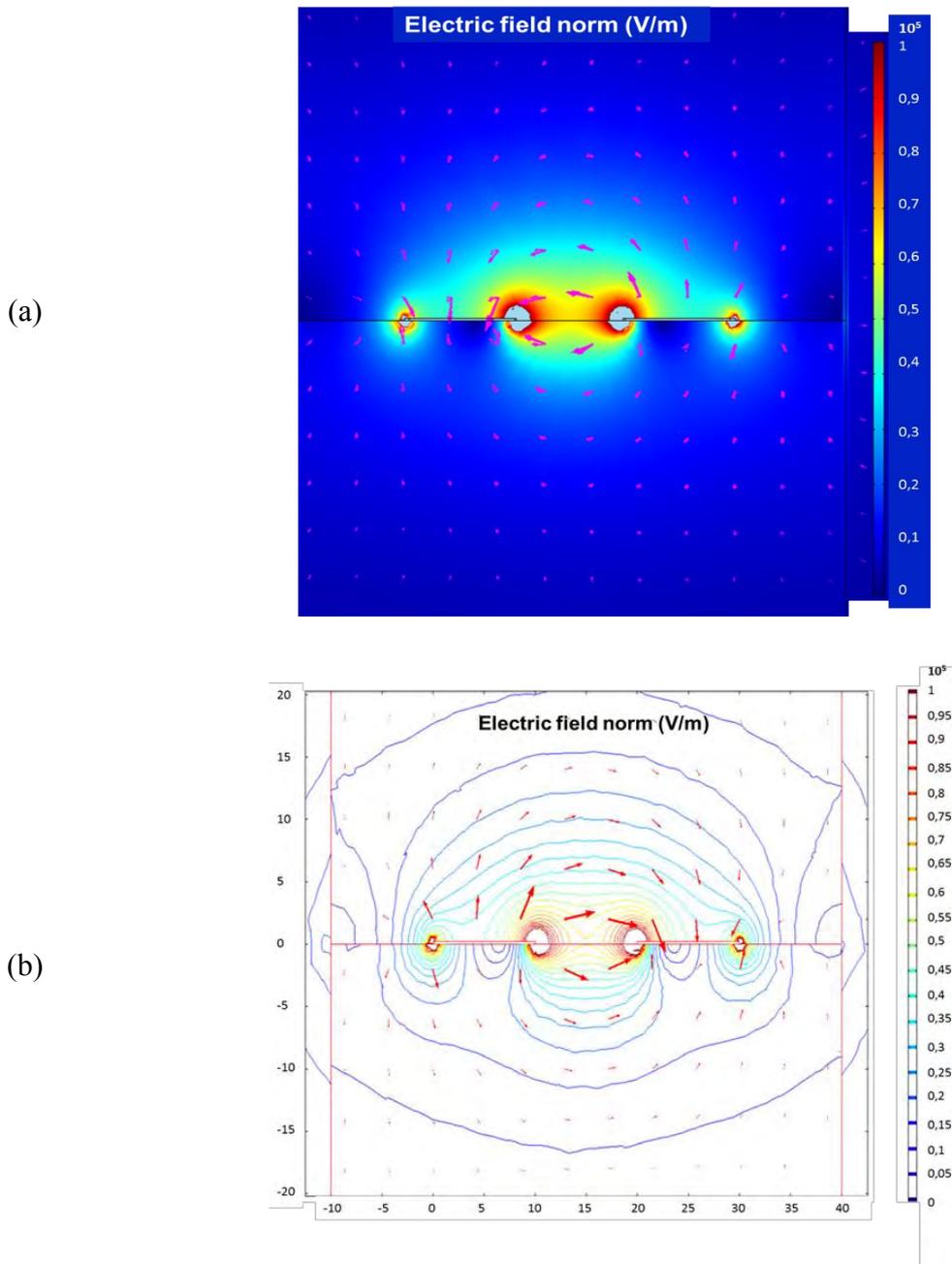


Figure 53: Distribution en 2D du champ électrique dans le microcomposant entre deux électrodes, obtenue par une simulation par éléments finis (COMSOL Multiphysics). Le module du champ électrique (V/m) est montré pour 1 V appliqué entre les électrodes. Le système est périodique : une seule portion est montrée.

Pour simplifier la simulation, nous n'étudions que le champ électrique développé par une seule paire, le résultat étant transposable pour les autres paires d'électrodes. Le modèle de notre

microcomposant consiste alors en une paire d'électrodes en or (de 140 μm de longueur, 10 μm de largeur et 10 μm de distance inter-électrodes) déposée sur un substrat en quartz et surmontée d'une couche du milieu choisi pour l'électroporation. La permittivité relative et la conductivité du milieu de pulsation ZAP sont $77.4 \pm 5\%$ and $1.7 \text{ S/m} \pm 10\%$, respectivement. Une différence de potentiel de 1 Volt est appliquée entre les deux électrodes. La simulation (Figure 53) montre que le champ électrique n'est pas distribué d'une manière parfaitement homogène. L'électroporation dépendra donc de la position des cellules vis-à-vis des électrodes. De plus, cette simulation montre aussi qu'avec une différence de potentiel aussi faible que 1 Volt, un champ électrique important est produit jusqu'à 10^5 V/m soit 1 kV/cm.

V.2.2 Visualisation de la perméabilisation par suivi de fluorescence

Lors de nos expériences, les cellules ont été exposées à un train de 8 impulsions de 100 μs à une fréquence de répétition de 1 Hz dans le microsystème ayant un écartement inter-électrodes de 10 μm . Différentes valeurs de tensions ont été testées, afin de trouver celles qui permettent d'électroperméabiliser efficacement les cellules.

La Figure 54 montre l'évolution du niveau de fluorescence des cellules soumises au champ électrique, dans différentes conditions.

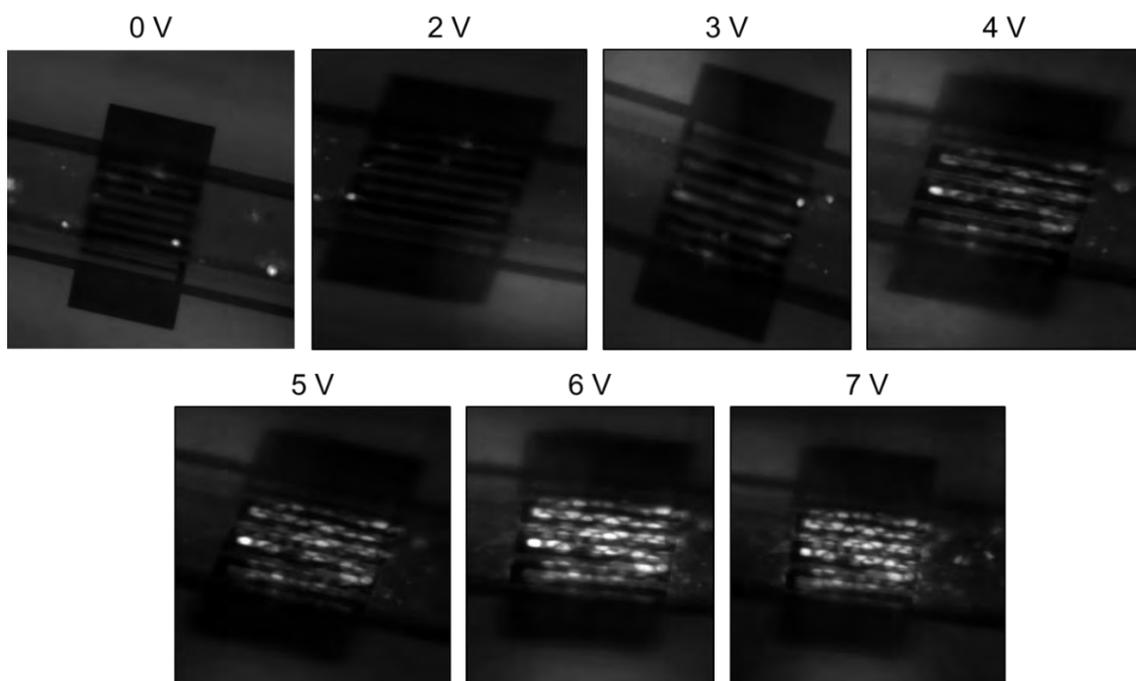


Figure 54: Evolution de la fluorescence émise par le PI internalisé dans les HCT116 après l'exposition à un train de 8 impulsions de 100 μs à une fréquence de répétition de 1 Hz, dans un microsystème ayant une distance inter-électrodes de 10 μm .

La fluorescence émise par le PI devient détectable à partir de 3 Volts appliqués, et l'on retrouve un comportement similaire à l'électroporation « classique » : une augmentation de l'intensité des impulsions électriques induit une augmentation du nombre de cellules perméabilisées.

A l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, USA), un « Interactive 3D surface plot » est obtenu et permet de réaliser un graphe de distribution de surface de l'intensité des pixels des images d'origine correspondantes. La Figure 55 montre deux exemples : les cellules non pulsées (0 Volt) et les cellules pulsées (6 Volts).

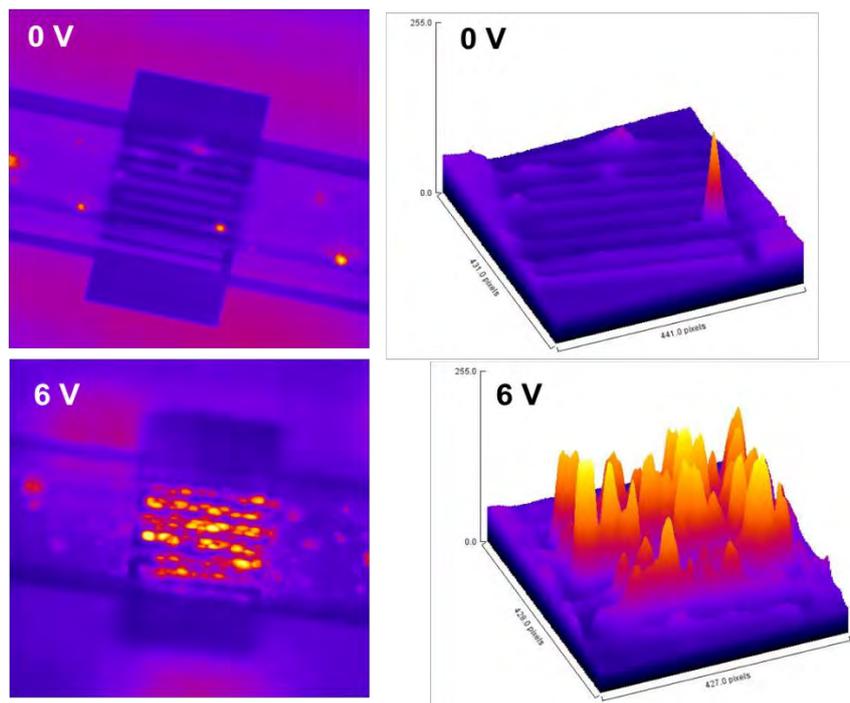


Figure 55: « Interactive 3D surface plot » obtenus des photos en fluorescence sur le composant : visualisation de la distribution des cellules perméabilisées et des valeurs de l'intensité de fluorescence. Cette figure montre deux conditions : 0 Volt et 6 Volts.

En analysant les photos de fluorescence, nous pouvons quantifier le pourcentage de perméabilisation en fonction de la tension électrique appliquée (Figure 56.a), ainsi que l'intensité de fluorescence associée à chaque condition (Figure 56.b). L'augmentation de la valeur de la tension électrique s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules perméabilisées et de la quantité de PI internalisé. Prenons l'exemple de 4 Volts, un pourcentage de perméabilisation élevé (70%) est accompagné d'une intensité de fluorescence faible (20 u.a.), ce qui indique qu'un grand nombre de cellules est perméabilisé d'une façon peu efficace (le nombre de molécules de PI incorporé étant faible). A 5 Volts, une perméabilisation maximale est atteinte mais le nombre de molécules internalisées reste limité (intensité de fluorescence égale à 30 u.a.). Ce n'est qu'à 6 Volts où est remarquée une perméabilisation de

la totalité des cellules avec une internalisation maximale des molécules de PI (intensité de fluorescence égale à 82 u.a.). Lorsque des impulsions de 7 Volts sont appliquées, un taux de perméabilisation maximale est maintenu mais accompagné d'une diminution de l'intensité de fluorescence (diminution du nombre de molécules PI à l'intérieur de la cellule). Cela peut être expliqué par une perméabilisation irréversible des cellules, permettant l'entrée puis la sortie des molécules de PI.

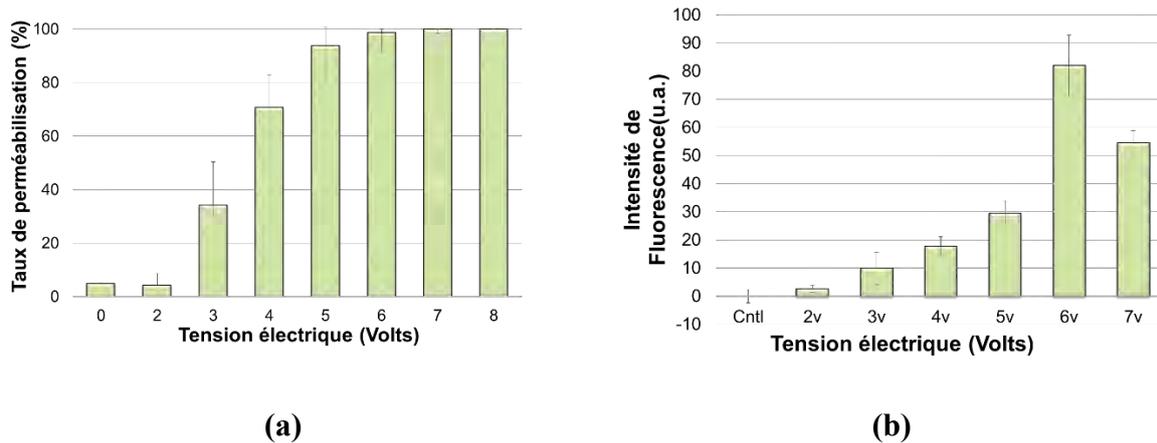


Figure 56: (a) Graphe représentant la quantification du taux de perméabilisation membranaire en fonction de la tension électrique appliquée en volts des cellules HCT116 pulsées dans le microcomposant et (b) évaluation de l'intensité de fluorescence émise des HCT116 après application des impulsions électriques.

En comparant ces résultats à ceux de la Figure 48, nous remarquons une allure similaire pour les deux graphes : une augmentation de la perméabilité avec l'intensité du champ électrique. De plus, en comparant les valeurs de perméabilisation entre les 2 graphes, une tension de 5 Volts (93,6% de perméabilisation) correspond à 1 kV/cm (92,3% de perméabilisation). De ce fait, nous pouvons valider notre microsystème et sa compatibilité avec la nouvelle fonction qui lui est attribué : l'électroporation « on-chip ».

Lors de leur culture dans le microcomposant, les cellules HCT116 adhèrent non seulement sur les électrodes interdigitées (zone où est développé le champ électrique), mais aussi tout au long du canal (zone sans champ électrique). Ces dernières constituent notre contrôle négatif interne. En effet, les cellules situées en dehors des électrodes ne subissent pas de traitement électrique et ne sont donc pas perméabilisées. Nous avons vérifié à la fin de l'étude, l'état des cellules présentes dans le canal microfluidique. La Figure 57 montre des photos des HCT116 dans le microcanal, prises en lumière blanche (LB) et en fluorescence (FLUO) en présence de molécules de PI. Les cellules présentent une morphologie normale et un état d'imperméabilité préservée. Les cellules fluorescentes qui apparaissent dans la photo en fluorescence représentent le taux basal de mortalité des HCT116.

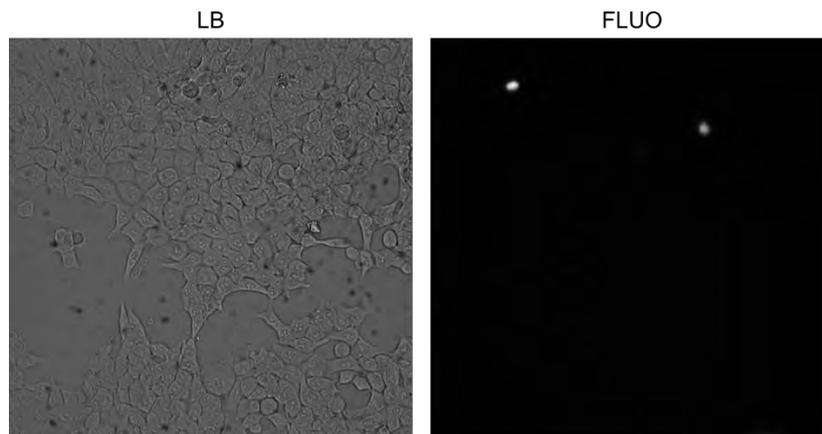


Figure 57: Photos prises en lumière blanche LB en fluorescence FLUO en présence de PI des cellules HCT116 présentes dans le canal microfluidique.

V.2.3 Evaluation de l'effet de l'électroporation « on-chip » sur la viabilité cellulaire

La condition nécessaire la plus importante dans le développement de nouveaux outils pour l'électroporation est la préservation de la viabilité des cellules, et ceci particulièrement en électrochimiothérapie et en électrotransfert de gènes. Pour d'autres applications utilisant des champs électriques intenses, un effet délétère sur les cellules est recherché avec une perte de viabilité importante permettant l'éradication des microorganismes ou le traitement de cellules cancéreuses par l'électroporation irréversible.

Afin d'évaluer l'effet des conditions électriques utilisées sur la viabilité des HCT116 au sein de notre microcomposant, nous avons étudié de la même façon que précédemment, la capacité proliférative des cellules 24 heures après électroporation, et cela en comptant le nombre de cellules pour chaque condition et en le comparant aux cellules non-électroporées. Nous considérons donc qu'une cellule adhérente sur le composant 24 heures après le traitement, est une cellule viable.

La Figure 58 représente l'ensemble des photos des cellules HCT116, obtenues pour différentes conditions d'EP. La densité cellulaire présente sur la zone des électrodes, avant et après EP (8 impulsions de 100 μ s de durée et avec une fréquence de 1 Hz), pour toutes les conditions étudiées : de 0 Volt (contrôle négatif) jusqu'à 10 Volts, est ensuite déterminée par comptage cellulaire.

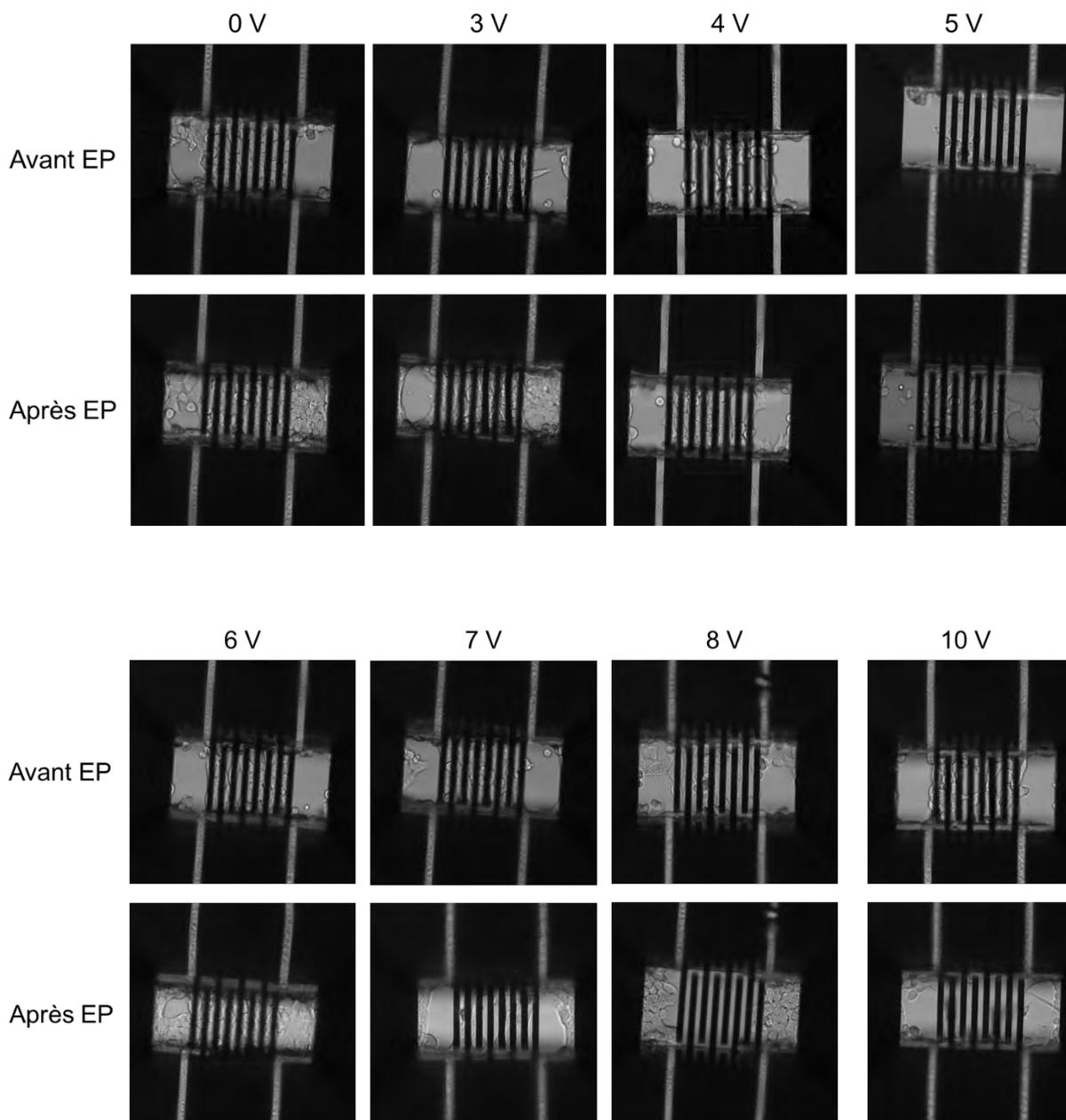


Figure 58: Photos des cellules HCT116 dans le microcomposant, avant et après (24 heures) l'application d'EP dans le microcomposant. Les cellules sont pulsées avec 8 impulsions électriques d'une durée de 100 μ s et avec une fréquence de 1 Hz. Une gamme de tension électrique est testée : 0 Volt – 10 Volts.

Comme le révèlent les photos, un taux de prolifération normale est préservé jusqu'à 7 volts. Au-delà de cette valeur, nous remarquons qu'il n'y a quasiment plus de cellules sur les électrodes, alors que dans les régions voisines (pour lesquelles aucun champ ne s'est établi), les cellules continuent à proliférer normalement. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus dans l'étude de la perméabilisation en présence du PI : à partir de 7 Volts, les cellules sont irréversiblement électroporées et donc ne sont plus présentes sur les électrodes, 24 heures après l'EP.

Une étude quantitative sur un ensemble de cellules pulsées dans les microcomposants (n=3) a été conduite. Cela nous permet d'avoir le graphe présenté dans la Figure 59, montrant le pourcentage de viabilité en fonction de la tension électrique appliquée. L'effet sur la viabilité dans le microcomposant semble être tranchant. Malgré la perméabilisation importante que nous obtenons en utilisant 6 volts par exemple, cette tension ne semble pas avoir un effet menaçant l'intégrité cellulaire. Par contre, une fois ce seuil dépassé, l'EP induit une mort quasi totale des cellules.

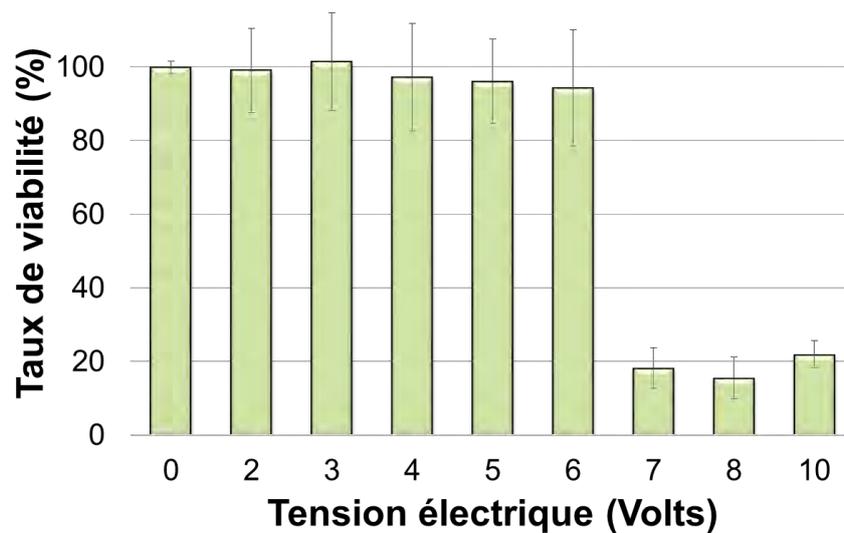


Figure 59: Viabilité des cellules HCT116 24 heures après électroporation dans le microsystème, avec différentes tensions électriques (0 V – 10 V).

Cette étude montre qu'un haut niveau de viabilité est maintenu après l'application des impulsions électriques. A 6 Volts, 94% des cellules restent présentes 24 heures après le traitement électrique sur les électrodes. Cela valide l'aptitude de notre microsystème à être utilisé pour l'évaluation des conditions optimales de l'électroporation. Une différence d'allure entre la Figure 52 et la Figure 59 est notée d'où l'hypothèse de la mise en place d'une meilleure dissipation de l'énergie dans les microcomposants minimisant les dommages causés par l'Effet Joule.

VI. Conclusion

Au cours du chapitre II, nous avons présenté l'architecture, la microfabrication et la caractérisation d'un microcomposant dédié à l'électroporation sur puce d'un nombre réduit de cellules (quelques dizaines de cellules).

Une première étape de caractérisation de la lignée cellulaire HCT116 est menée en utilisant les méthodes conventionnelles. Les cellules ont été soumises à l'électroporation à l'aide d'un système d'électroporation macrométrique utilisé couramment (quelques centaines de milliers de cellules traitées) et les taux de perméabilisation et viabilité cellulaire ont été évalués. Il ressort de cette analyse que pour un champ électrique de 0.8kV/cm un fort taux de perméabilisation est atteint (90%) alors que la viabilité n'est que raisonnablement altérée (chute de 20%) et reste supérieure à 80%.

Fort de cette étape de « calibrage » à l'échelle « macrométrique » (espace inter-électrodes de quelques millimètres pour le traitement de quelques centaines de milliers de cellules) de la réponse au champ électrique de la lignée cellulaire retenue, qui est prise donc comme référence, nos travaux se sont alors concentrés sur la transposition de cette étude à l'échelle de « micrométrique » (quelques dizaines de μm pour le traitement de quelques dizaines de cellules) sur un microcomposant.

Ce dernier comporte un ensemble d'électrodes interdigitées en or qui sont en charge d'appliquer le champ électrique électro-perméabilisant aux cellules. Ce composant n'est ni de technologie ni d'architecture « libres » car il doit permettre de réaliser la spectroscopie hyperfréquence qui sera présentée au chapitre suivant.

Nous avons tout d'abord prédit, à l'aide de simulations électriques par éléments finis sur COMSOL, la distribution du champ électrique au sein du microcomposant. Ces simulations ont montré, certes une distribution non-homogène du champ électrique, qu'un niveau de champ électrique intense (de valeur usuellement employée en EP) est atteint pour des tensions de l'ordre de quelques volts.

Nous avons alors entrepris des expérimentations d'électroperméabilisation membranaire « on-chip », en présence de l'iodure de propidium, avec des tensions électriques croissantes, afin de déterminer les conditions nécessaires à la perméabilisation. Nous avons alors prouvé que notre micro-composant (développé dans un autre contexte : la spectroscopie hyperfréquence) permet de réaliser une électro-perméabilisation graduelle des cellules avec un taux de perméabilisation de 94% pour une tension inter-électrodes de 5V (8 impulsions de 100 μs répétées toutes les secondes). Ce niveau de perméabilisation correspond à un champ électrique de 1 kV/cm, ce qui démontre bien qu'un tel champ peut-être atteint au sein de notre microcomposant avec des tensions de quelques volts.

Concernant la viabilité cellulaire, alors qu'un taux de perméabilisation cellulaire de quasi 100% est atteint pour une tension de 6 Volts (8 impulsions de 100 μ s répétées toutes les secondes) appliqué à notre micro-dispositif, la viabilité dans ces conditions n'est que très peu altérée (chute de 6% seulement) et reste supérieure à 94%. Nous émettons l'hypothèse que cette situation favorable est due à une meilleure dissipation de l'énergie dans les microcomposants minimisant les dommages causés par l'Effet Joule, un phénomène plus présent dans les systèmes macrométriques.

Le succès de l'électroporation « on-chip » sur des composants dédiés à la spectroscopie hyperfréquence amène plusieurs perspectives :

- Une solution micro-métrique (espace inter-électrodes de quelques dizaines de μ m pour le traitement de quelques dizaines de cellules) permet de surmonter les inconvénients de l'électroporation classique « macrométrique » (espace inter-électrodes de quelques millimètres pour le traitement de quelques centaines de milliers de cellules). En effet, la distance réduite entre les électrodes permet l'utilisation de faibles tensions électriques de l'ordre de quelques volts. De plus, les volumes réduits des microsystèmes permettent l'utilisation de faibles quantités de produits et contribue donc à l'augmentation de l'efficacité d'analyse ainsi qu'à sa possible parallélisation.
- Il est alors possible d'envisager un unique microcomposant réalisant plusieurs fonctionnalités en son sein : (1) l'électroporation *in-situ* – comme l'on vient de la démontrer –, (2) l'analyse par spectroscopie hyperfréquence – dont on démontre l'intérêt dans le chapitre suivant – et enfin (3) l'analyse biologique par des moyens usuels (microscopie) – les matériaux utilisés lors la microfabrication de ces composants (substrat de quartz notamment) assurant cette possibilité –.

VII. Références du Chapitre II

- [1] R. J. Lipshutz, S. P. Fodor, T. R. Gingeras, and D. J. Lockhart, “High density synthetic oligonucleotide arrays,” *Nat. Genet.*, vol. 21, no. 1 Suppl, pp. 20–24, Jan. 1999.
- [2] F. K. Balagaddé, L. You, C. L. Hansen, F. H. Arnold, and S. R. Quake, “Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat,” *Science*, vol. 309, no. 5731, pp. 137–140, Jul. 2005.
- [3] T. P. Burg and S. R. Manalis, “Suspended microchannel resonators for biomolecular detection,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 83, no. 13, pp. 2698–2700, Sep. 2003.
- [4] A. van den Berg and P. Bergveld, “Labs-on-a-Chip: origin, highlights and future perspectives. On the occasion of the 10th microTAS conference,” *Lab. Chip*, vol. 6, no. 10, pp. 1266–1273, Oct. 2006.
- [5] F. Yang *et al.*, “Dielectrophoretic separation of colorectal cancer cells,” *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 1, Jan. 2010.
- [6] B. R. Rafael Davalos Yong Huang, “Electroporation: Bio-Electrochemical Mass Transfer at the Nano Scale,” *Microscale Thermophys. Eng.*, vol. 4, no. 3, pp. 147–159, Jul. 2000.
- [7] Y. Huang and B. Rubinsky, “Micro-Electroporation: Improving the Efficiency and Understanding of Electrical Permeabilization of Cells,” *Biomed. Microdevices*, vol. 2, no. 2, pp. 145–150, Mar. 1999.
- [8] Y.-C. Lin and M.-Y. Huang, “Electroporation microchips for in vitro gene transfection,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 11, no. 5, p. 542, 2001.
- [9] Y. Murakami *et al.*, “Micromachined electroporation system for transgenic fish,” *J. Biotechnol.*, vol. 34, no. 1, pp. 35–42, Apr. 1994.
- [10] Y. Huang and B. Rubinsky, “Microfabricated electroporation chip for single cell membrane permeabilization,” *Sens. Actuators Phys.*, vol. 89, no. 3, pp. 242–249, Apr. 2001.
- [11] Y. Huang, N. S. Sekhon, J. Borninski, N. Chen, and B. Rubinsky, “Instantaneous, quantitative single-cell viability assessment by electrical evaluation of cell membrane integrity with microfabricated devices,” *Sens. Actuators Phys.*, vol. 105, no. 1, pp. 31–39, Jun. 2003.
- [12] H. He, D. C. Chang, and Y.-K. Lee, “Micro pulsed radio-frequency electroporation chips,” *Bioelectrochemistry Amst. Neth.*, vol. 68, no. 1, pp. 89–97, Jan. 2006.
- [13] H. He, D. C. Chang, and Y.-K. Lee, “Using a micro electroporation chip to determine the optimal physical parameters in the uptake of biomolecules in HeLa cells,” *Bioelectrochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 363–368, May 2007.
- [14] S. Vassanelli *et al.*, “Space and time-resolved gene expression experiments on cultured mammalian cells by a single-cell electroporation microarray,” *New Biotechnol.*, vol. 25, no. 1, pp. 55–67, Jun. 2008.
- [15] T. Ishibashi, K. Takoh, H. Kaji, T. Abe, and M. Nishizawa, “A porous membrane-based culture substrate for localized in situ electroporation of adherent mammalian cells,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 128, no. 1, pp. 5–11, Dec. 2007.
- [16] L. Nan, Z. Jiang, and X. Wei, “Emerging microfluidic devices for cell lysis: a review,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 6, pp. 1060–1073, Feb. 2014.
- [17] A. D. Hargis, J. P. Alarie, and J. M. Ramsey, “Characterization of cell lysis events on a microfluidic device for high-throughput single cell analysis,” *Electrophoresis*, vol. 32, no. 22, pp. 3172–3179, Nov. 2011.
- [18] N. Jokilaakso *et al.*, “Ultra-localized single cell electroporation using silicon nanowires,” *Lab. Chip*, vol. 13, no. 3, pp. 336–339, Feb. 2013.
- [19] M.-S. Hung and Y.-T. Chang, “Single cell lysis and DNA extending using electroporation microfluidic device,” *BioChip J.*, vol. 6, no. 1, pp. 84–90, Mar. 2012.

- [20] Y.-H. Lin and G.-B. Lee, "An optically induced cell lysis device using dielectrophoresis," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 94, no. 3, p. 33901, Jan. 2009.
- [21] H.-Y. Wang and C. Lu, "Electroporation of Mammalian Cells in a Microfluidic Channel with Geometric Variation," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 14, pp. 5158–5164, Jul. 2006.
- [22] D. W. Lee and Y.-H. Cho, "A continuous electrical cell lysis device using a low dc voltage for a cell transport and rupture," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 124, no. 1, pp. 84–89, Jun. 2007.
- [23] C.-P. Jen, T. G. Amstislavskaya, Y.-H. Liu, J.-H. Hsiao, and Y.-H. Chen, "Single-Cell Electric Lysis on an Electroosmotic-Driven Microfluidic Chip with Arrays of Microwells," *Sensors*, vol. 12, no. 6, pp. 6967–6977, May 2012.
- [24] K.-Y. Lu, A. M. Wo, Y.-J. Lo, K.-C. Chen, C.-M. Lin, and C.-R. Yang, "Three dimensional electrode array for cell lysis via electroporation," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 4, pp. 568–574, Oct. 2006.
- [25] J. W. Loomis-Husselbee, P. J. Cullen, R. F. Irvine, and A. P. Dawson, "Electroporation can cause artefacts due to solubilization of cations from the electrode plates. Aluminum ions enhance conversion of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate into inositol 1,4,5-trisphosphate in electroporated L1210 cells," *Biochem. J.*, vol. 277 (Pt 3), pp. 883–885, Aug. 1991.
- [26] D. Zhao *et al.*, "A Flow-Through Cell Electroporation Device for Rapidly and Efficiently Transfecting Massive Amounts of Cells in vitro and ex vivo," *Sci. Rep.*, vol. 6, Jan. 2016.
- [27] Y. S. Shin *et al.*, "Electrotransfection of Mammalian Cells Using Microchannel-Type Electroporation Chip," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 23, pp. 7045–7052, Dec. 2004.
- [28] Y.-C. Lin, C.-M. Jen, M.-Y. Huang, C.-Y. Wu, and X.-Z. Lin, "Electroporation microchips for continuous gene transfection," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 79, no. 2–3, pp. 137–143, Oct. 2001.
- [29] Y.-C. Lin, M. Li, C.-S. Fan, and L.-W. Wu, "A microchip for electroporation of primary endothelial cells," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 108, no. 1–3, pp. 12–19, Nov. 2003.
- [30] Y.-C. Lin, M. Li, and C.-C. Wu, "Simulation and experimental demonstration of the electric field assisted electroporation microchip for in vitro gene delivery enhancement," *Lab. Chip*, vol. 4, no. 2, pp. 104–108, Apr. 2004.
- [31] Y. Huang and B. Rubinsky, "Flow-through micro-electroporation chip for high efficiency single-cell genetic manipulation," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 104, no. 3, pp. 205–212, May 2003.
- [32] Y.-S. Choi, H.-B. Kim, G.-S. Kwon, and J.-K. Park, "On-chip testing device for electrochemotherapeutic effects on human breast cells," *Biomed. Microdevices*, vol. 11, no. 1, pp. 151–159, Feb. 2009.
- [33] M. Wu, Y. Xiao, D. Zhao, Z. Liang, and Z. Li, "A microchip for in vitro parameter determination of cancer electrochemotherapy," in *2013 Transducers Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS EUROSensors XXVII)*, 2013, pp. 2157–2160.
- [34] T. Chen, *Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasive de la cellule unique : applications en cancérologie*. Toulouse 3, 2012.
- [35] T. T. Puck and P. I. Marcus, "Action of x-rays on mammalian cells," *J. Exp. Med.*, vol. 103, no. 5, pp. 653–666, May 1956.
- [36] J. E. Till and E. A. McCulloch, "A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells," *Radiat. Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 213–222, 1961.

- [37] H. S. Reinhold, "Quantitative evaluation of the radiosensitivity of cells of a transplantable rhabdomyosarcoma in the rat," *Eur. J. Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 33–42, Feb. 1966.
- [38] J. S. Danel, M. Dufour, and F. Michel, "Application of quartz micromachining to the realization of a pressure sensor," in *Frequency Control Symposium, 1993. 47th., Proceedings of the 1993 IEEE International*, 1993, pp. 587–596.
- [39] G. Voskerician *et al.*, "Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices," *Biomaterials*, vol. 24, no. 11, pp. 1959–1967, May 2003.
- [40] T. Chen, *Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasive de la cellule unique : applications en cancérologie*. Toulouse 3, 2012.
- [41] J. Zhang, K. L. Tan, and H. Q. Gong, "Characterization of the polymerization of SU-8 photoresist and its applications in micro-electro-mechanical systems (MEMS)," *ResearchGate*, vol. 20, no. 6, pp. 693–701, Sep. 2001.
- [42] Y.-J. Chuang, F.-G. Tseng, J.-H. Cheng, and W.-K. Lin, "A novel fabrication method of embedded micro-channels by using SU-8 thick-film photoresists," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 103, no. 1–2, pp. 64–69, Jan. 2003.
- [43] N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 5, pp. 2315–2319, 2006.
- [44] U. Zimmermann, "Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 694, no. 3, pp. 227–277, Nov. 1982.
- [45] T. J and R. Mp, "Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electroporation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 140, no. 1, pp. 258–266, 1986.
- [46] C. Ramos and J. Teissié, "Electrofusion: a biophysical modification of cell membrane and a mechanism in exocytosis," *Biochimie*, vol. 82, no. 5, pp. 511–518, May 2000.
- [47] J. Teissié and M. P. Rols, "An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation," *Biophys. J.*, vol. 65, no. 1, pp. 409–413, Jul. 1993.
- [48] J. Teissié and C. Ramos, "Correlation between electric field pulse induced long-lived permeabilization and fusogenicity in cell membranes," *Biophys. J.*, vol. 74, no. 4, pp. 1889–1898, Apr. 1998.

Chapitre III : Spectroscopie Diélectrique HyperFréquence de Cellules Individualisées sous Electroporation

I. Introduction

Au cours de ce dernier chapitre, nous allons présenter l'approche expérimentale suivie pour l'analyse hyperfréquence sur puce de cellules cancéreuses après électroporation ou électrochimiothérapie.

Dans un premier temps, nous positionnerons l'approche par spectroscopie hyperfréquence par rapport aux microdispositifs existants dédiés à l'analyse de l'électroporation « on-chip ». Les méthodes de détection présentées sont limitées aux techniques électriques, la diélectrophorèse et la spectroscopie d'impédance.

Au cours de la deuxième partie du chapitre, nous expliquerons les différents principes de détection et d'analyse par spectroscopie hyperfréquence résultante de l'interaction échantillon biologique/ondes électromagnétiques. Nous présenterons aussi les procédés de fabrication utilisés pour la réalisation des biocapteurs, menée dans la salle blanche du LAAS-CNRS, ainsi que les différents protocoles expérimentaux développés pour l'analyse de cellules biologiques.

La troisième et dernière partie de ce travail montrera les résultats expérimentaux obtenus par la spectroscopie diélectrique hyperfréquence des cellules biologiques. Dans un premier temps, nous présenterons les résultats de l'étude d'une cellule unique ainsi que l'analyse de l'état de viabilité suite à un traitement chimique. Ensuite, nous nous intéressons à étudier l'effet que peut induire l'application de différentes intensités de champ électrique, sur la viabilité cellulaire. Fort de ces résultats, nous effectuerons ensuite une étude de la cinétique de réponse cellulaire à un champ électrique fort, à l'aide de notre biocapteur hyperfréquence. Enfin, nous étudierons par la spectroscopie diélectrique hyperfréquence, l'effet de la combinaison de l'électroporation et d'une molécule cytotoxique utilisée en chimiothérapie classique : la bléomycine, sur les cellules cancéreuses.

Au travers de ce chapitre, l'objectif fixé est de démontrer l'apport de la spectroscopie diélectrique hyperfréquence dans le cadre de son utilisation en biologie cellulaire.

II. Analyse post-électroporation « on chip »

Alors que certaines recherches se focalisent sur le développement des microsystèmes qui effectuent à la fois l'électroporation de la cellule unique et l'analyse subséquente du contenu cellulaire [1],[2], la plupart des travaux réalisés jusqu'à présent ne s'intéresse qu'à l'analyse et à la compréhension du processus d'électroporation. L'analyse de l'intégrité de la membrane est souvent effectuée optiquement, par la mesure de la pénétration ou de la libération des marqueurs fluorescents tels que YOYO-1, Propidium Iodide, acridine orange, FLICA, calcéine AM ou CF. L'analyse de l'efficacité de la transfection est effectuée avec des gènes rapporteurs GFP et β -galactosidase, qui sont préférentiellement utilisés parce qu'ils rendent plus facile la détection optique [3].

Une intégration progressive de nouveaux moyens de mesure qui suivent l'application du champ électrique se met de plus en plus en place dans les microdispositifs d'électroporation. Gao [1] et McClain [2] ont montré qu'il était possible de combiner, sur un seul microcomposant, l'électroporation avec l'analyse du contenu intracellulaire par l'électrophorèse capillaire. Pour cela, de nouveaux dispositifs qui intègrent l'électroporation et l'analyse subséquente sont en train d'émerger. A titre d'exemples, nous trouvons des dispositifs intégrant la chromatographie, l'impédancemétrie, l'électrophorèse isoélectrique, la spectroscopie de masse, etc.

Des méthodes électriques sont en effet déjà utilisées pour évaluer l'effet de l'électroporation sur l'intégrité de la membrane des cellules ou tissus traités. Lorsque l'électroporation est appliquée aux cellules, une perméabilisation membranaire se produisant sur une courte durée se traduit par une modification des propriétés diélectriques globales de la cellule [4]. L'effet des impulsions électriques sur les cellules en suspension a été étudié par des mesures de la conductance [5], [6], ou par des mesures de l'impédance [7]. D'autre part, Saulis et al [8], [9], ont utilisé des microélectrodes détectant la libération du potassium K^+ intracellulaire après électroporation des cellules en suspension. Il existe des microcomposants d'analyse qui sont capables de détecter certains phénomènes comme la variation de l'impédance dans la zone de l'électroporation. La technique de la spectroscopie d'impédance (sur une gamme de 1 kHz – 100 MHz) a été utilisée pour mettre en évidence les changements des propriétés diélectriques d'une population de cellules électroporées [10].

Sur les grandes échelles de temps, les propriétés internes des cellules sont modifiées à cause du transfert d'ions à travers la membrane. Par conséquent, le suivi des propriétés diélectriques par spectroscopie d'une cellule unique après électroporation, peut être utilisée comme une technique de détection permettant l'étude de l'impact de l'interaction cellule-champ électrique et le changement physiologique qui en résulte. La spectroscopie diélectrique hyperfréquence, qui permet cette analyse, présente les avantages d'être rapide, directe tout en conservant la nature non invasive du procédé.

Par la suite, nous allons détailler quelques types de microdispositifs utilisés pour l'analyse post-électroporation « on-chip ». La détection se base essentiellement sur :

1. la diélectrophorèse DEP,
2. la spectroscopie d'impédance,
3. la spectroscopie diélectrique hyperfréquence,

II.1 La diélectrophorèse

La diélectrophorèse (DEP) est un phénomène dans lequel une force est exercée sur une particule diélectrique lorsqu'elle est soumise à un champ électrique non uniforme. Toutes les particules, même les non-chargées, présentent une activité diélectrophorétique en présence du champ électrique. La diélectrophorèse dépend des propriétés diélectriques des particules et du milieu dans lequel elles baignent, permettant la manipulation sélective de ces dernières [11]. Outre la manipulation et la séparation des cellules, la mesure de la réponse diélectrophorétique des cellules permet d'étudier leurs propriétés diélectriques. La DEP a été largement utilisée pour séparer différents types cellulaires en se basant sur la différence dans leur propriétés diélectriques et leurs géométries [12], [13], [14], [15].

Salimi [16] montra la combinaison de deux fonctions sur un seul microcomposant fluide: l'électroporation des cellules uniques et la mesure des propriétés diélectriques par la diélectrophorèse immédiatement après électroporation. Cela fournit des informations précieuses sur le flux d'ions cellulaire après l'électroporation et sur la façon dont le champ électrique externe affecte la membrane cellulaire. En outre, les effets des différents paramètres d'impulsions, y compris la durée des impulsions, l'amplitude, le nombre total d'impulsions, et la fréquence de ces impulsions peuvent être étudiés afin d'optimiser l'électroporation pour un type précis d'application ou de cellules. La Figure 60 (a) montre le composant microfluidique avec le réseau d'électrodes métalliques. Il présente des électrodes A responsables à la fois de

l'application du champ électrique aux cellules (électroporation) et de la génération d'une force DEP sur celles-ci. Les électrodes S1 et S2 sont des électrodes de mesure de l'impédance utilisées pour détecter les cellules et mesurer leurs réponses impédancemétriques avant et après électroporation. Un exemple de résultats obtenus par ce type de composant est présenté à la Figure 60 (b). Le graphe représente la variation de l'index de force lié à la réponse DEP en fonction du temps après électroporation (4 pulses de 3 kV/cm, de durée 100 μ s et de fréquence 20 Hz). Une diminution importante de l'index de force est remarquée, une minute après l'EP, ce qui reflète un changement des propriétés diélectriques de la membrane cellulaire et du cytoplasme.

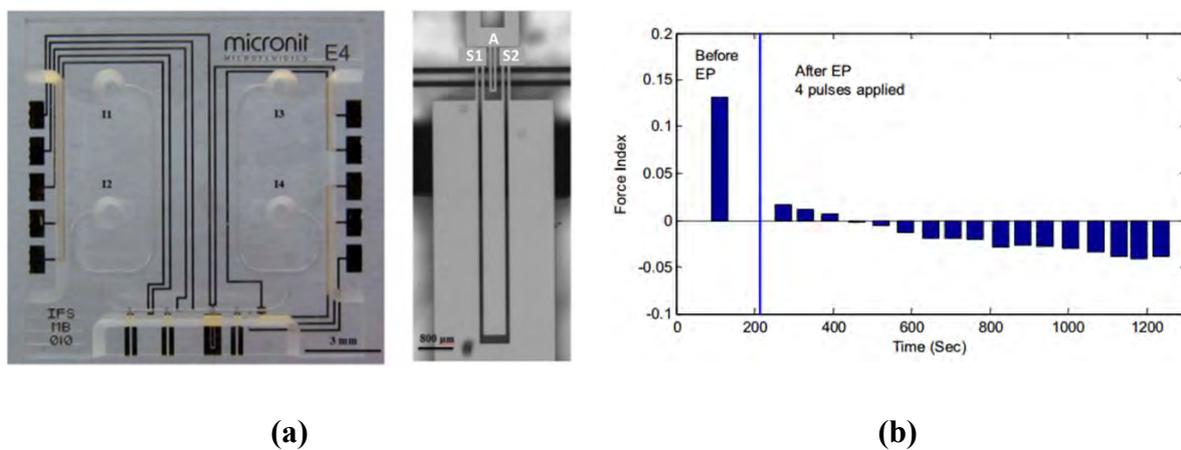


Figure 60 : (a) Le composant microfluidique avec les électrodes intégrées conçues pour la détection, l'électroporation et l'étude de la DEP des cellules uniques. (b) L'index de force DEP en fonction du temps après électroporation d'une cellule unique [16].

D'autres chercheurs ont utilisé la DEP pour séparer les cellules électroporées des cellules non-électroporées. La Figure 2 [17] représente la séparation des cellules (électroporées ou pas) par DEP à une fréquence de 2 MHz. Les cellules électroporées présentent des propriétés géométriques et électriques différentes de celles des cellules non-électroporées. Pour cette raison, elles ne répondraient pas de la même manière au champ électrique non-uniforme (DEP). En effet, selon la façon dont les cellules s'arrangent autour des électrodes, il est possible de déterminer si elles sont électroporées (rassemblement entre les deux électrodes) ou non (déplacement vers les bords des électrodes).

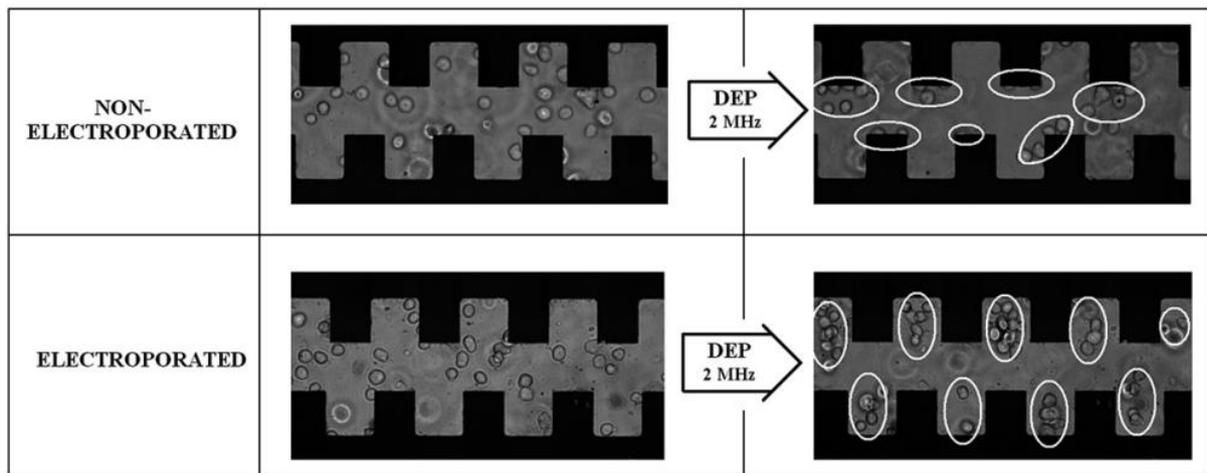


Figure 61: Séparation de cellules électroporées ou non-électroporées par DEP [17].

Les travaux de l'équipe de Le Pioufle étudient l'électroporation cellulaire à l'échelle micrométrique en combinant la diélectrophorèse à l'électrorotation. En effet, la cellule est capturée par la DEP tout en évaluant, simultanément, ses propriétés diélectriques (permittivité et conductivité du cytoplasme et de la membrane) par un champ électrique rotationnel, avant et après électroporation (Figure 62). Cette méthode a été utilisée sur des cellules uniques (humaines et murines) [18] et avec des sphéroïdes (des cellules assemblées en 3D) [19].

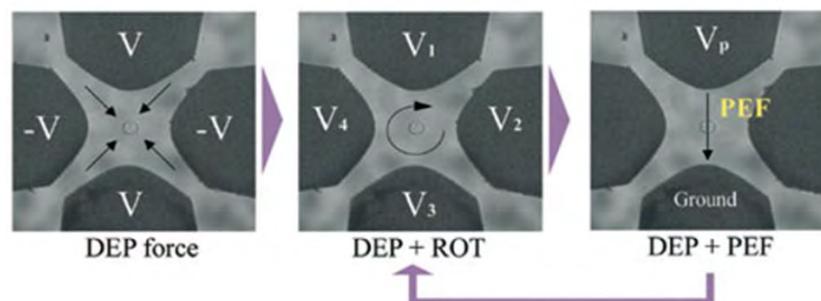


Figure 62 : Capture de la cellule au centre des électrodes en appliquant la nDEP (DEP négative) et évaluation des propriétés diélectriques cellulaires par l'électrorotation ROT avant et après électroporation PEF [18].

II.2 La spectroscopie d'impédance

La spectroscopie électrique d'impédance est une méthode d'analyse sans marquage utilisée pour étudier les propriétés diélectriques des cellules rendant compte de la physiologie, du type et de la taille de ces dernières [20],[21],[22]. Elle est aussi utilisée *in vivo* [23]. La variation du courant qui circule entre les électrodes, lors du passage d'une cellule, est mesurée et analysée pour déterminer les propriétés diélectriques de cette dernière. La fréquence de la tension alternative appliquée est typiquement entre quelques kHz à quelques dizaines de MHz.

Une gamme de fréquence peut être appliquée et permet d'enregistrer un spectre d'impédance. L'impédance est intrinsèquement un paramètre complexe ; elle comporte une partie réelle et une partie imaginaire et par conséquent, les spectres d'impédance sont généralement affichés sous la forme d'amplitude et de phase.

Les avantages de l'utilisation de la spectroscopie d'impédance pour l'évaluation des dommages cellulaires après l'électroporation résident dans la simplicité de concevoir et de fabriquer des microcomposants réalisant à la fois l'électroporation et la détection d'impédance. Cette méthode est bien adaptée pour évaluer le processus de l'électroporation parce qu'aux basses fréquences, l'impédance reflète les propriétés de la membrane cellulaire (Figure 63). A ces fréquences, la cellule est en effet totalement isolée par la membrane et le courant ne parvient pas à pénétrer dans la cellule. L'effet isolant de la membrane cellulaire diminue après électroporation et une partie du courant peut circuler alors à travers la cellule. Cela se traduit par une variation de l'impédance globale mesurée.

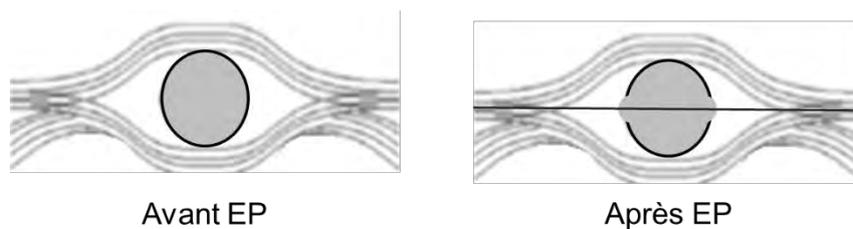


Figure 63 : Les lignes du courant traversant une cellule dans la gamme du kHz avant et après électroporation.

Plusieurs travaux sont basés sur ce type de composants. A titre d'exemple, Muller et al [24] ont suivi la résistance transépithéliale des fibroblastes adhérents avant et après électroporation par la spectroscopie d'impédance (Figure 64.a). Ils ont détecté une diminution dans la valeur de la résistance électrique (transmonolayer resistance TMR) (Figure 64.b) après application d'un champ électrique modéré, suivie par un retour graduel à la valeur initiale. Cela reflète la perméabilisation réversible. En appliquant des valeurs plus élevées (ex: 7 V), une perméabilisation irréversible prend place. De plus, Sanchez et al. [25] ont développé un dispositif contenant un ensemble d'électrodes rassemblées en spirale pour appliquer l'électroporation in-situ à une monocouche de cellules adhérentes. Ce dispositif, outre ses capacités d'électroporation, est conçu pour effectuer des mesures de spectroscopie d'impédance, pendant l'électroporation.

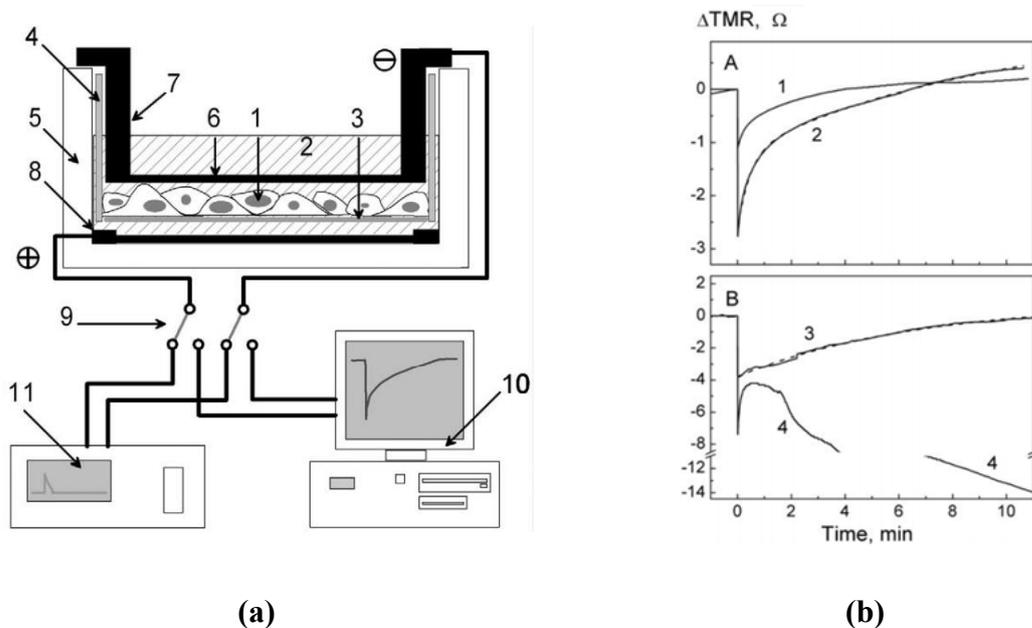


Figure 64: (a) Illustration schématique du système expérimental utilisé pour l'électrotransfection des cellules adhérentes en réalisant simultanément des mesures de l'impédance électrique, (b) Graphes montrant le changement de la résistance électrique (transmonolayer resistance TMR) des cellules après exposition à 3, 4, 5 et 7 Volts (courbe 1, 2, 3 et 4, respectivement) [24].

De plus, la spectroscopie d'impédance est utilisée pour étudier des cellules en suspension soumises à l'électroporation. Bürgel et al. ont présenté une plate-forme microfluidique pour la manipulation, l'électroporation et l'analyse sans marquage de cellules humaines en suspension [26]. Le composant, présenté à la Figure 65, est composé d'une série d'électrodes qui sert à la fois pour l'électroporation et pour le suivi de l'impédance électrique des cellules. La Figure 66 (a) montre les graphes de la variation de l'amplitude et du déphasage de la tension interélectrodes d'analyse au passage d'une cellule avant et après électroporation. Un suivi microscopique a été effectué afin de vérifier la réussite de l'électroporation. Les cellules étaient de plus mises en présence de la calcéine AM (marqueur de viabilité) et de l'iodure de propidium (marqueur de perméabilité), avant et après électroporation, comme le montre la Figure 66 (b).

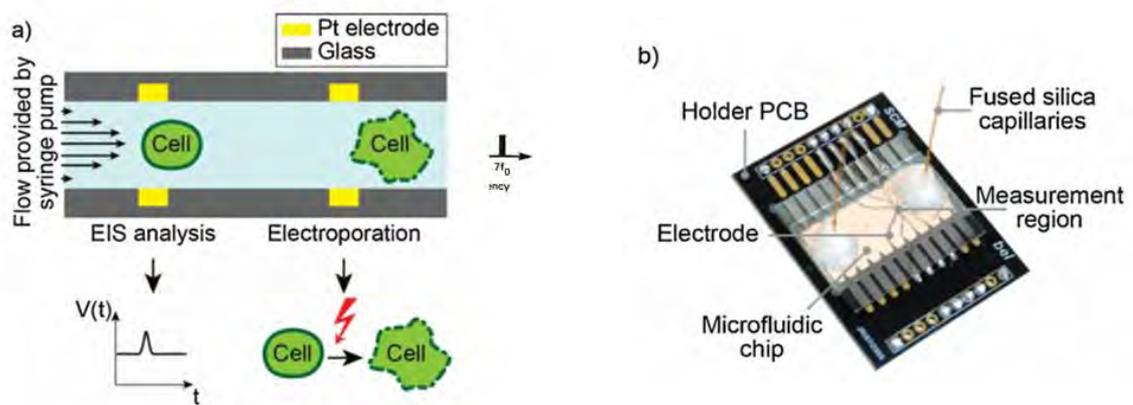


Figure 65 : (a) Schéma du microcomposant fluïdique utilisé pour l'électroporation et pour la mesure de l'impédance électrique des cellules en suspension. (b) Photo du composant [26].

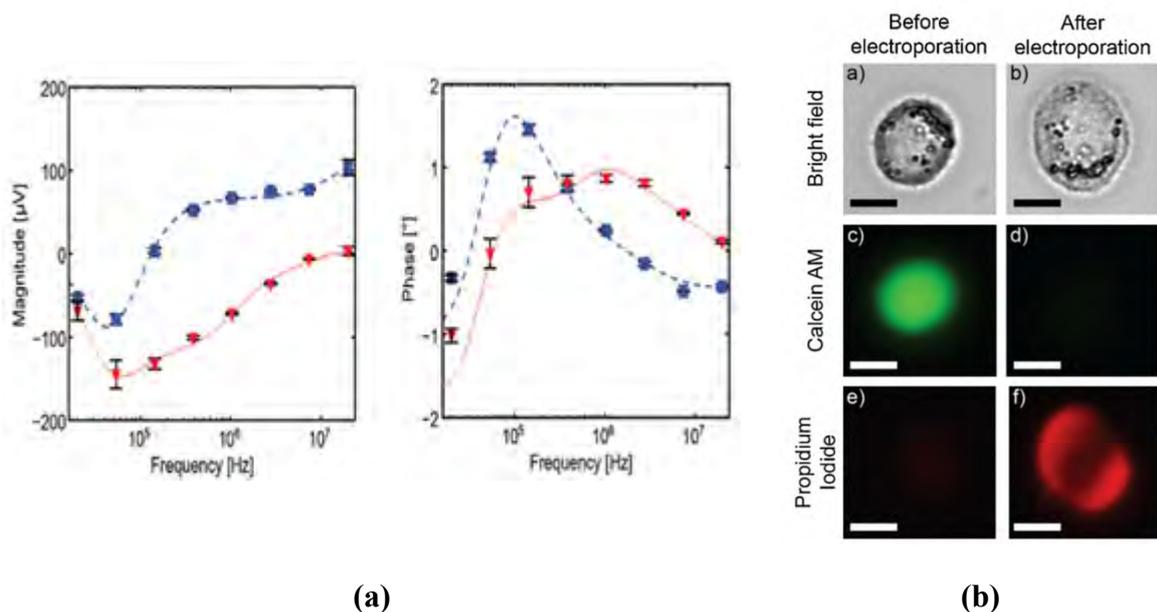


Figure 66 : (a) Variation des paramètres électriques (amplitude et déphasage du signal) avant et après électroporation. (b) Images microscopiques de la cellule avant et après électroporation, en lumière blanche et en fluorescence (calcéine AM et Iodure de Propidium) [26].

La spectroscopie d'impédance est une méthode convenable aussi pour l'analyse des effets du champ électrique sur des tissus cellulaires. Le travail de Trainito et al [27] montre un suivi de la bio-impédance pour quantifier et analyser des changements induits par le champ électrique pulsé, dans un tissu cellulaire végétal. La Figure 67.a montre la structure d'une cellule et la représentation de son modèle électrique, avec les propriétés diélectriques de sa membrane plasmique et de son milieu intracellulaire. Lors de l'application d'un champ électrique externe, une déstabilisation de la membrane a lieu, un phénomène pouvant être monitoré par la spectroscopie d'impédance. La Figure 67.b montre un exemple de spectres représentant le module de l'impédance avant et après l'application des impulsions de champ électrique perméabilisant les cellules.

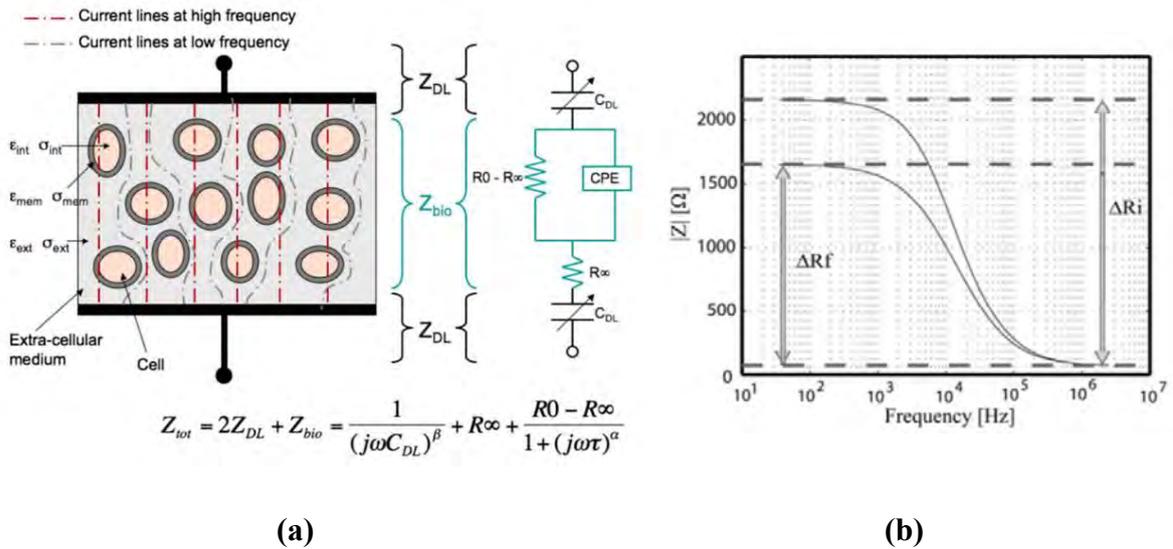


Figure 67 : (a) Structure de la cellule et son modèle électrique correspondant, (b) Exemple du module de l'impédance avant et après application des impulsions du champ électrique induisant la perméabilisation [27].

II.3 La Spectroscopie Diélectrique Haute Fréquence

La Spectroscopie Diélectrique HyperFréquence SDHF est une approche de détection qui consiste à appliquer des ondes hyperfréquences (40 MHz jusqu'à 40 GHz) à des échantillons biologiques et de mesurer les dispersions. Elle présente plusieurs avantages tels que l'utilisation d'ondes non-ionisantes pour une analyse non-intrusive, directe, sans contact et sans marquage. Grâce à l'évolution des microtechnologies et de leur utilisation dans différents domaines, nous pouvons miniaturiser des circuits électroniques et les coupler à la SDHF afin d'étudier les cellules biologiques. Cette méthode permet d'extraire les propriétés diélectriques hyperfréquences de différents échantillons biologiques en utilisant des volumes très faibles (micro/nano). Ces propriétés sont représentées par les parties réelle (ϵ') et imaginaire (ϵ'') de la permittivité complexe de l'échantillon étudié. Ces deux paramètres sont considérés comme offrant une signature électrique spécifique de l'échantillon biologique. Il existe de nombreux travaux qui étudient l'électroporation d'un point de vue diélectrique. Le travail de Garner et al. [28] montre une diminution dramatique de la conductivité en S/m du cytoplasme (Figure 68.a) et du nucléoplasme (Figure 68.b) des cellules Jurkat exposées aux impulsions électriques nanosecondes nsPEFs, montrant un transport des ions à l'extérieur du noyau et de la cellule, ce qui est en accord avec les travaux de Chen et al. [29], qui ont montré une augmentation de la conductivité de la suspension cellulaire après électroporation.

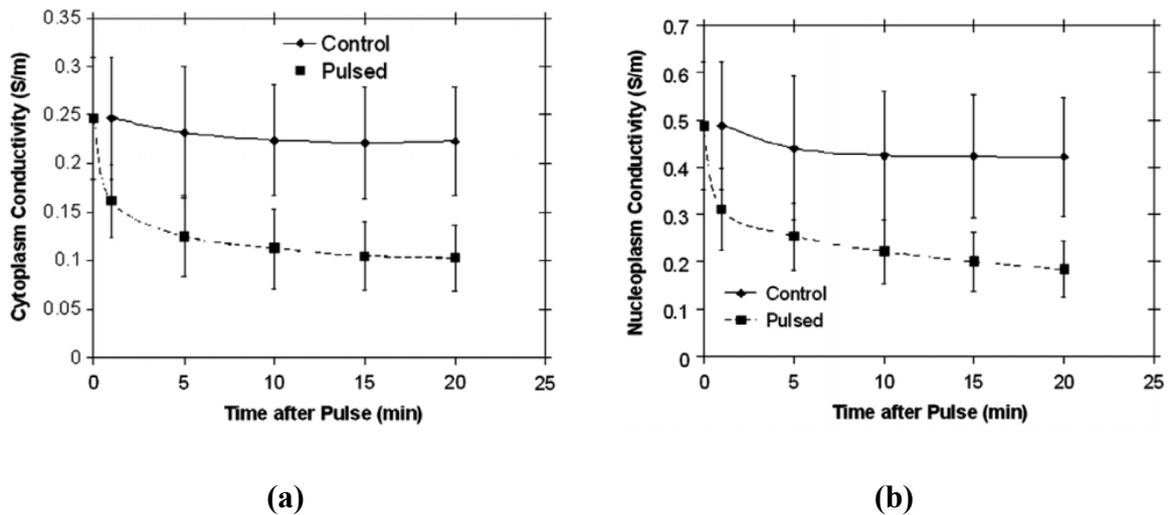


Figure 68: (a) Conductivité du cytoplasme et (b) du nucléoplasme en fonction du temps après application des nsPEF [28].

III. Analyse hyperfréquence de cellules uniques

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet de différents traitements chimiques, électriques et électro-chimiques appliqués aux cellules humaines à l'aide de la SDHF. En travaillant dans le domaine des micro-ondes, la membrane de la cellule devient transparente [30], et les champs électromagnétiques pénètrent profondément dans la cellule ce qui permet d'interagir directement avec le contenu intracellulaire (Figure 63). En effet, en basses fréquences, la cellule est totalement isolée par la membrane et le courant ne parvient pas à pénétrer dans la cellule. L'effet isolant de la membrane cellulaire diminue à mesure que la fréquence augmente. Une partie du courant peut circuler alors à travers la cellule. A hautes fréquences, la membrane cellulaire est court-circuitée et le courant peut passer à travers la membrane et atteindre le domaine intracellulaire (le cytoplasme).

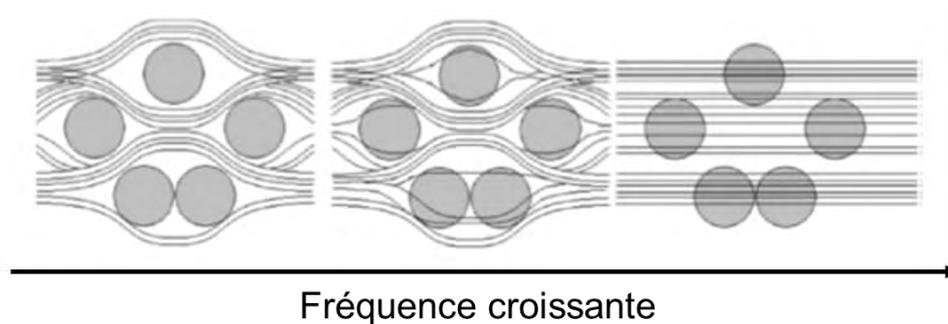


Figure 69 : Les lignes du courant traversant une suspension cellulaire pour différentes fréquences du courant électrique [31].

III.1 Détection capacitive HF

A ce stade du manuscrit, il est essentiel d'expliquer la façon dont notre biocapteur fonctionne, la façon dont les mesures sont effectuées et les données sont extraites.

Lorsqu'une onde électromagnétique entre en contact avec un milieu diélectrique, de l'interaction entre les deux résulte en une altération de la propagation de l'onde qui reflète les propriétés diélectriques du milieu traversé (Figure 70). Une onde incidente émise à une extrémité de la structure de mesure sera ainsi différente de celle extraite à l'autre extrémité. Cette différence sera mesurée par un analyseur de réseau vectoriel. Cette modification se traduit par un déphasage et une atténuation de la transmission de l'onde :

- Le retard dans la transmission, appelé déphasage, est relié à la partie réelle de la permittivité ϵ' , et exprimé en degrés. Ce paramètre est donc influencé par la capacitance du milieu.
- L'atténuation dans la transmission ou la diminution de l'amplitude de l'onde, est reliée à la partie imaginaire de la permittivité ϵ'' , et exprimée en dB. Ce paramètre quant à lui, est influencé par la conductance du milieu étudié.

Ces deux paramètres reflèteront alors l'état interne de la cellule, au-delà de la membrane plasmique, tout en effectuant des analyses sans marquage et sans contact. Afin de caractériser ces 2 paramètres, nous avons utilisé un microdispositif de détection capacitive adapté aux HF et présenté en Figure 70.

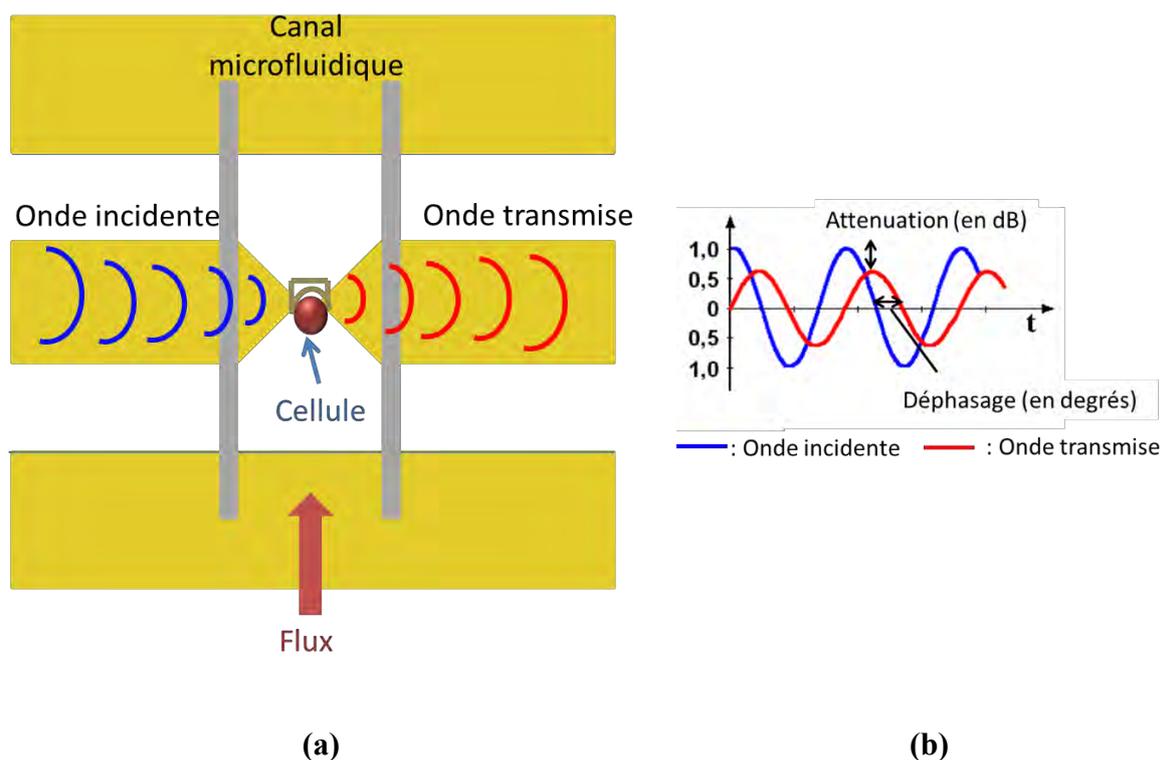


Figure 70 : (a) Principe de l'interaction des ondes électromagnétiques avec l'échantillon biologique au sein de notre microcomposant cellule unique. L'onde incidente est représentée en bleu et l'onde transmise modifiée en rouge. (b) L'effet de cette l'interaction sur l'onde électromagnétique.

Une des caractéristiques majeures de ce dispositif est que l'échantillon biologique analysé est une cellule (unique) et les procédures de mise en œuvre, explicitées plus loin, permettent une caractérisation des composantes capacitives et conductives de la cellule unique analysée.

Avant de commencer toute caractérisation des échantillons, un calibrage « Short-Open-Load-Through » (SOLT) full 2-port sur kit de calibration Cascade Microtech CSR-8 est nécessaire et cela afin de positionner les plans de référence des mesures au niveau du bout des micro-pointes contactant les accès coplanaires de notre composant.

De plus, les accès coplanaires et les murs en SU-8 du microcanal fluide influencent la propagation des ondes électromagnétiques. Pour cela, un second calibrage est essentiel: il consiste à soustraire les effets de ces éléments afin de ne mesurer que la permittivité relative de l'échantillon cellulaire étudié localisé entre les électrodes. Dans ce but, nous avons intégré des structures de calibrage directement sur le substrat : élimination de l'effet des accès coplanaires, des murs du canal et des transitions [32].

III.2 Les avantages de l'étude de cellule unique

De nombreuses études biologiques sont effectuées sur des groupes de cellules en supposant que toutes les cellules d'un "type" particulier sont identiques. Toutefois, des études récentes sur des cellules individuelles révèlent que cette hypothèse est incorrecte. Les cellules individuelles au sein de la même population peuvent varier considérablement. C'est ce qu'on appelle "individualité" des cellules au sein de la population [33]. Ces différences peuvent avoir des conséquences importantes sur la compréhension de certaines maladies, du fait que certaines cellules singulières jouent un rôle fondamental dans la pathogénèse de la maladie, de son évolution au cours du temps et dans la sensibilité des cellules aux médicaments. Les approches expérimentales qui ne traitent que des caractéristiques au niveau de la population peuvent masquer ces différences cruciales. De nouvelles approches de l'analyse de cellules uniques sont donc nécessaires pour découvrir les principes biologiques fondamentaux et par conséquent, améliorer la détection et le traitement des maladies.

Au cours des dernières décennies, un certain nombre de techniques, qui permettent la mesure des propriétés diélectriques des particules biologiques en suspension, a été développé. La plupart de ces techniques sont limitées par le fait qu'elles fournissent seulement une valeur moyenne des propriétés diélectriques d'un ensemble de particules. De nos jours, avec l'utilisation des techniques de microfabrication en biologie avec un objectif d'aboutir le Lab-on-chip, il est devenu possible d'effectuer des expériences de spectroscopie diélectrique sur des particules biologiques uniques dans un milieu physiologique liquide. En outre, l'utilisation de la détection à base d'ondes HF au niveau de la cellule unique a déjà été démontrée [34],[35]. Elle permet l'évaluation de l'hétérogénéité des cellules en suspension, ce qui est d'un grand intérêt dans la recherche et la compréhension des processus biophysiques. Cette technique, aussi bien utilisée avec des cellules humaines [36], qu'avec des levures, permet de distinguer la concentration (Figure 71.a) et l'état de viabilité biologique (Figure 71.b) [37].

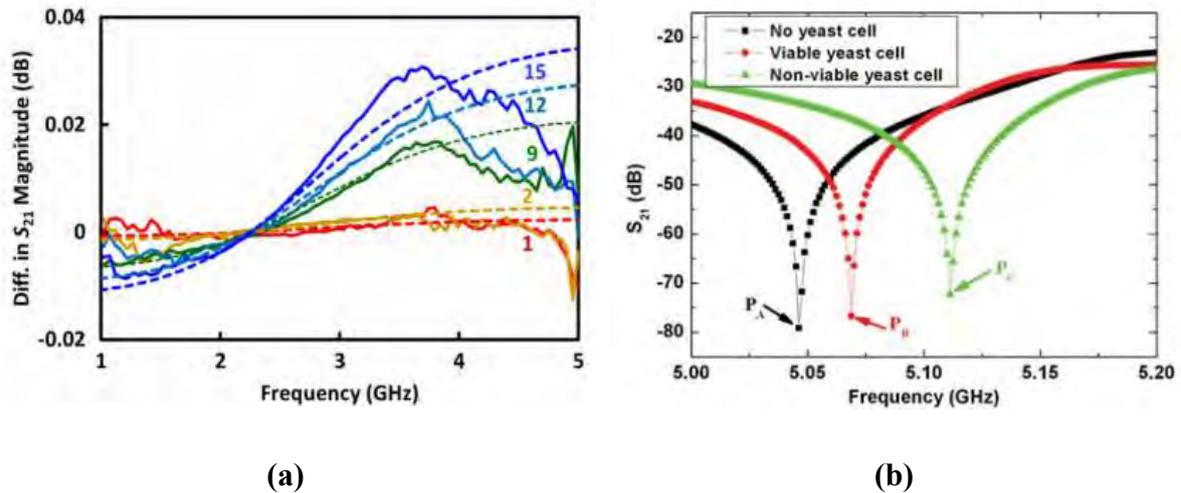


Figure 71 : Paramètre S_{21} mesuré pour (a) différents nombres de cellules Jurkat vivantes [36] et pour (b) des levures vivantes ou mortes [37].

Par la suite, nous présenterons la procédure de fabrication de notre composant microfluidique à « cellule unique » que nous utiliserons pour nos travaux, ainsi que le protocole expérimental nécessaire pour faire les mesures et les analyses qui suivent.

III.3 Microfabrication du composant hyperfréquence pour une cellule unique

Le biocapteur utilisé tout au long de ce chapitre est réalisé, comme celui du chapitre 2, avec des procédés standards de microfabrication, couramment utilisés au LAAS-CNRS, tels que la photolithographie, la gravure, l'assemblage, etc. Ce microcomposant a été développé par Tong CHEN, au sein de l'équipe MH2F du LAAS [38]. Il est constitué de deux parties bien distinctes : le circuit hyperfréquence avec le guide d'onde coplanaire métallique en or et le canal microfluidique avec des murs fabriqués d'une résine photosensible négative : la SU-8.

- 1- Le circuit hyperfréquence est un guide d'onde coplanaire dont la configuration se présente en 3 électrodes : masse - signal - masse.
- 2- Le canal microfluidique est constitué de murs en SU-8 et ces derniers sont surmontés d'un capot en SU-8, réduisant de cette façon l'évaporation des liquides à l'intérieur du canal, ce qui pourrait perturber les mesures.

Par la suite, je vais insister sur les différences de fabrication par rapport au composant utilisé au chapitre 2, lors de l'élaboration du canal microfluidique réalisé de la résine SU-8. Nous y intégrons un bloqueur mécanique pour la capture d'une cellule unique et des capots en SU-8 pour limiter l'évaporation des liquides à l'intérieur des canaux (Figure 72).

L'élaboration de la partie microfluidique est composée de trois parties : les murs du canal, le bloqueur mécanique d'une cellule unique et le capot (ou le toit) du canal.

L'ensemble de ces parties est fabriqué, par photolithographie, avec la résine photosensible SU-8, utilisée dans d'autres travaux pour la fabrication des micro-canaux [39], [40].

En vue d'un blocage d'une cellule unique lors des caractérisations, il a été envisagé de fabriquer un bloqueur mécanique, qui sera positionné au centre du canal microfluidique, au-dessus de la zone active de notre capteur. Ce micro-bloqueur est lui aussi fabriqué en SU-8.

Afin d'obtenir un composant correctement fermé, il est nécessaire de mettre un capot (ou un toit) au-dessus des murs en SU-8, et cela s'avère être extrêmement important pour avoir un faible taux d'évaporation et ainsi avoir des mesures stables au fil du temps et répétable. Comme pour les murs, le capot est fabriqué en résine SU-8 et l'adhérence entre ces deux parties a été optimisée pour être homogène. Deux trous d'accès, Inlet pour l'entrée du liquide et Outlet pour l'évacuation à la fin de l'étude, sont prévus sur le capot.

A l'issue de ces étapes de préparation, le composant est maintenant prêt pour l'utilisation avec des échantillons biologiques.

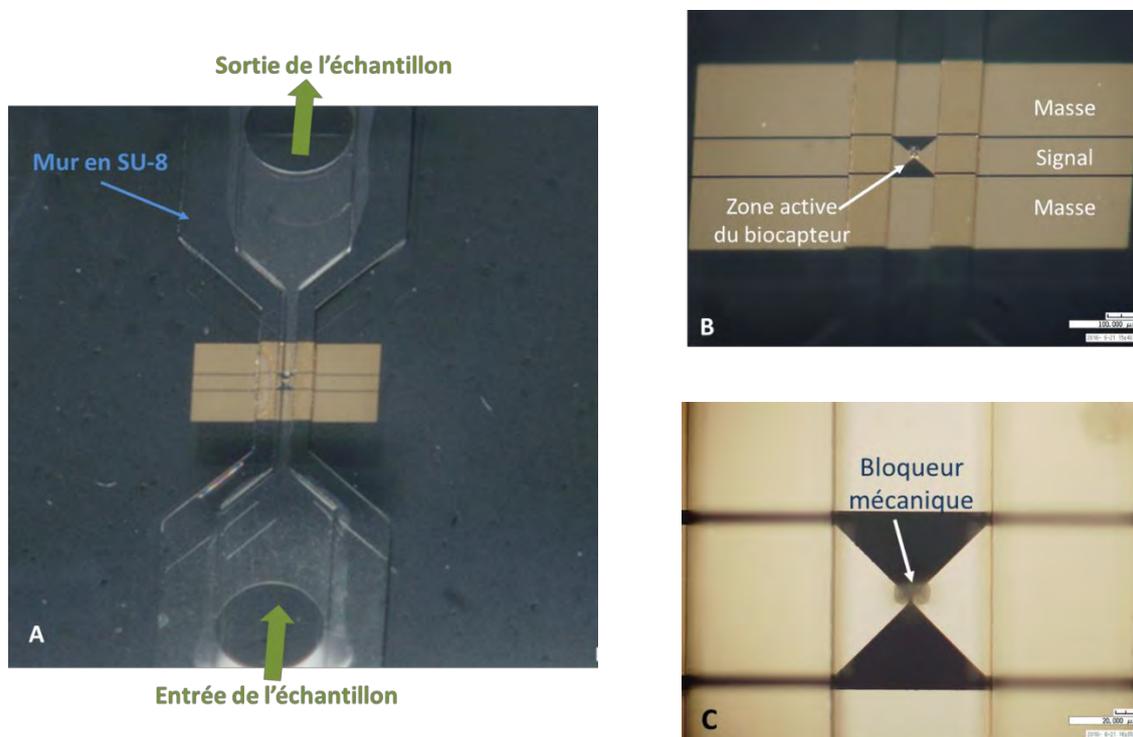


Figure 72 : Images présentant le micro-composant cellulaire unique, fabriqué au LAAS-CNRS, avec les différentes parties : le canal microfluidique, les électrodes et le bloqueur mécanique.

III.4 Matériels et méthodes

III.4.1 Dispositif expérimental

Notre dispositif expérimental est composé des éléments suivants:

1. Le biocapteur microfluidique de caractérisation HF de cellule unique
2. Un support sous vide pour installer les microcomposants fluidiques
3. Une table anti-vibration
4. Une pousse seringue de précision pour l'injection contrôlée de l'échantillon biologique
5. Des sondes coplanaires ou micro-pointes ($|Z|$ Probe, CascadeMicrotech, Aschheim, Germany)
6. Un analyseur de réseau vectoriel (ARV) et son écran de visualisation externe pour surveiller les changements sur les paramètres S au cours des mesures
7. Une caméra CCD située au-dessus de la station de mesures pour observer le positionnement des pointes et le déroulement de la capture de la cellule unique
8. Un ordinateur pour le contrôle de l'acquisition et le traitement des données.

III.4.1.1 L'analyse HF vectorielle

L'analyseur de réseau vectoriel ARV que nous avons utilisé pendant nos travaux, est le modèle Anritsu 37397C. Il couvre une gamme de fréquence allant de 40 MHz jusqu'à 65 GHz, mais pour nos mesures, nous nous limiterons à 40 GHz. L'analyseur de réseau est en charge d'effectuer les mesures électriques sur une gamme de fréquence, qui représentent la variation entre les signaux injectés par ce dernier et les signaux réfléchis et transmis par l'échantillon étudié [41]. Les deux grandeurs vectorielles décrivant les phénomènes de transmission et de réflexion mis en jeu (voir les définitions ci-dessous) sont alors à relier aux propriétés spécifiques de l'échantillon biologique étudié (Figure 73).

- Le coefficient de transmission T, noté S_{21} , qui représente le rapport entre l'onde transmise et l'onde incidente

$$\text{Coefficient de transmission } T = S_{21} = \frac{b_2}{a_1}$$

- Le coefficient de réflexion Γ , noté S_{11} , qui représente le rapport entre l'onde réfléchie et l'onde incidente

$$\text{Coefficient de réflexion } \Gamma = S_{11} = \frac{b_1}{a_1}$$

En terme de mesures HF, ces coefficients sont appelés les paramètres de dispersion ou paramètres S (Scattering parameters). Ils sont exprimés sous la forme S_{xy} où x représente le port de sortie et y le port d'entrée de l'onde, comme il est décrit ci-dessus et montré à la Figure 73.

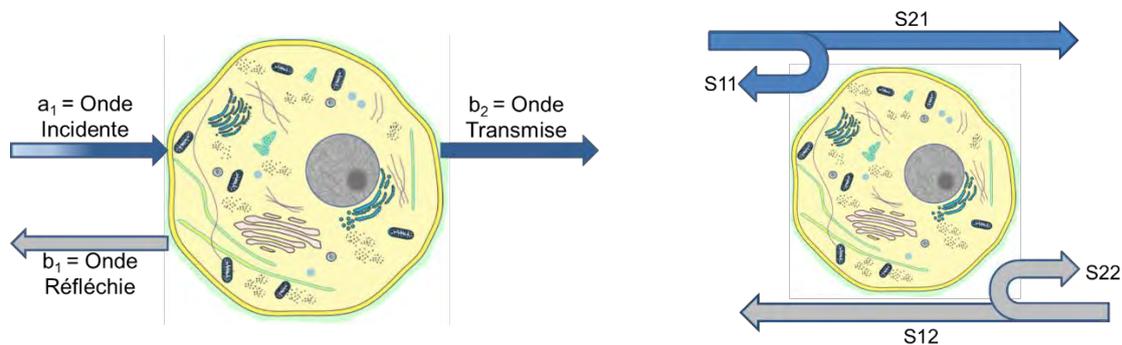


Figure 73 : Principe de transmission et de réflexion des ondes hyperfréquences et expression en terme de paramètres S [41].

III.4.1.2 La microfluidique

Le point intéressant de notre technique est sa capacité à manipuler des cellules uniques et à les mesurer directement dans leur milieu de culture liquide. Pour cela, une goutte de $1 \mu\text{L}$ de la suspension cellulaire est injectée à l'entrée du canal microfluidique. Au centre du microcanal, un dispositif de piégeage assure la capture d'une cellule unique grâce à la force hydrodynamique : un gap d'air de $3 \mu\text{m}$ au-dessous du bloqueur permet le passage d'une fraction du fluide. Ce passage va créer des lignes de courant fluidique et favorise en conséquence la conduite d'une cellule vers le piège. Les autres cellules vont alors dévier de part et d'autre du piège [38].

III.4.1.3 Acquisition, enregistrement et traitement des données

Après toutes les étapes de préparation du composant et du calibrage complet, il est maintenant temps de lancer la campagne de mesure de notre échantillon d'intérêt.

Dans un premier temps, nous injectons la suspension cellulaire puis une cellule est bloquée et les paramètres S sont acquis lorsque la stabilisation est électriquement observée. Ensuite, la cellule est évacuée et le milieu de culture est mesuré seul afin de calculer le contraste cellule/milieu par la méthode différentielle (expliquée dans le paragraphe suivant).

L'ensemble des étapes successives est résumé dans la Figure 74.

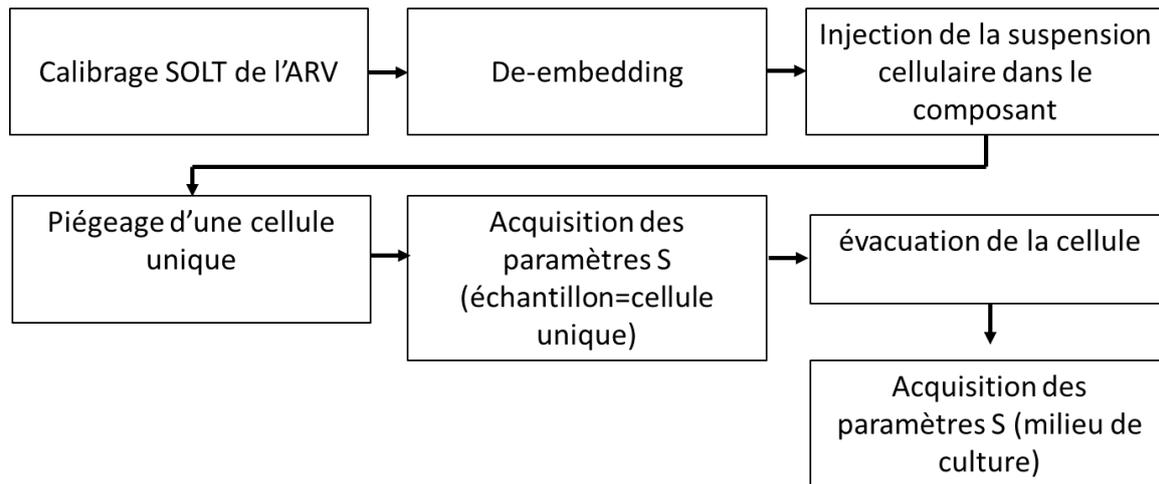


Figure 74 : Les étapes chronologiques des étapes de mesures.

III.4.1.4 Approche différentielle

Tous les paramètres S issus des mesures sont stockés dans des fichiers au format ‘.s2p’ ; l’analyse et le traitement des données sont intégrés dans le logiciel Matlab (MathWorks) afin d’extraire les composantes capacitives (C) et conductives (G) effectives des différents échantillons. Vu que $C_{\text{échantillon}}$ et $G_{\text{échantillon}}$ sont proportionnels aux contrastes des parties réelle et imaginaire de la permittivité relative de l’échantillon, il sera donc pertinent d’étudier ces deux paramètres et leur contraste vis-à-vis d’un milieu de référence (milieu ne contenant pas l’échantillon étudié : milieu de culture sans cellule dans notre cas). Ceci nous permettra d’observer les modifications directement liées à la présence de l’échantillon. La méthode différentielle est particulièrement intéressante parce qu’elle prend en compte la dérive de la chaîne de mesure au cours du temps, tout en améliorant la répétabilité et la reproductibilité des tests. De ce fait, nous procédons au calcul du contraste de capacitance et de conductance de la cellule par rapport au milieu référence (milieu de culture), selon les équations suivantes:

$$\Delta C = C_{\text{cellule}} - C_{\text{milieu de référence}}$$

$$\Delta G = G_{\text{cellule}} - G_{\text{milieu de référence}}$$

Le principe du calcul des contrastes est schématisé dans la Figure 75. Les spectres de contraste obtenus à l’issue de ce calcul sont présentés en fonction de la fréquence.

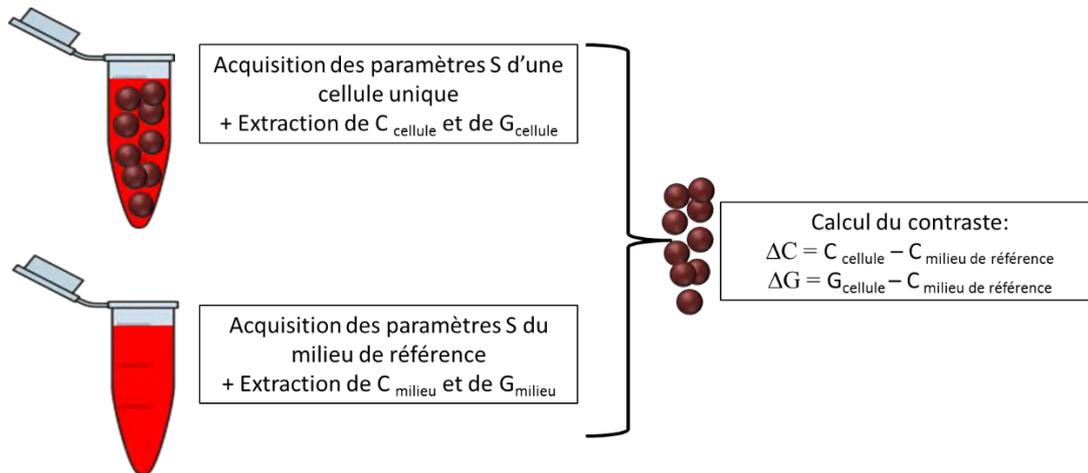


Figure 75 : Méthode de détermination des contrastes de capacitance (ΔC) et de conductance (ΔG) des cellules étudiées.

L'ensemble des procédures décrites nous permettent d'effectuer la spectroscopie diélectrique hyperfréquence SDHF, délivrant les spectres de ΔC et de ΔG sur une large gamme de fréquence du domaine hyperfréquence.

III.4.2 Matériels biologiques utilisés

Les cellules THP1 (ATCC#TIB-202) sont des cellules humaines qui dérivent d'une leucémie des monocytes [42]. Elles ont été choisies pour cette partie de l'étude puisque ce sont des cellules cultivées en suspension (Figure 76) ce qui facilitera leur manipulation fluïdique. Le milieu de culture utilisé avec cette lignée est le RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium). L'autre lignée cellulaire étudiée est la lignée des cellules HCT116 (ATCC # CCL-247), déjà présentée au cours du deuxième chapitre, mais utilisées dans ces expérimentations sous leur forme non adhérente.

Le milieu de culture est complétement avec du sérum de veau fœtal décomplémenté SVF à hauteur de 10% et d'un mélange d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine: 100 U/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO_2 .

Les traitements chimiques utilisés sont : (1) la saponine qui est fournie par Sigma-Aldrich (Lyon, France) et la bléomycine fournie par Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

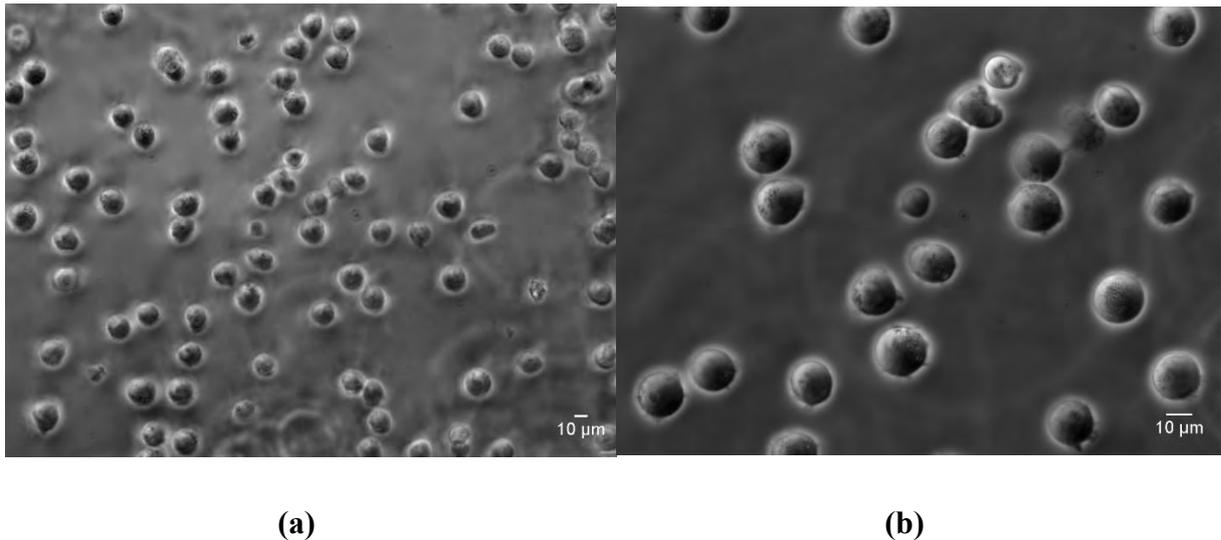


Figure 76 : Photographies des cellules THP1 avec microscope optique (a) avec grossissement x20 et (b) avec grossissement x40.

IV. Résultats expérimentaux

Dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus avec le biocapteur cellule unique sur des échantillons cellulaires. Ainsi, l'étude de l'évolution de la signature électrique en fonction de différentes conditions de traitement est présentée. D'une part, nous étudierons l'effet d'un détergent, la saponine, qui solubilise les molécules de cholestérol de la membrane plasmique, et sert de contrôle positif. D'autre part, nous investiguerons l'effet de l'électroporation avec différentes conditions sur la viabilité cellulaire, ainsi que l'effet de l'électrochimiothérapie avec une molécule cytotoxique : la bléomycine.

IV.1 Protocoles et conditions de mesure

Avant chaque série de mesures, les cellules sont préparées selon un protocole spécifique (Figure 77):

- Les cellules THP1 en suspension, ne nécessitant pas une exposition à la trypsine, sont directement comptées, lavées et resuspendues dans le RPMI, à une concentration de 1 million de cellules par 1 mL de RPMI (1 M/mL).
- Les cellules HCT116 cultivées en adhérence, sont incubées avec la trypsine (enzyme protéolytique) pour une durée de 3 minutes. Cela est suffisant pour inhiber l'adhésion des cellules à leur support. Ensuite, la concentration et l'état de viabilité des cellules sont déterminés avec une cellule de Malassez associés à un marquage au trypan bleu. Ce comptage est nécessaire afin d'avoir une concentration précise pour la suite du test,

mais aussi le pourcentage de cellules mortes au début du test. Les cellules sont ensuite lavées et centrifugées afin d'éliminer la trypsine. Enfin, les cellules sont resuspendues dans du DMEM complété à une concentration de 1 million de cellules par 1 mL de DMEM (1 M/mL).

Afin de garantir une bonne reproductibilité de nos mesures, chaque échantillon est injecté et mesuré plusieurs fois et ceci est répété n fois à différents jours (n=3).

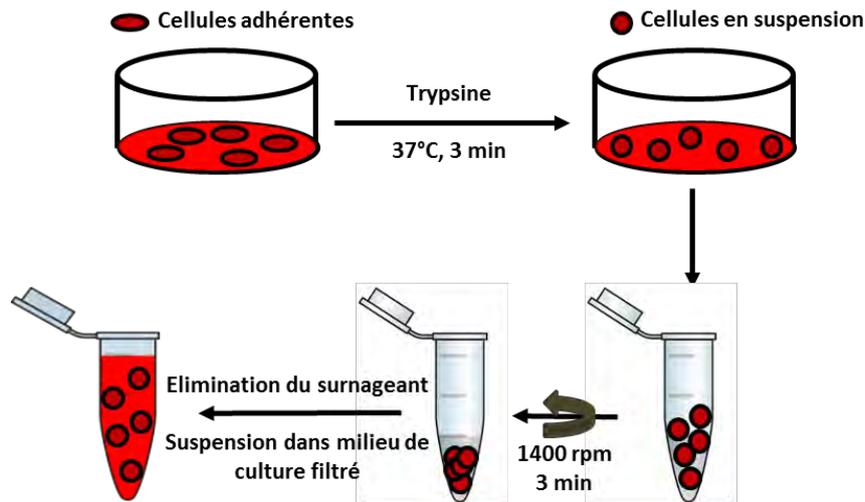


Figure 77 : Protocole expérimental de préparation des cellules pour effectuer les mesures HF.

IV.2 SDHF d'une cellule unique

IV.2.1 Détection et analyse d'une cellule unique

Comme expliqué ultérieurement, après avoir récupéré toutes les mesures des paramètres S , un traitement des données est appliqué avec le logiciel Matlab. Il va nous permettre d'extraire les contrastes de la capacitance et de la conductance en fonction de la fréquence. La Figure 78 et la Figure 79 présentent des spectres obtenus pour les lignées HCT116 et THP1, respectivement. Un nombre représentatif est seulement montré dans ces graphes.

Chaque spectre représente la signature électrique d'une cellule unique capturée, sur la gamme de fréquence allant de 40 MHz jusqu'à 40 GHz. Grâce à la méthode différentielle présentée ultérieurement, le milieu de culture correspondant (RPMI/DMEM) est considéré comme étant la référence (courbe pointillée en vert), avec une valeur « zéro » sur les deux paramètres.

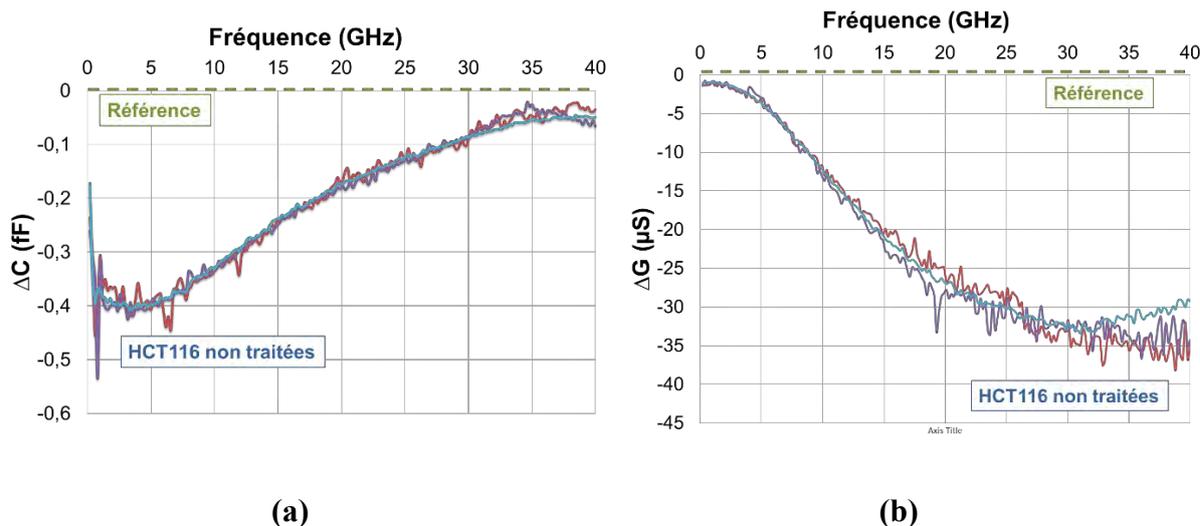


Figure 78 : Spectres de contraste de (a) la capacitance et de (b) la conductance d'une cellule HCT116 non traitée.

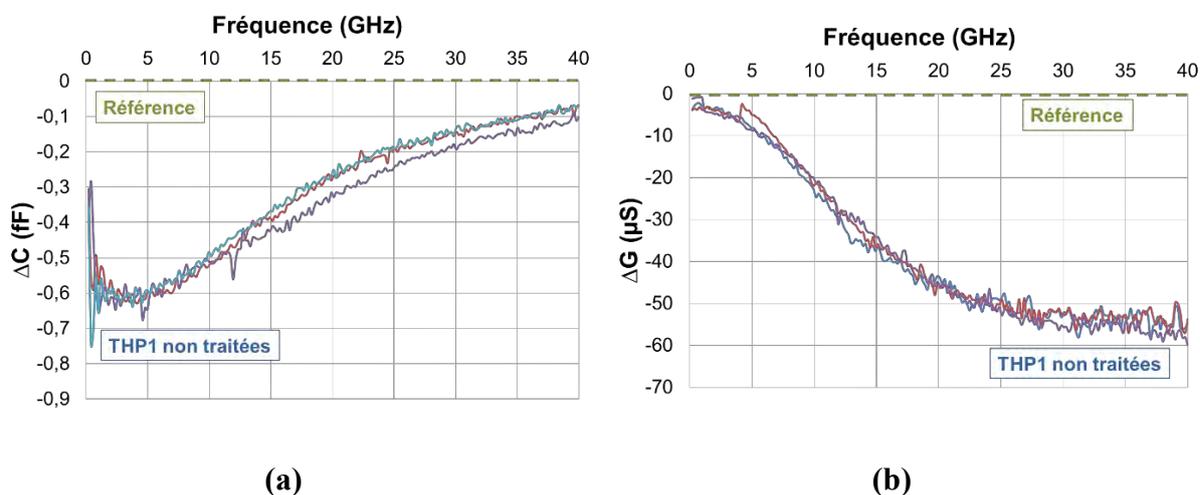


Figure 79 : Spectres de contraste de (a) la capacitance et de (b) la conductance d'une cellule THP1 non traitée.

Les spectres obtenus montrent que, comparée au milieu de culture seul, la cellule présente une signature spectrale significativement différente. En effet, dans les cellules vivantes, la membrane plasmique assure une régulation entre le milieu intra et extracellulaire en maintenant une hétérogénéité entre les concentrations de leurs constituants. Cela se traduit par une augmentation, en valeur absolue, des contrastes capacitif et conductif, résultante de la différence bien exprimée entre le milieu de culture relativement simple de composition, comparé à la cellule vivante avec toute sa complexité.

Ainsi, à l'aide de notre biocapteur, nous sommes capables de mettre en évidence la présence d'une cellule vivante dans son milieu de culture liquide, et cela est dû à la différence entre les propriétés électriques du milieu de culture et de la cellule avec sa membrane cytoplasmique. Le Tableau 3 résume les contrastes de capacitance à 5 GHz et de conductance à 30 GHz des deux

lignées cellulaires, avec les valeurs des écart-types. Ces fréquences sont choisies notamment pour avoir la valeur maximale des deux paramètres.

Tableau 3 : Contrastes de capacitance et de conductance des lignées HCT116 et THP1

Type cellulaire	HCT116	THP1
ΔC à 5GHz (fF)	$-0.4 \text{ fF} \pm 0.046 \text{ fF}$	$-0.6 \text{ fF} \pm 0.1 \text{ fF}$
ΔG à 30 GHz (μS)	$-32 \mu\text{S} \pm 3.8 \mu\text{S}$	$-52 \mu\text{S} \pm 8 \mu\text{S}$

Une comparaison entre les valeurs obtenues pour chaque lignée cellulaire révèle un contraste significatif. Les deux lignées cellulaires utilisées lors des mesures sont vivantes et n'ont vu aucun type de traitement. Pourtant, les HCT116 présentent un ΔC de -0.4 fF alors que pour les THP1 cette valeur est de -0.6 fF , révélant des signatures électriques différentes. La même conclusion se présente au niveau du ΔG qui vaut pour les HCT116 $-32 \mu\text{S}$ et pour les THP1 $-52 \mu\text{S}$.

Comment pourrions-nous expliquer alors cette différence de signature électrique entre les deux lignées?

Afin d'essayer de comprendre la raison pour laquelle ces deux lignées sont électriquement différentes, nous avons décidé d'explorer un peu plus en détail la morphologie interne des cellules. Pour cela, nous avons utilisé le microscope électronique à transmission MET, qui consiste à transmettre un faisceau d'électrons à travers un échantillon mince, afin d'avoir une image optique détaillée à très haute résolution. Des échantillons des deux lignées ont été visualisés. Nous obtenons donc les Figure 80 (a) et (b) qui sont représentatives des cellules HCT116 en suspension et THP1, respectivement. Les HCT116, bien caractérisées en MET dans la littérature [43], [44], présentent une morphologie arrondie/sphérique avec un noyau volumineux (principalement euchromatique), des nucléoles distincts, un cytoplasme bien organisé et quelques mitochondries. La surface cellulaire présente de nombreuses microvillosités. La même organisation cellulaire est présente dans les THP1, avec l'absence des microvillosités de surface. Néanmoins, un cytoplasme granulaire dense est caractéristique de la cellule THP1, comme mentionné dans la littérature [45].

Ainsi l'hypothèse que nous émettons pour justifier la différence de signature électrique entre les deux lignées consiste au fait que les deux lignées cellulaires ne présentent pas la même

morphologie, et que la granulosité dense des THP1 peut en effet induire un changement plus important après l'interaction avec l'onde émise, que celui induit par les HCT116. C'est pour cette raison que les signatures électriques des THP1 sont plus exprimées que celles des HCT116.

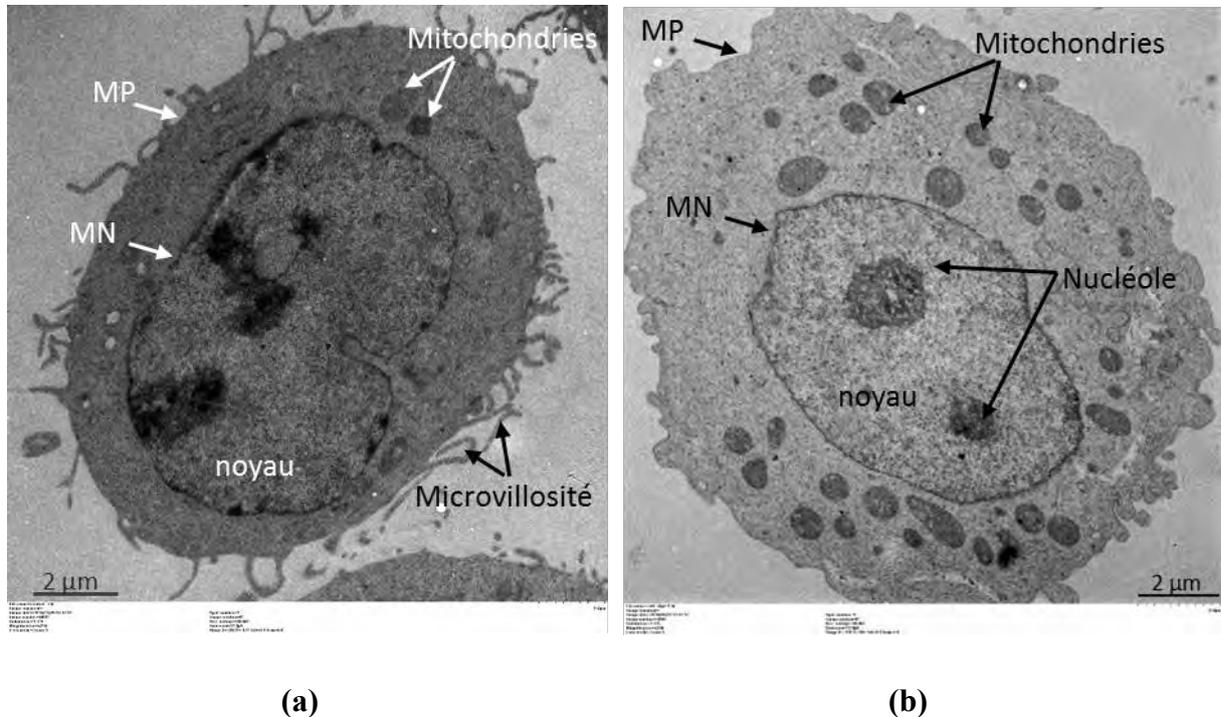


Figure 80 : Photographies en Microscope électronique à transmission MET de (a) HCT116 en suspension et (b) THP1. MP : membrane plasmique et MN : membrane nucléaire. Barres d'échelle : 2 µm.

IV.2.2 Analyse par SDHF de la perméabilisation par la saponine

La partie précédente de l'étude a permis de définir les propriétés diélectriques d'une seule cellule en utilisant le biocapteur hyperfréquence à « cellule unique ». A l'issue de cette étude, nous pouvons constater que notre dispositif est bien adapté à l'analyse cellulaire vu sa capacité de détecter et de discriminer différents types/lignées de cellules.

Pour aller plus loin dans la compréhension des capacités de notre technique, nous avons étudié comment sont altérés les paramètres diélectriques de ces deux types cellulaires par un traitement induisant la perméabilisation cellulaire.

Les saponines sont des molécules qualifiées de détergent vu leur capacité de solubiliser la membrane plasmique. Cet effet semble résulter de la capacité des saponines à former des complexes avec les cholestérols de la membrane ce qui cause la formation de pores et la perméabilisation des cellules [46], comme le montre la Figure 81 et le prouve les études sur

l'effet des saponines sur la structure membranaire des érythrocytes [47],[48]. Les résultats indiquent que les pores dans la membrane érythrocytaire sont permanents, de sorte que les dommages causés dans la bicouche lipidique sont irréversibles.

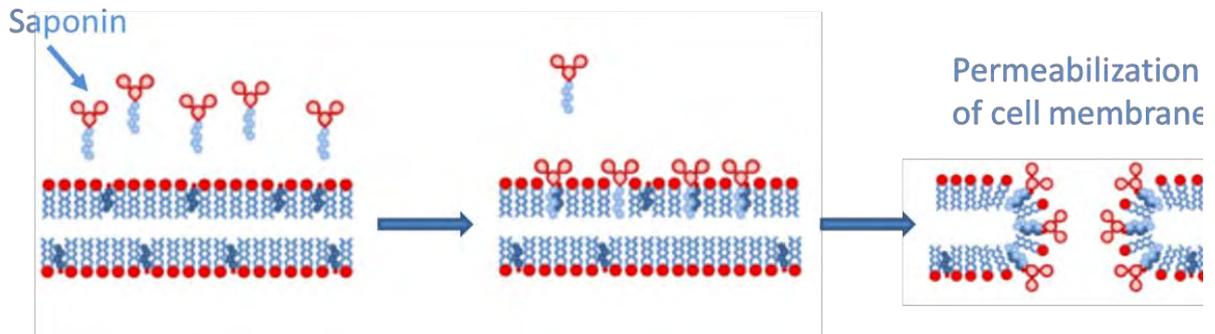


Figure 81 : Représentation schématique de l'effet perméabilisant des saponines sur les cellules in vitro [49].

Nous avons voulu alors estimer la capacité de notre biocapteur à évaluer cette perméabilisation mécanique irréversible au niveau de la cellule unique. Pour cela, une étape de traitement des cellules avec une concentration de 0.02% (masse/volume) de saponine pendant 15 minutes, précéda les mesures HF. La mesure des paramètres S et l'extraction des contrastes de capacitance et de conductance aboutit aux graphes présentés dans la Figure 82 et la Figure 83.

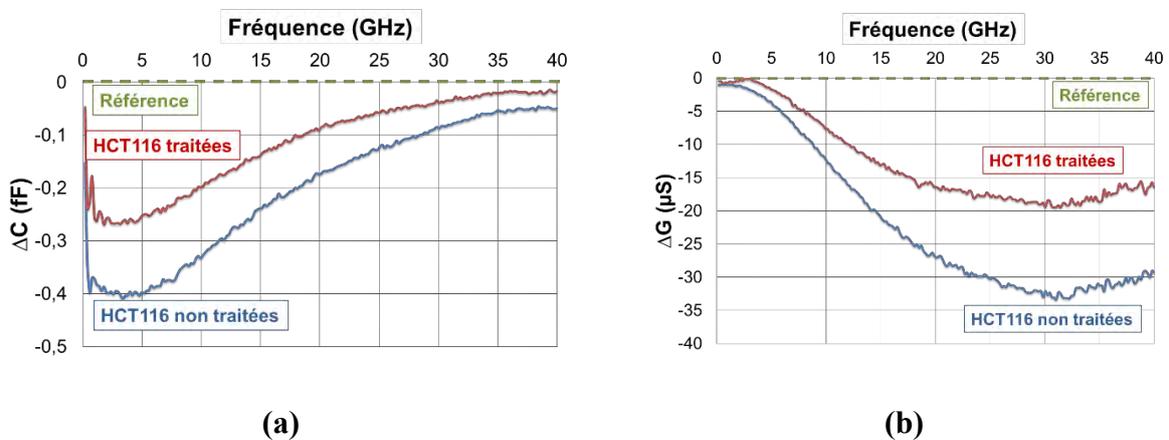


Figure 82 : Différence de contraste de (a) la capacitance et de (b) la conductance entre deux cellules HCT116 non traitée (en bleu) et traitée (en rouge).

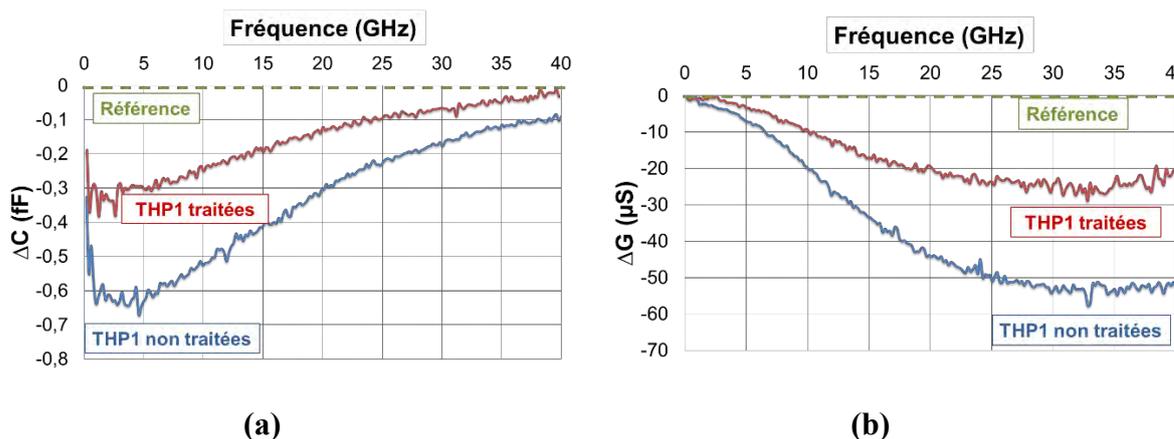


Figure 83 : Différence de contraste de (a) la capacitance et de (b) la conductance entre deux cellules THP1 non traitée (en bleu) et traitée (en rouge).

En étudiant les deux lignées cellulaires, un écart significatif est observable entre une cellule non traitée et une cellule traitée, et cela sur les deux paramètres (ΔC et ΔG). Les cellules traitées (courbe rouge) présentent des contrastes moins importants que les cellules non traitées (courbe bleue). Dans le cas des cellules traitées avec la saponine, la membrane cellulaire devient perméable. Sous l'effet de la pression osmotique liée aux différences de concentrations entre les espèces intra et extracellulaire, un équilibre se crée entre les deux compartiments. La composition cytosolique est donc largement impactée, ce qui engendre un plus faible contraste entre les milieux extracellulaire et intracellulaire comparativement aux cellules non traitées. Cela se traduit en une diminution (en valeurs absolues) des contrastes de capacitance et de conductance. Le Tableau 4 résume les différentes valeurs de contraste obtenues avant et après traitement avec la saponine pour les deux lignées cellulaires.

Tableau 4 : Contrastes de capacitance et de conductance des cellules HCT116 et THP1 non traitées ou traitées à la saponine (0.02%).

Type cellulaire	HCT116 non traitée	HCT116 traitée	THP1 non traitée	THP1 traitée
ΔC à 5 GHz (fF)	-0.4 fF \pm 0.046 fF	-0.25 fF \pm 0.04 fF	-0.6 fF \pm 0.1 fF	-0.3 fF \pm 0.077 fF
ΔG à 30 GHz (μS)	-32 μS \pm 3.8 μS	-20 μS \pm 4.3 μS	-52 μS \pm 8 μS	-22 μS \pm 7.3 μS

Du fait de l'équilibre entre les deux compartiments intra et extracellulaire, nous pouvons nous attendre à ce que le contraste sera égal à zéro. Or, avec un traitement contrôlé à la saponine, les cellules conservent leur architecture : le noyau, les mitochondries et d'autres organelles

cellulaires sont toujours présents, comme le montre la Figure 84. C'est donc pour cette raison que le contraste ne devient pas nul par rapport à la référence.

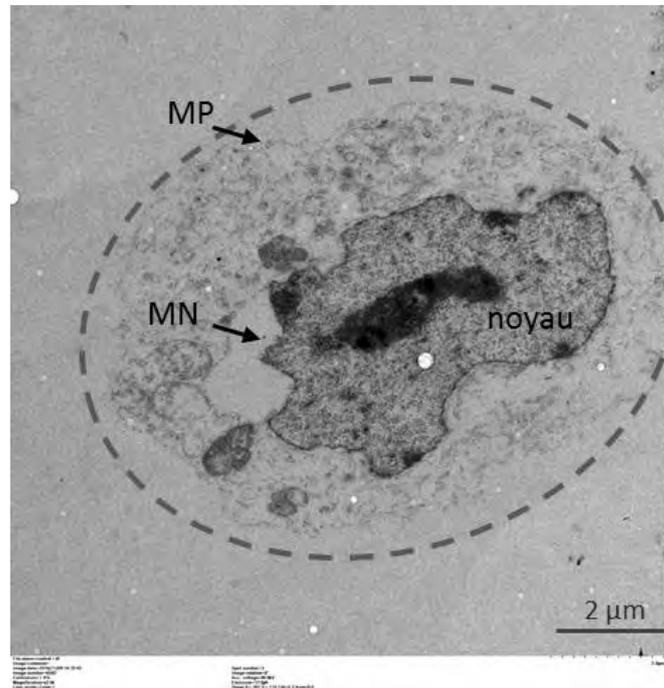


Figure 84 : Photographies en Microscope électronique à transmission MET de HCT116 en suspension traitée avec 0.02% de saponine pendant 15 minutes. MP : membrane plasmique et MN : membrane nucléaire. Barres d'échelle : 2 μm.

Fort de cette étude, nous sommes capables de définir des valeurs seuils des paramètres de contraste C et G délimitant les caractères vivant ou affecté des cellules. Ces valeurs seuils ont été définies au milieu de la dynamique mesurée des lots cellulaire vivants versus traités à la saponine, comme le montre le Tableau 5:

Tableau 5 : Valeurs du seuil entre cellule vivante et cellule affectée pour les deux paramètres (ΔC et ΔG).

Type cellulaire	HCT116	THP1
ΔC seuil à 5 GHz	-0.32 fF	-0.45 fF
ΔG seuil à 30 GHz	-26 μS	-40 μS

Ces résultats montrent que la spectroscopie diélectrique hyperfréquence est un outil bien adapté pour l'analyse de cellules vivantes et perméabilisées, et que ces échantillons présentent des signatures électriques significativement différentes. Cette méthode est réalisable sans l'utilisation de marqueur invasif (bleu trypan, iodure de propidium, etc.), sans contact et directement dans le milieu de culture approprié à chaque lignée cellulaire.

IV.3 Analyse par SDHF de la réponse cellulaire au champ électrique

Avec l'émergence de l'électroporation comme outil thérapeutique prometteur aussi bien pour la recherche que pour les applications cliniques humaines et vétérinaires, un développement permanent des études de cette technique se poursuit. Vu que la spectroscopie diélectrique se révèle à donner des indicateurs quantitatifs cellulaires innovants, il est donc naturel d'évaluer l'aptitude de cette dernière à déterminer si les cellules traitées avec l'électroporation, seule ou couplée à une drogue anti-tumorale (principe de l'électrochimiothérapie), donnent une signature différente de celle des cellules vivantes.

Dans le cadre de l'électroporation cellulaire, plusieurs considérations nécessitent d'être étudiées afin de déterminer les paramètres optimaux, pour une certaine lignée cellulaire, à utiliser lors des expériences. Le paramètre le plus important étant l'intensité du champ électrique, il sera donc convenable, avant toute expérience impliquant la spectroscopie diélectrique, de voir son effet sur les caractéristiques de perméabilité des cellules ainsi que leur viabilité.

Dans la section suivante, nous présenterons l'effet (étudié par les techniques traditionnelles en biologie) de différents champs électrique sur la perméabilité et la viabilité cellulaire des THP1 uniquement (vu leur état en suspension, rendant les expérimentations plus aisées pour une première étude de ce genre), afin de choisir les conditions électriques les plus appropriés pour la suite.

IV.3.1 Analyse biologique de la perméabilisation et la viabilité cellulaire

Dans cette évaluation de la perméabilisation cellulaire induite par le champ électrique, les cellules THP1 sont centrifugées puis resuspendues dans 100 μ L du tampon adapté à l'électroporation et contenant 0.1 mM de PI. La suspension cellulaire est ensuite placée entre les électrodes d'EP et le champ électrique est délivré. L'analyse qualitative de la perméabilisation se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DMRIB microscope). Quant à l'analyse quantitative, le taux de perméabilisation est estimé soit par un comptage du nombre de cellules fluorescentes comparé au nombre total de cellules, soit par la cytométrie en flux, dont le principe est expliqué par la suite.

Afin de préciser la valeur du champ électrique optimale à utiliser lors de nos expériences, les cellules ont subi un traitement avec une gamme de champ électrique allant de 0.2 kV/cm jusqu'à 2 kV/cm. Durant ce travail de thèse, les paramètres de durée, de la fréquence et de nombre de pulses sont maintenus constants et ont été fixés à 100 μ s, 1Hz et n=8, respectivement. La Figure

85 montre des champs de microscopie prises pour des THP1 après électroporation, en lumière blanche LB et en fluorescence FLUO. Comparées aux cellules contrôles, qui elles-mêmes présentent un pourcentage de mortalité basale inférieur à 10%, les cellules pulsées incorporent le PI d'autant plus que le champ électrique augmente.

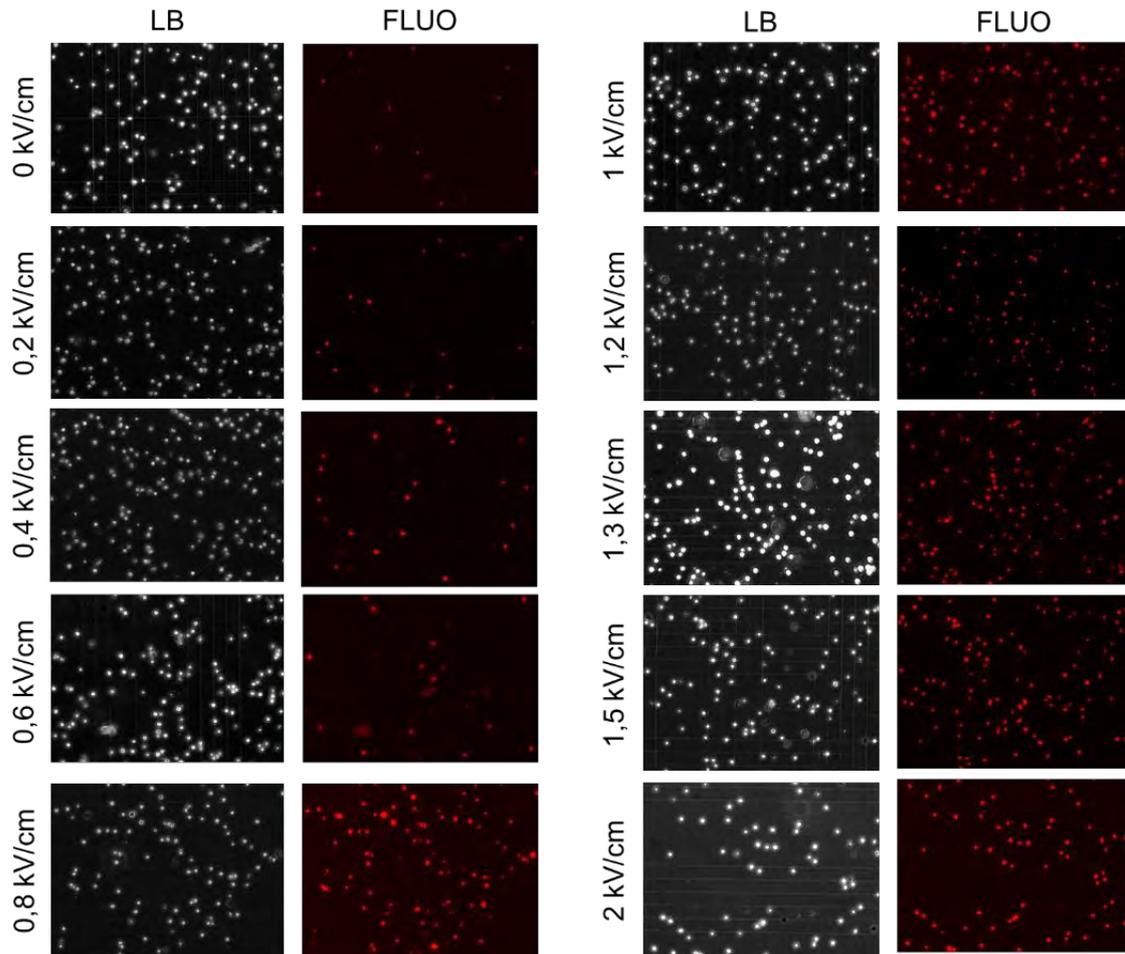


Figure 85: Perméabilité observée après l'électroporation en présence de l'iodure de propidium PI, avec différentes valeurs du champ électrique (0.2 kV/cm – 2 kV/cm), 100 μ s, 1 Hz, n=8. LB : en lumière blanche, FLUO : en fluorescence.

Par la suite, nous avons procédé à un comptage sur plusieurs pages de vision optique, du nombre de cellules fluorescentes dans chaque condition, afin de le comparer au nombre total des cellules et de pouvoir estimer alors le pourcentage de perméabilisation induit par chaque champ électrique. Nous obtenons donc la Figure 86. La perméabilisation membranaire se déclenche en effet, à partir de 0.4 kV/cm et atteint une valeur maximale à partir de 1.5 kV/cm.

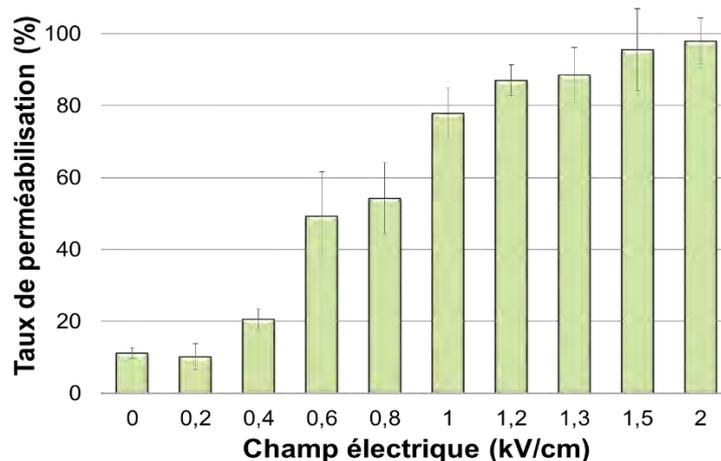


Figure 86 : Evaluation de la perméabilisation des cellules THP1 avec la pénétration du PI, par comptage du nombre de cellules fluorescentes comparé au nombre total de cellules.

Dans le but d'obtenir une quantification plus précise, nous procédons à évaluer le pourcentage et l'intensité de fluorescence après électroporation, par la technique classique : la cytométrie en flux, dont le principe de fonctionnement est schématisé dans la Figure 87.

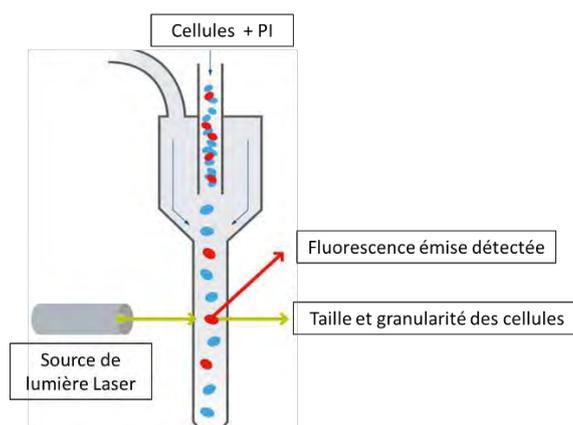


Figure 87 : Principe de fonctionnement du cytomètre en flux. Les cellules mises en présence du PI, intercalant de l'ADN, passent en face d'un faisceau laser, qui permettra de révéler la taille, la granularité, et la fluorescence émise.

La cytométrie en flux est une technique qui mesure et analyse simultanément plusieurs caractéristiques physiques de cellules uniques, lorsqu'elles traversent un faisceau de lumière émis par une source de lumière Laser. Les propriétés mesurées comprennent la taille, la granularité et la fluorescence émise par un fluorochrome. Lors de cette étude, les cellules THP1 qui ont été soumises à l'électroporation en présence du PI, sont introduites dans le cytomètre en flux. L'intensité de fluorescence émise par une cellule ayant incorporé de PI est détectée lors du passage en face du faisceau laser. Un exemple de résultats obtenus est montré dans la Figure 88. Les signaux sont collectés par l'ensemble des détecteurs du cytomètre et étudiés pour fournir des informations sur les caractéristiques fluorescentes de la population cellulaire en

cours d'analyse. Les graphes représentent des histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé (FL2-H : fluorescence du PI) et l'axe des ordonnées le nombre de cellules comptées (counts). Les conditions de contrôle sans et avec PI doivent toujours être faite au début de chaque expérience. Elles serviront à déterminer un seuil de détection au-delà duquel le signal est considéré spécifique et significatif. La zone de spécificité est nommée M1. La totalité des cellules dans la condition contrôle sans PI représente une intensité de fluorescence moins que le seuil déterminé. Le graphe de la condition contrôle avec PI est légèrement décalé vers la droite, ce qui indique qu'un petit pourcentage de cellules sont (PI+), correspondant au niveau basale de mortalité dans une suspension cellulaire. Enfin, pour les cellules électroporées avec 1.3 kV/cm, nous notons un décalage bien exprimé dans le graphe correspondant, reflétant une augmentation du nombre de cellules émettant la fluorescence de PI. Cela confirme donc l'induction d'une perméabilisation importante des THP1 par le champ électrique.

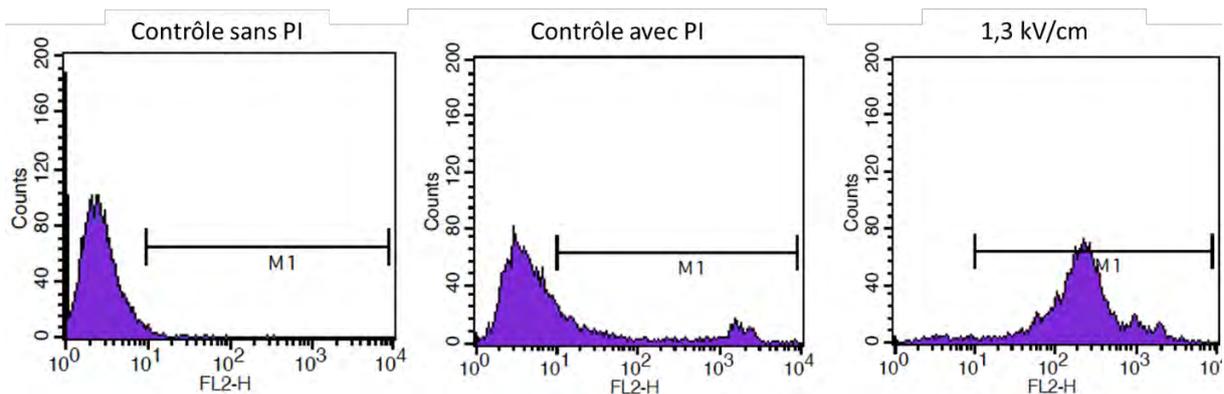


Figure 88 : Exemples de résultats obtenus par la cytométrie en flux, représentant la variation de l'intensité de fluorescence, émise par le PI, après électroporation des THP1. L'axe des abscisses représente l'intensité de fluorescence (FL2-H) et l'axe des ordonnées représente le nombre de cellules (counts). La zone M1 représente la zone de spécificité, dans laquelle les cellules sont fluorescentes.

Une analyse des data obtenus par la cytométrie en flux permet d'avoir le pourcentage de perméabilisation suite à l'électroporation des THP1. Les résultats sont montrés dans la Figure 89. La pénétration du PI est significative lorsque l'intensité du champ électrique atteint 0.6 kV/cm et est quasiment maximale lorsque ce dernier atteint 1 kV/cm. En effet, il existe une relation linéaire entre l'intensité du champ électrique appliqué et la différence du potentiel membranaire induite, résultant en une augmentation nette du transport des molécules exogènes [50], [51]. Au-delà de 1 kV/cm, un plateau est atteint jusqu'à 2 kV/cm.

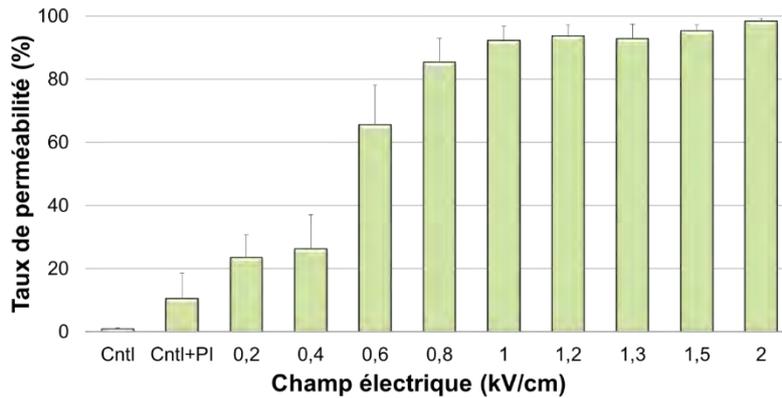


Figure 89: Evaluation à l'aide du cytomètre en flux de la perméabilisation des cellules THP1 avec la pénétration du PI. Les histogrammes représentent le pourcentage des cellules perméabilisées en fonction de l'intensité du champ électrique en présence du PI (n=3).

Une étude de l'intensité de fluorescence par la cytométrie en flux, nous permet d'obtenir la Figure 90, qui montre une augmentation de cette valeur qui résulte d'une entrée massive de la molécule PI en augmentant le champ électrique. Au-delà de 1.5 kV/cm, une diminution de cette intensité se met en place, reflétant une perméabilisation permanente dans la membrane cellulaire, ce qui permet la sortie libre des molécules PI.

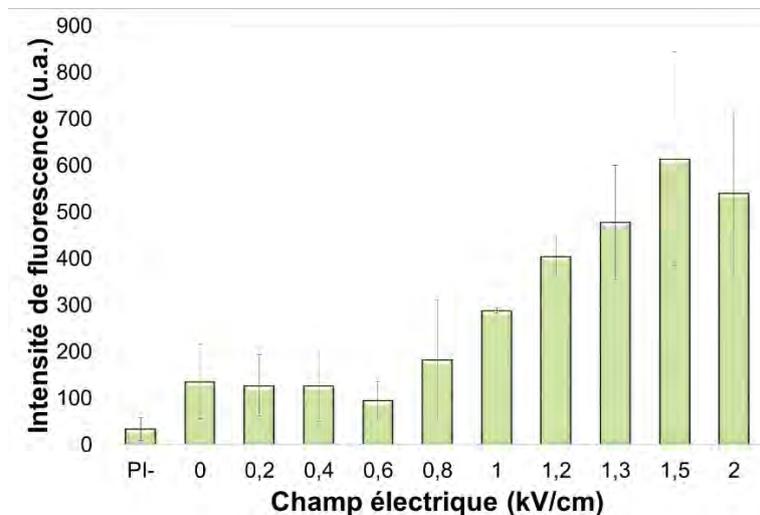


Figure 90 : Evaluation de l'intensité de fluorescence (en unités arbitraires) émise des THP1 après application des impulsions de champ électrique par la cytométrie en flux, PI- : sans PI, (0 kV/cm – 2 kV/cm), 100 μ s, 1 Hz, n=8.

En revanche, l'addition du PI à différents temps après l'application de 1 kV/cm, nous a permis d'évaluer la durée de la perméabilisation. Comme le montre la Figure 91, le retour de l'état perméable vers l'état imperméable (phénomène appelé "resealing"), se produit dès la première minute après EP. Au-delà de 10 minutes, les cellules qui n'ont pas pu récupérer leur imperméabilisation sont considérées comme électroporées irréversiblement. En effet, la perméabilité membranaire aux molécules exogènes est présente pour une durée de vie allant

des secondes jusqu'aux minutes ; cela dépend des conditions de l'EP et de la température [52], [53].

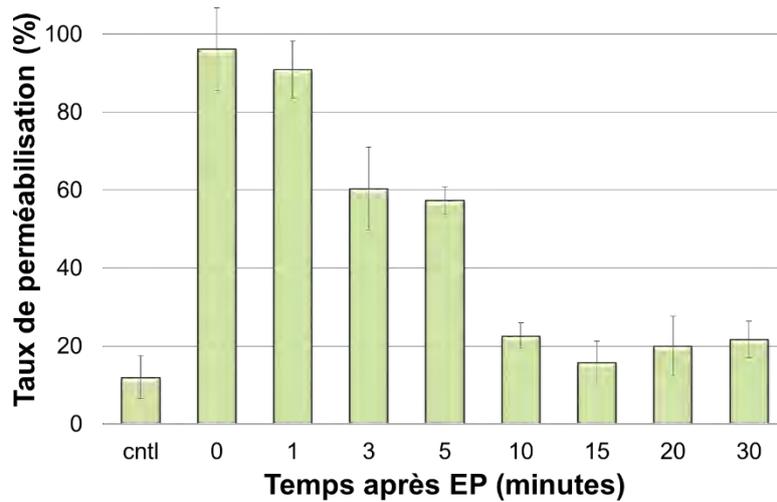


Figure 91 : La perméabilisation et le retour à l'état imperméable « resealing » des membranes en fonction du temps, après application de 1 kV/cm, 100 μ s, 1 Hz, n=8. Cntl est la condition contrôle qui représente des cellules qui n'ont pas été soumises aux impulsions électriques (n=3).

La cellule, ainsi que son fonctionnement, peuvent être profondément affectées par toute altération sur ses membranes externes ou internes. Cela peut dès lors provoquer la mort cellulaire. De ce fait, une étude de la viabilité des cellules, 24 heures après application du champ électrique a été effectuée. La viabilité des cellules en suspension a été estimée à l'aide de la cytométrie en flux associée au PI. Le contrôle n'ayant pas subi d'électroporation est considéré comme référence ; il correspond à 100 % de viabilité. La Figure 92 montre le pourcentage de cellules viables suivant les différentes intensités du champ électrique. Les résultats montrent que jusqu'à 30% des cellules sont altérées par 1 kV/cm, ce pourcentage continue à augmenter au-delà de cette valeur, impliquant que ces cellules sont perméabilisées de manière irréversible, et donc mortes des suites de l'augmentation de l'intensité du champ électrique. D'autres études ont présentés l'influence de la variation de différents paramètres électriques sur la viabilité cellulaire [54].

Les effets des impulsions électriques sont fonction de leur amplitude, les autres paramètres étant constants. Ainsi, pour la suite de l'étude, nous avons choisi de travailler avec les deux différentes conditions électriques, induisant différents taux de mortalité sur les cellules :

- Conditions électriques 1: 8 impulsions à 1 kV/cm avec un temps d'impulsion de 100 μ s et une fréquence de répétition de 1 Hz.

- Conditions électriques 2 : 8 impulsions à 1,5 kV/cm avec un temps d'impulsion de 100 μ s et une fréquence de répétition de 1 Hz.

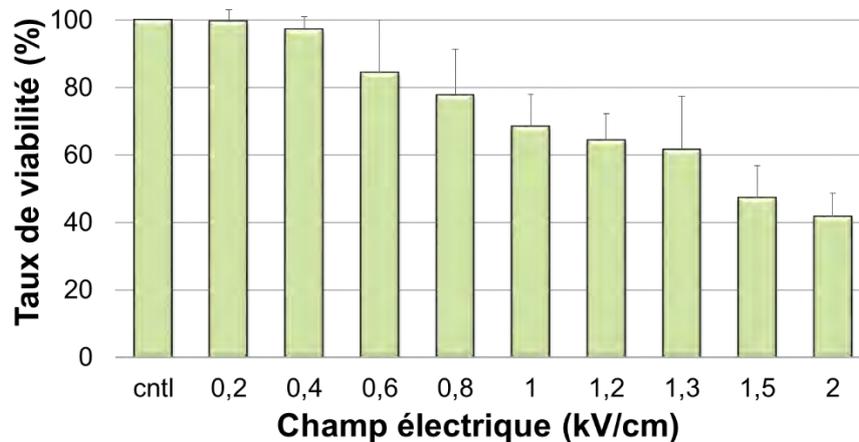


Figure 92 : Evaluation à l'aide du cytomètre en flux de la viabilité des cellules THP1 avec la pénétration du PI, 24 heures après électroporation. Les histogrammes représentent le pourcentage des cellules viables en fonction de l'intensité du champ électrique (n=3).

IV.3.2 Analyse par SDHF de la perméabilité et de la viabilité cellulaire

Les définitions des paramètres électriques à utiliser avec la lignée cellulaire THP1 étant établis, nous procédons maintenant à l'étude de l'effet de l'électroporation par la spectroscopie diélectrique hyperfréquence. En effet, l'application d'un champ électrique significativement plus élevé que la valeur seuil E_p , expliquée dans le chapitre 1, engendre une perméabilisation irréversible de la membrane. La mort cellulaire qui en résulte peut se produire très rapidement (15min) ou en plus lentement (24-48 h) [55]. Dans cette étude, nous nous intéressons dans un premier temps à comparer deux conditions d'électroporation avec les effets qu'ils engendrent sur la viabilité cellulaire. Dans un deuxième temps, nous suivons l'effet de l'application d'un champ électrique intense au cours du temps, en nous servant de la spectroscopie diélectrique hyperfréquence.

Après lavage et centrifugation, les cellules THP1 sont remises dans le tampon de pulsation ZAP. 100 μ l de la suspension cellulaire sont mis entre les électrodes et le champ électrique (1 kV/cm ou 1.5 kV/cm) est délivré. Après électroporation, les cellules sont laissées au repos pendant 5 minutes avant d'être transférées dans les boîtes de pétri contenant 2 ml de milieu de culture. Un autre lot de cellules sert de contrôle négatif : les cellules sont resuspendues dans du ZAP, mais ne subissent pas le champ électrique. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant une durée prédéfinie selon les besoins de l'expérience. Après ce temps d'incubation,

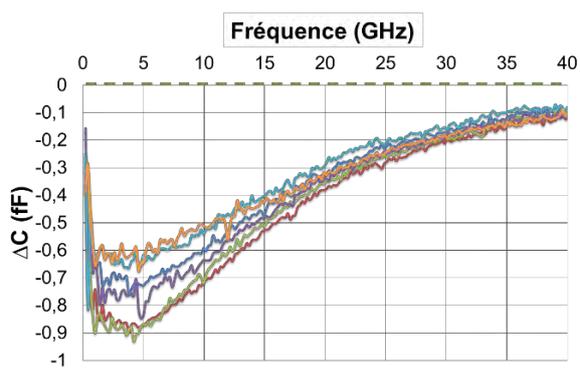
le même protocole de mesure dans le microcomposant HF que celui décrit précédemment est appliqué.

En parallèle, les cellules en suspension préparées sont observées en utilisant les outils classiques utilisés dans les laboratoires de biologie cellulaire, afin de corréliser les résultats obtenus avec la spectroscopie diélectrique. En conséquence, la viabilité des cellules en suspension a été estimée à l'aide de l'un des deux outils : le comptage de cellules vivantes par une cellule de Malassez, associé à un marquage des cellules au bleu de trypan, qui est un colorant relargué par les cellules vivantes et sert alors de marquage des cellules mortes. Le deuxième outil utilisé pour estimer la viabilité est la cytométrie en flux associée au PI.

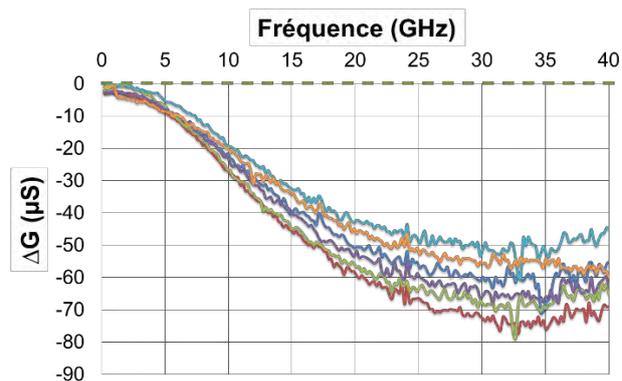
IV.3.2.1 Analyse par SDHF de l'effet de l'intensité du champ électrique

Nous avons d'abord réalisé une expérience de comparaison de l'effet de deux intensités de champ électrique différentes, 1 kV/cm et 1.5 kV/cm, sur la viabilité cellulaire 24 heures après le traitement. Après l'étape de préparation des cellules et le temps d'incubation de 24 heures, les trois lots de cellules (contrôle négatif, EP à 1 kV/cm et EP à 1.5 kV/cm) sont mesurés par spectroscopie diélectrique hyperfréquence d'une part, et analysés optiquement à l'aide du bleu de trypan de l'autre part. Les Figure 93, Figure 94, Figure 95 représentent les spectres capacitifs et conductifs des cellules THP1 non traitées, soumises à 1 kV/cm et 1.5 kV/cm, respectivement. Un nombre réduit mais représentatif de cellules est présenté sur ces figures, et cela pour donner une idée générale du comportement spectral des cellules ainsi que de la répétitivité de mesure. Comme expliqué ultérieurement, les mesures sont faites sur une gamme de fréquence allant de 40 MHz jusqu'à 40 GHz, et sont continuellement comparées à une valeur référence (celle du milieu de culture RPMI), représentée en ligne pointillée en vert sur les graphes.

En comparant d'une manière qualitative les spectres des cellules pulsées aux spectres des cellules contrôle négatif, nous remarquons qu'à 1.5 kV/cm, nous observons une diminution en valeur absolue de ΔC et ΔG pour certaines cellules. Il se crée alors une séparation distincte entre deux sous-groupes cellulaires : les cellules vivantes et les cellules affectées par le champ électrique.

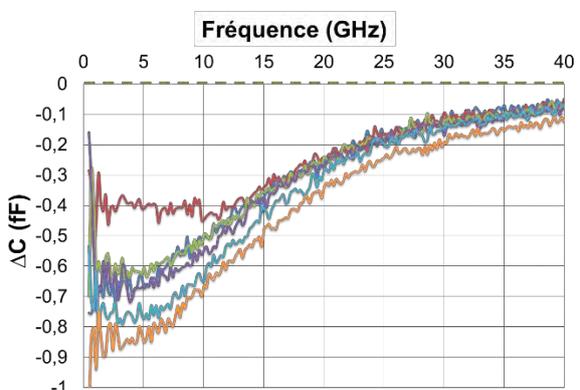


(a)

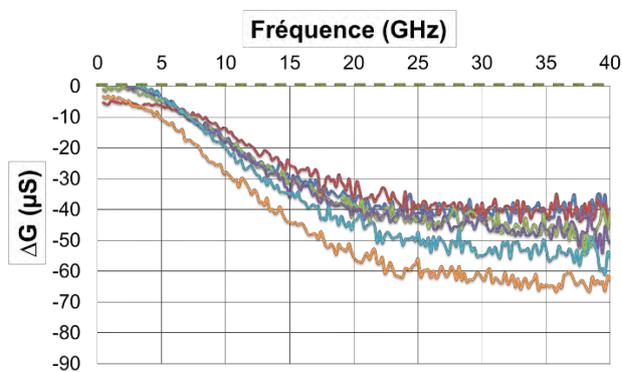


(b)

Figure 93 : Spectres représentant les cellules THP1 non traitées. (a) contraste capacitif ΔC en fF (b) contraste conductif ΔG en μS .

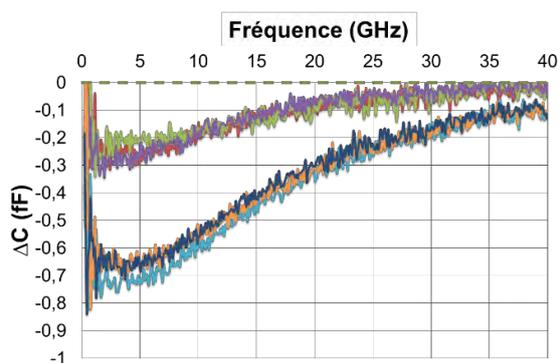


(a)

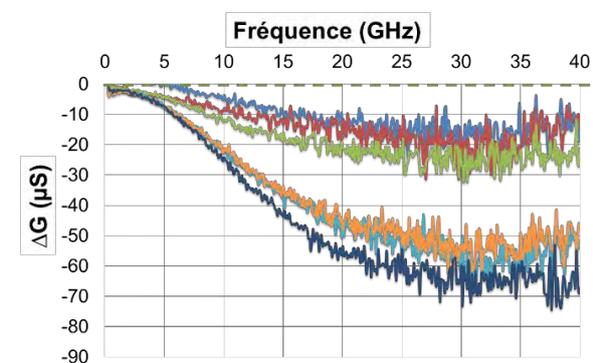


(b)

Figure 94: Spectres représentant les cellules THP1 soumises à un champ électrique de 1 kV/cm. (a) contraste capacitif ΔC en fF (b) contraste conductif ΔG en μS .



(a)



(b)

Figure 95: Spectres représentant les cellules THP1 soumises à un champ de 1.5 kV/cm. (a) contraste capacitif ΔC en fF (b) contraste conductif ΔG en μS .

Afin de consolider notre étude, une étude quantitative des résultats obtenus est faite. La Figure 96 présente l'évolution de la valeur (a) des contrastes capacitifs et (b) conductifs, aux fréquences choisies (respectivement à 5 GHz et 30 GHz), en fonction de la valeur du champ d'EP. Chaque point représente une cellule analysée et la Figure 96 présente la totalité des mesures effectuées. Sur les graphes sont présentés les pourcentages de cellules vivantes et affectées, selon le seuil établi ultérieurement et qui permet une classification cellulaire. Sur le paramètre contraste capacitif ΔC , l'EP se traduit par une diminution de la viabilité comparée au contrôle, qui atteint 87% pour les cellules pulsées à 1 kV/cm et 53% pour les cellules pulsées à 1.5 kV/cm. La même observation est constatée sur le paramètre contraste conductif ΔG .

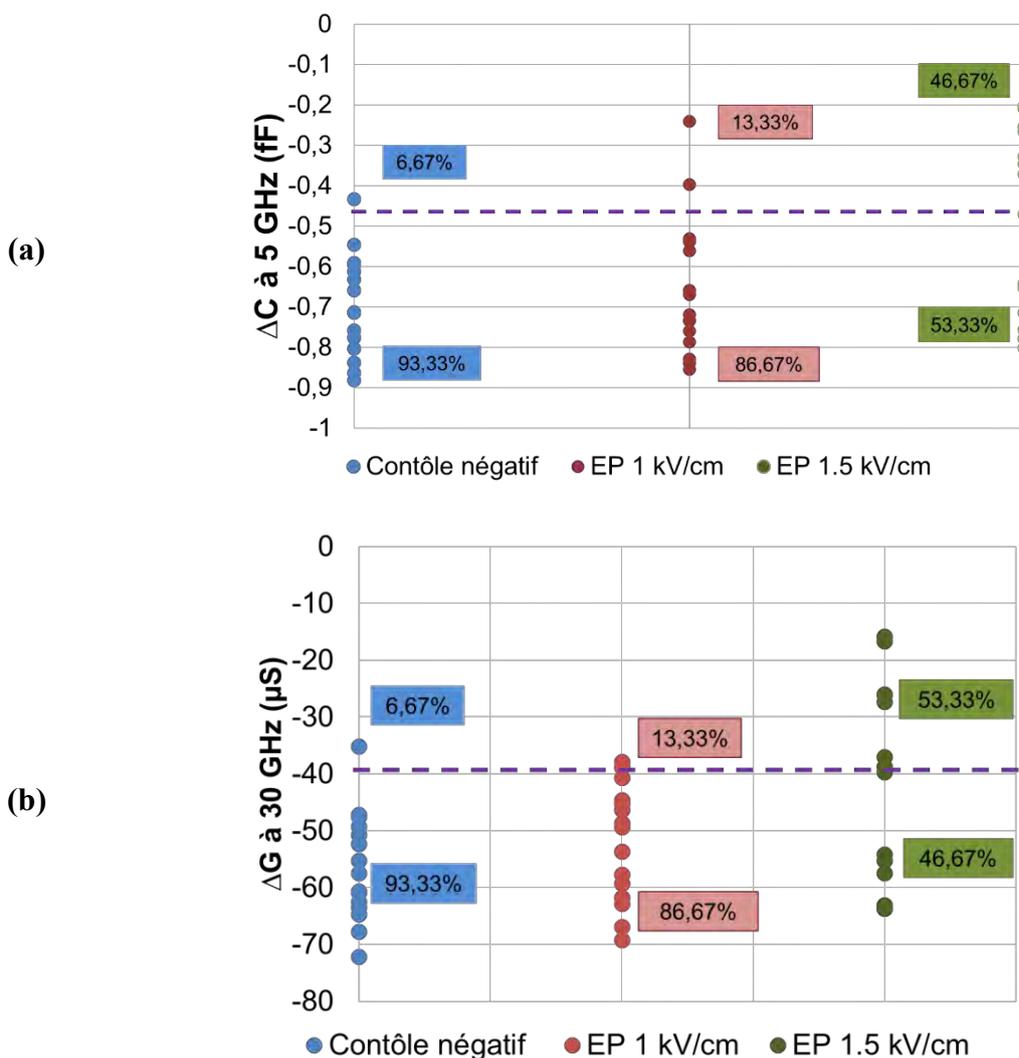


Figure 96 : Mesures quantitatives des contrastes (a) capacitifs $\Delta C_{5\text{ GHz}}$ et (b) conductifs $\Delta G_{30\text{ GHz}}$ des THP1 à différentes conditions.

La Figure 97 propose de comparer et corrélérer l'évolution de la viabilité cellulaire post EP obtenue par les mesures HF (ΔC à 5 GHz et ΔG à 30 GHz) et par le test standard qu'est le bleu trypan.

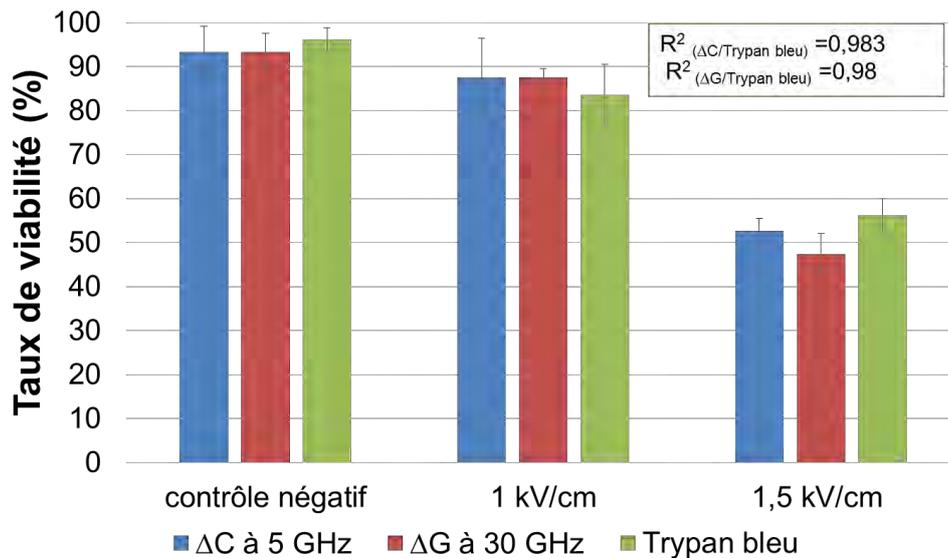


Figure 97 : Comparaison entre la spectroscopie diélectrique (paramètres $\Delta C_{5\text{ GHz}}$ et $\Delta G_{30\text{ GHz}}$) et le bleu de trypan dans la révélation de l'évolution du taux de viabilité des THP1 après traitement (n=3).

Cette figure montre la concordance des résultats entre les mesures HF et le test de bleu de trypan, dans l'évaluation du taux de viabilité des THP1 post EP. En effet, en appliquant un champ électrique de 1.5 kV/cm, il y a une induction de la mort de 50-55% des cellules.

Une analyse statistique révèle une très bonne corrélation entre les deux méthodes d'analyse ($R^2=0.98$) indiquant la fiabilité de la spectroscopie diélectrique par la détection de l'effet de deux intensités différentes de champ électrique sur les cellules THP1.

Une représentation des mesures dans le plan complexe ($\Delta C_{5\text{ GHz}}$, $\Delta G_{30\text{ GHz}}$), présentée à la Figure 98.a, renforce l'identification d'une répartition en deux nuages des points de mesure, cette classification étant obtenue en se basant sur les valeurs seuils déterminées ultérieurement. Le premier nuage rassemble les cellules vivantes (la plupart des cellules non traitées et des cellules pulsées à 1 kV/cm, et une partie des cellules pulsées à 1.5 kV/cm). Quant au second nuage, il contient les cellules affectées par la saponine ou par le champ électrique à 1.5 kV/cm.

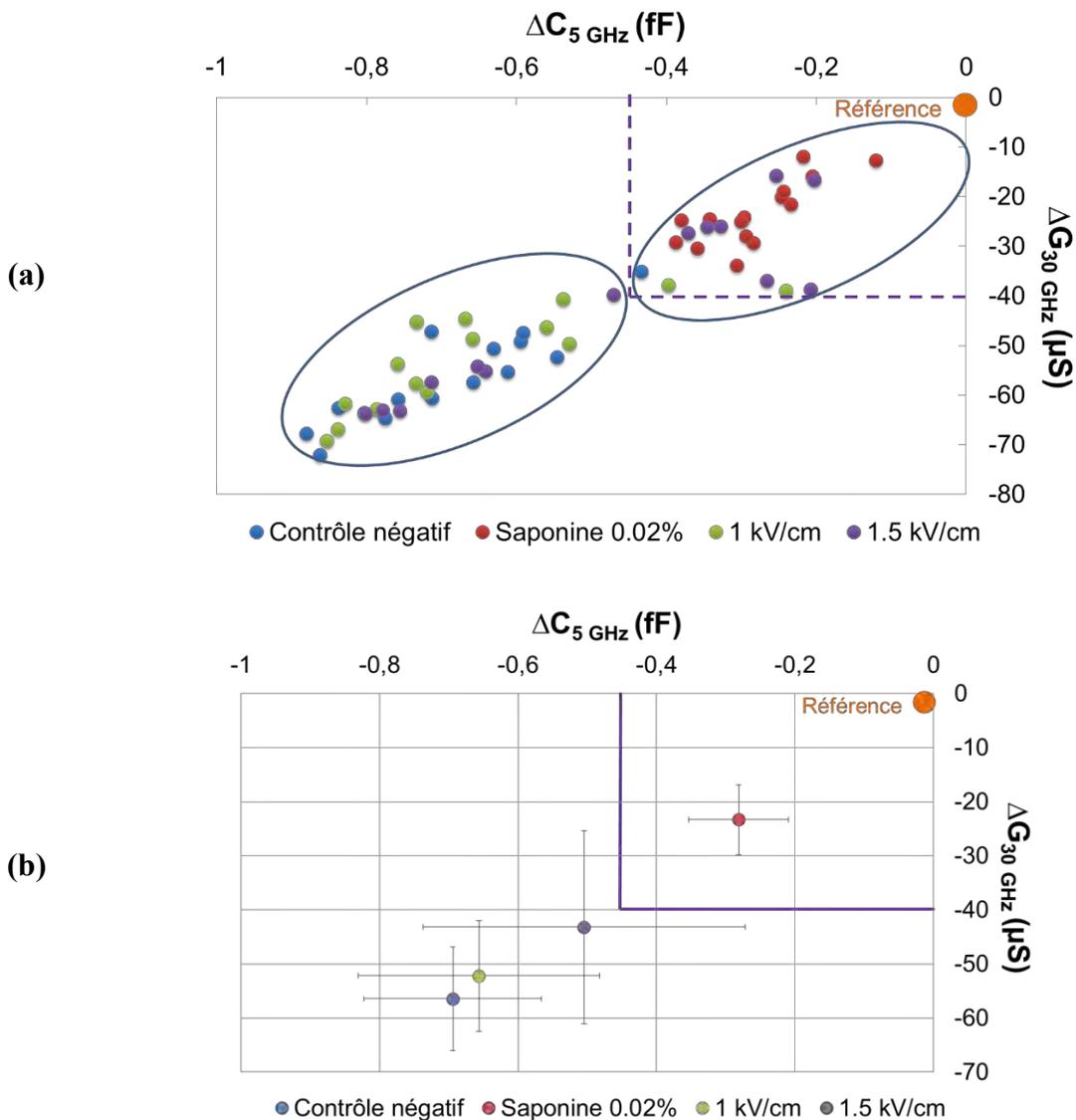


Figure 98: Position des différentes mesures des cellules THP1 subissant différents traitements, dans le plan complexe ($\Delta C_{5\text{GHz}}$, $\Delta G_{30\text{GHz}}$) (a) sans et (b) avec les écarts-types de mesure.

La valeur moyenne et les écarts-types des mesures de chaque condition ont été calculés et présentés dans la Figure 98.b. D'après ce graphe, nous remarquons que les cellules traitées avec 1.5 kV/cm ont une valeur moyenne qui se situe en dehors de la partie précisée comme affectée. Le mélange des cellules vivantes et affectées au sein de cette population donne une valeur moyenne qui ne reflète pas le véritable état des deux sous-populations des cellules : ceci signifie qu'une étude globale des populations cellulaires masque de l'information quand les suspensions cellulaires deviennent hétérogènes, d'où l'intérêt d'une étude au niveau de la cellule unique.

IV.3.2.2 Suivi temporel par SDHF de l'effet de l'électroporation

Dans cette section, nous nous focalisons sur l'évaluation de la capacité de notre biocapteur à suivre l'évolution des effets d'un champ électrique élevé (1.5 kV/cm) sur la viabilité cellulaire en fonction du temps. Dans ce but, les cellules THP1 sont pulsées de la même manière que présentée précédemment. Des temps courts après EP ont été étudiés ($T_0 + 3$ heures, $T_0 + 5$ heures, $T_0 + 7$ heures), et le temps long ($T_0 + 24$ heures) est conservé afin de vérifier l'obtention des mêmes résultats qu'à la section précédente. Dans la Figure 99 est présentée l'évolution des valeurs des contrastes (a) capacitifs à 5 GHz et (b) conductifs à 30 GHz, en fonction du temps après EP. Comme précédemment décrit, le tri cellulaire est basé sur les valeurs seuils déterminés pour les paramètres HF. Nous remarquons une variation du nombre de cellules affectées par le champ électrique à 1.5 kV/cm est détectée à partir de T_0+3 h.

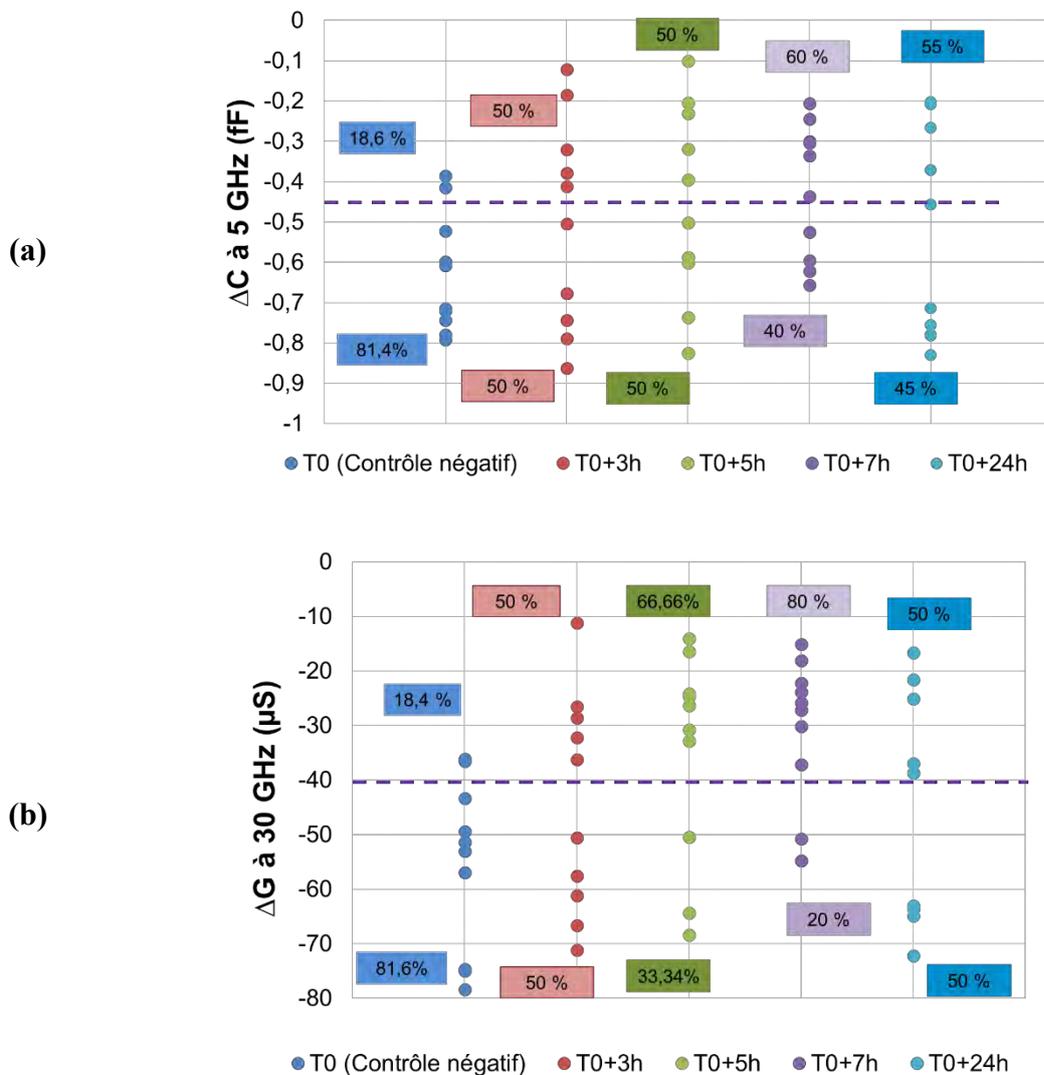


Figure 99 : Mesures quantitatives des contrastes (a) capacitifs $\Delta C_{5\text{ GHz}}$ et (b) conductifs $\Delta G_{30\text{ GHz}}$ des THP1 à différents temps après électroporation à 1.5 kV/cm.

A l'issue des temps d'incubation, les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux associé au PI, afin de corrélérer les résultats obtenus par les deux techniques.

La Figure 100 montre le taux de viabilité cellulaire obtenu à différents temps après IRE, par la spectroscopie diélectrique et par la cytométrie en flux.

Comparées aux cellules contrôles non pulsées, qui présentent un niveau de viabilité de 80%, le champ électrique induit une diminution de la viabilité jusqu'à 50%, 3 et 5 heures après l'EP et jusqu'à 30%, 7 heures après l'EP. Après 24 heures, le taux de viabilité ré-augmente jusqu'à 50% et cela est dû à la prolifération des cellules qui ont résisté aux impulsions électriques. En effectuant une analyse statistique des résultats de la spectroscopie et l'analyse biologique, une excellente corrélation est obtenue.

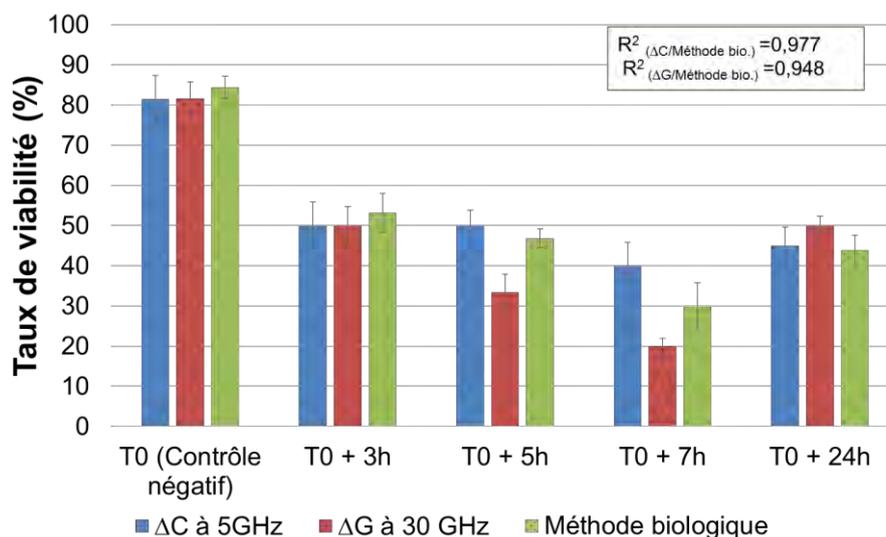


Figure 100 : Comparaison du taux de viabilité obtenu avec la technique électronique et la technique biologique, des cellules THP1, à différents temps après l'électroporation avec 8 impulsions de 1.5 kV/cm, 100 μs, 1 Hz (n=3).

A l'issue de ces deux études (IV.3.2.1 et IV.3.2.2), les résultats expérimentaux mettent en évidence les conclusions suivantes:

- La spectroscopie diélectrique HF permet d'évaluer et de suivre dans le temps les effets de l'EP avec des champs électriques intenses (1 kV/cm ou 1.5 kV/cm) sur la viabilité cellulaire.
- Cette affirmation a été validée au travers d'une comparaison entre la spectroscopie et les techniques utilisées en routine en biologie. Nos résultats montrent une très bonne corrélation (>0.94) reflétant les capacités de robustesse de la spectroscopie diélectrique pour l'analyse biologique et médicale.

- Une étude globale d'un ensemble de cellules, dans une suspension hétérogène, masquant de l'information : le développement de notre micro- biocapteur HF pour spectroscopie à cellule unique démontre aussi toutes ses capacités.

IV.4 Analyse par SDHF des THP1 sous électrochimiothérapie

L'une des applications de l'EP est de faciliter le transport de molécules peu ou pas perméantes à travers la membrane cellulaire et permet de potentialiser ainsi l'effet cytotoxique de drogues anti-tumorale (principe de l'électrochimiothérapie ECT). Dans l'ECT, le but est de perméabiliser toutes les cellules cancéreuses afin de faire rentrer l'agent chimiothérapeutique et cela sans affecter la viabilité des cellules normales. Un train de 8 impulsions d'environ 1.3 kV/cm et de durée de 100 μ s à une fréquence de 1 Hz est appliqué à une tumeur cutanée ou sous-cutanée [56]. Ceci permet la déstabilisation des membranes des cellules cancéreuses et l'entrée des molécules chimiothérapeutiques. Cette méthode est déjà largement utilisée en clinique humaine et vétérinaire [56],[57],[58].

Lors de la recherche des agents chimiothérapeutiques appropriés pour être utilisés avec ECT, nous pourrions faire l'hypothèse que la potentialisation de l'EP pour les molécules polaires hydrophiles avec des cibles intracellulaires serait plus importante que celle pour les molécules apolaires hydrophobes. L'effet de la bléomycine et de la cisplatine par EP est le plus important jusqu'à présent [59], [60]. En effet, la plupart des molécules antitumorales sont capables de traverser la membrane plasmique. Néanmoins, les mécanismes d'absorption sont bien différents. En général, les molécules hydrophobes entrent dans les cellules par diffusion passive et rapide. D'autres molécules nécessitent la présence de transporteurs actifs. De plus, il existe des molécules hydrophiles qui présentent un accès limité à travers la membrane mais peuvent avoir des effets cytotoxiques très importants, une fois qu'elles la traversent. Des tests expérimentaux [60] ont montré une augmentation de 200-700 fois de la cytotoxicité des molécules (comme la bléomycine), qui dans les conditions normales diffusent faiblement à travers la membrane. Quant aux molécules hydrophobes, cette augmentation n'est que de 3-5 fois. Il est donc conclut que l'électroporation potentialise l'effet des molécules qui ont un accès limité vers les cibles intracellulaire.

La bléomycine BLM est isolée de la bactérie *Streptomyces verticillis* en 1965, c'est un glycopeptide hydrophile de masse moléculaire de 1500 Da [61]. Elle est couramment utilisée pour traiter le carcinome spinocellulaire, le cancer des testicules et les lymphomes. Elle ne

dépasse pas la barrière hémato-encéphalique et est éliminée par les reins. Bien que le mécanisme exact de la cytotoxicité de la BLM ne soit pas connu, l'ADN en est la cible principale. La BLM cause des ruptures dans les deux brins de l'ADN, conduisant à des cassures simple et double brins [61]. Il y a probablement d'autres mécanismes d'action de la BLM, par exemple l'induction des espèces réactives de l'oxygène ROS et la peroxydation lipidique [62]. Les cellules dans les phases G2 et M sont plus sensibles à la cytotoxicité de la BLM.

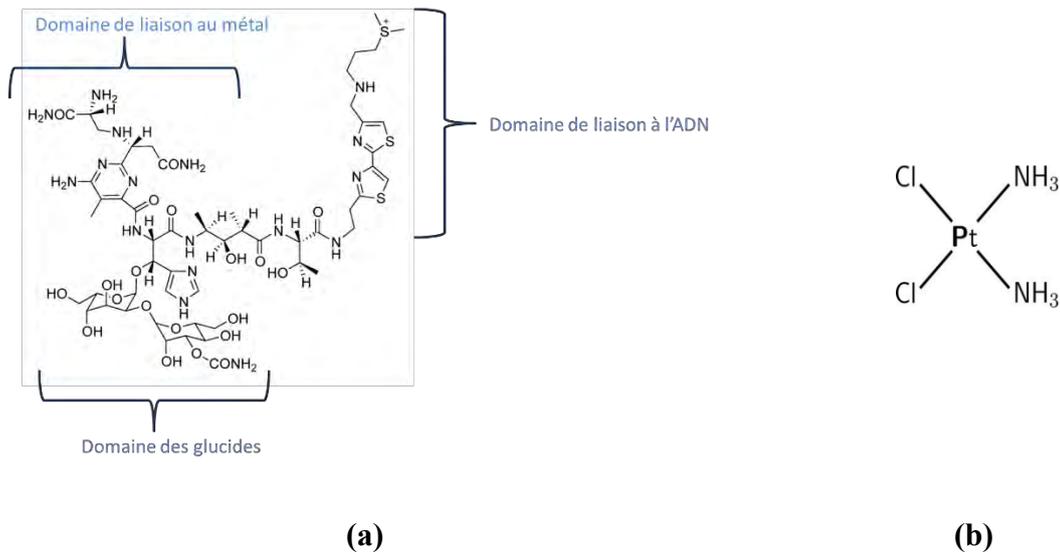


Figure 101 : Molécules de (a) La bléomycine et (b) le cisplatine.

La bléomycine engendre deux types de mort, dépendant du nombre de molécules internalisées. Si quelques centaines jusqu'à quelques milliers de molécules sont internalisées, les cellules mourront d'un processus lent qui s'appelle la mort cellulaire mitotique. Avec plusieurs milliers de molécules internalisées ou plus, les cellules subiront un processus (pseudo) apoptotique plus rapide [61], [63]. Si la cellule ne meurt pas de la bléomycine, son cycle cellulaire s'arrête dans la phase G2 ou M.

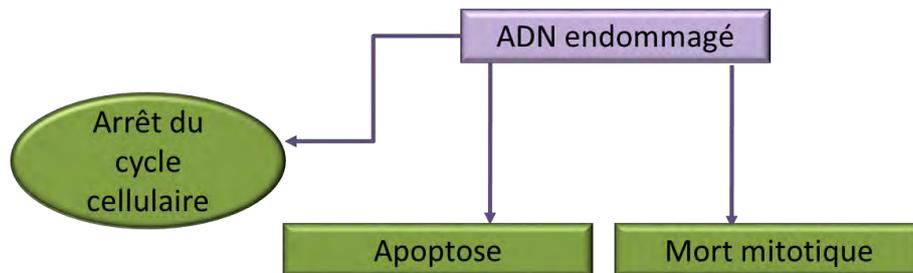


Figure 102 : Les types de la mort cellulaire induits par la bléomycine

En raison de la taille et de la polarité de la bléomycine, sa diffusion à travers la membrane cellulaire est limitée d'une façon très efficace, elle est donc classée comme molécule non perméante. Elle est internalisée par endocytose à l'aide de protéines de transport [61],[64]. Même avec ce mécanisme, moins de 0.1% des molécules présentes dans le milieu sont transportées à l'intérieur des cellules [65]. Il a été montré dans plusieurs études que l'EP améliore énormément l'effet de la bléomycine *in vitro* en augmentant son taux d'internalisation dans les cellules [59],[60],[66],[67],[68].

Le ratio de l'amélioration de la cytotoxicité (cytotoxicity enhancement ratio CER) pour l'EP est défini par l'équation suivante:

$$CER = \frac{\text{La dose nécessaire pour tuer 50\% des cellules sans EP}}{\text{La dose nécessaire pour tuer 50\% des cellules avec EP}}$$

Le CER de la bléomycine *in vitro* varie entre 300 et 5000 et il dépend du type cellulaire traité, comme le montre le Tableau 3 [59], [60], [66], [67].

Tableau 3 : Ratio de l'amélioration de la cytotoxicité CER in vitro de la bléomycine couplée à l'EP dans trois lignées cellulaires différentes.

Lignée cellulaire	Type de cellules	CER
SCC-25	Squamous cell carcinoma (human tongue)	400
DC3-F	Chinese hamster fibroblast	300-700
HMEC-1	Human endothelial cell	5000

Le cisplatine est la deuxième drogue la plus utilisée en ECT. C'est une molécule chimiothérapeutique polaire à base de platine (Figure 101) mais beaucoup plus petite que la bléomycine, elle est considérée donc une molécule peu perméante. Elle est utilisée, par exemple, en combinaison avec la radiothérapie pour le traitement du cancer de la tête et du cou. Il ne sera pas étonnant que la potentialisation du cisplatine par l'EP soit moins importante que celle de la bléomycine, avec un CER de 2.3 *in vitro* [59]. En revanche, les effets cytotoxiques des molécules lipophiles apolaires, comme la daunorubicine, la doxorubicine, l'etoposide et le paclitaxel, ne sont pas améliorés avec l'EP où le CER=1 [59].

En vue des résultats obtenus jusqu'à maintenant nous avons voulu tester la capacité de notre biocapteur à détecter les effets induits par un traitement à la bléomycine couplée à l'électroporation (électrochimiothérapie), sur les cellules THP1. Le but final sera de pouvoir proposer une méthode utilisable dans les laboratoires hospitaliers, qui permet d'évaluer l'effet de différents types de traitement sur les cellules, et cela d'une façon non-invasive, sans ajout de colorants ou de fluorochromes.

Pour cela, des expériences *in vitro* visant à explorer les effets que pouvaient avoir la combinaison de la BLM et des impulsions électriques sur les cellules THP1 sont présentées ici. Nous avons alors exploré différentes conditions de traitement, avec la bléomycine seule ou combinée au champ électrique.

Comme déjà évoqué, différentes intensités du champ électrique peuvent causer différents effets sur les cellules. C'est pour cela que nous utiliserons les paramètres définis pour avoir une perméabilisation réversible : 8 impulsions d'ondes carrées de 1 kV/cm, avec une durée de pulse de 100 μ s et avec une fréquence de 1 Hz.

Dans le but d'évaluer les effets de la bléomycine seule ou couplée à l'EP sur les THP1, une étape d'incubation de 5 minutes avec 250 nMol/L (nanomol/Litre) ou 250 nM de la bléomycine précède l'application des impulsions du champ électrique. Le protocole expérimental est résumé dans la Figure 103.

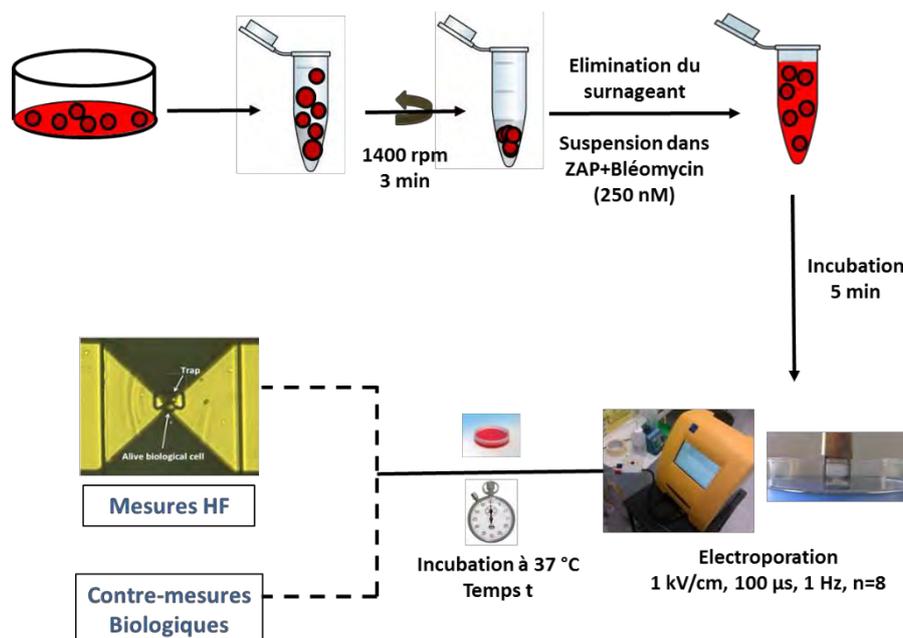


Figure 103 : Protocole expérimental de l'électrochimiothérapie.

Après récupération et comptage, les cellules sont suspendues dans le tampon de pulsation ZAP avec ou sans bléomycine (selon la condition du traitement). Les cellules vont ensuite subir le train d'impulsions avant d'être ré-incubées à 37°C pendant le temps désiré t. A la fin du temps de l'incubation, les cellules sont préparées de la même façon déjà expliquée et injectées dans le canal microfluidique pour une étude spectroscopique hyperfréquence, ou pour effectuer la contre mesure biologique (le test d'exclusion au bleu de trypan).

IV.4.1 Analyse par SDHF de l'effet de la bléomycine couplée à l'électroporation

L'étude de ce paragraphe a pour but d'évaluer d'une part, la potentialisation de la bléomycine avec l'EP sur les cellules THP1, et d'autre part, la capacité de notre bio-capteur à détecter la perte de viabilité cellulaire induite par la rentrée des molécules de bléomycine grâce à l'EP. Dans ce but, 5 différents groupes cellulaires ont été étudiés :

- Groupe 1 : Cellules sans traitement, contrôle négatif
- Groupe 2 : Cellules traitées avec 0.02% de saponine, contrôle positif
- Groupe 3 : Cellules traitées avec la bléomycine seule (à 250 nM/L)
- Groupe 4 : Cellules traitées avec le champ électrique seul (à 1 kV/cm)
- Groupe 5 : Cellules traitées avec ECT (250 nM de bléomycine + 1 kV/cm).

Après le traitement, les cellules sont remises en culture pendant 24 heures, avant de procéder aux mesures hyperfréquences.

Vu le grand nombre de spectres obtenus à l'issue de cette étude, nous présenterons seulement les résultats des contrastes capacitifs et conductifs, à 5 GHz et à 30 GHz respectivement, comme le montre la Figure 104. De la même manière que précédemment expliquée, nous procédons à un tri cellulaire en nous basant sur les valeurs seuils déterminées pour chacun des paramètres HF.

Par comparaison aux cellules non traitées (mortalité basale à 20%), nous pouvons clairement établir que lorsque les cellules ne sont traitées qu'avec la bléomycine seule ou ne sont soumises qu'au champ électrique seul, la mortalité résultante n'est pas sensiblement affectée. Par contre, le traitement par la bléomycine couplée au champ électrique engendre une augmentation du nombre de cellules dépassant le seuil et présentant des signatures électriques caractéristiques de cellules mortes.

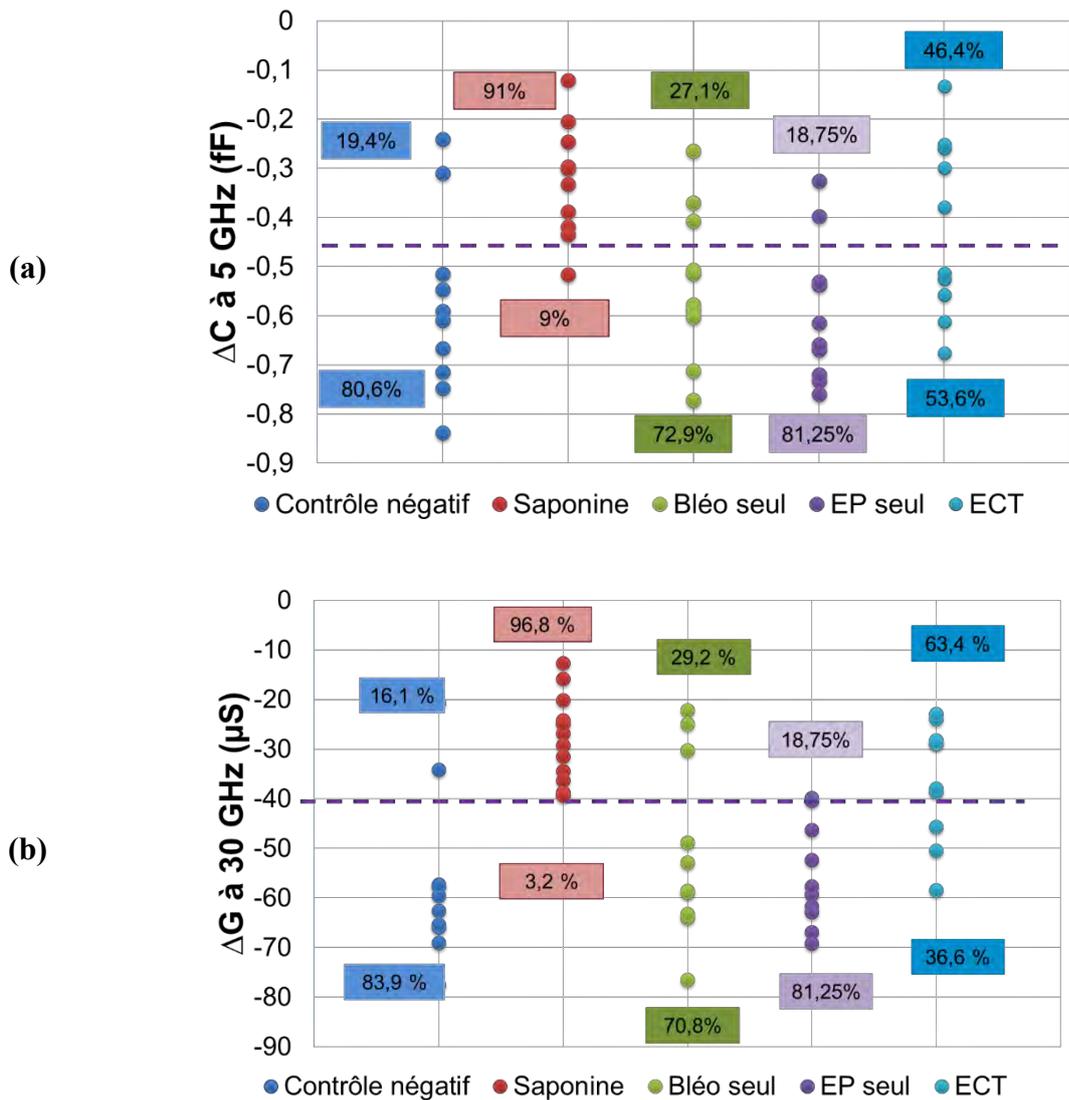


Figure 104 : Contrastes (a) capacitif $\Delta C_{5\text{GHz}}$ et (b) conductif $\Delta G_{30\text{GHz}}$ des cellules avec différents conditions de traitement.

Une quantification du pourcentage de cellules viables (Figure 105) après le traitement démontre l'effet potentialisant de l'effet combinée de la bléomycine et de l'EP (= ECT). Les cellules de contrôle négatif présentent un taux de viabilité aux alentours de 80%. L'EP seule n'a aucun impact sur la viabilité cellulaire et l'effet de la bléomycine n'est que mineur car la diminution de la viabilité n'est que de 10%. L'ECT, quant à elle, induit une nette diminution de la viabilité jusqu'à 50% révélée par ΔC et jusqu'à 35% révélée par ΔG .

Une comparaison statistique entre les résultats obtenus par spectroscopie diélectrique hyperfréquence et ceux obtenus à l'aide du test d'exclusion par le trypan bleu, montre une très bonne corrélation ($R^2 > 0.97$) entre les deux techniques, validant une fois de plus la précision de notre technique pour révéler les effets de l'ECT sur les cellules.

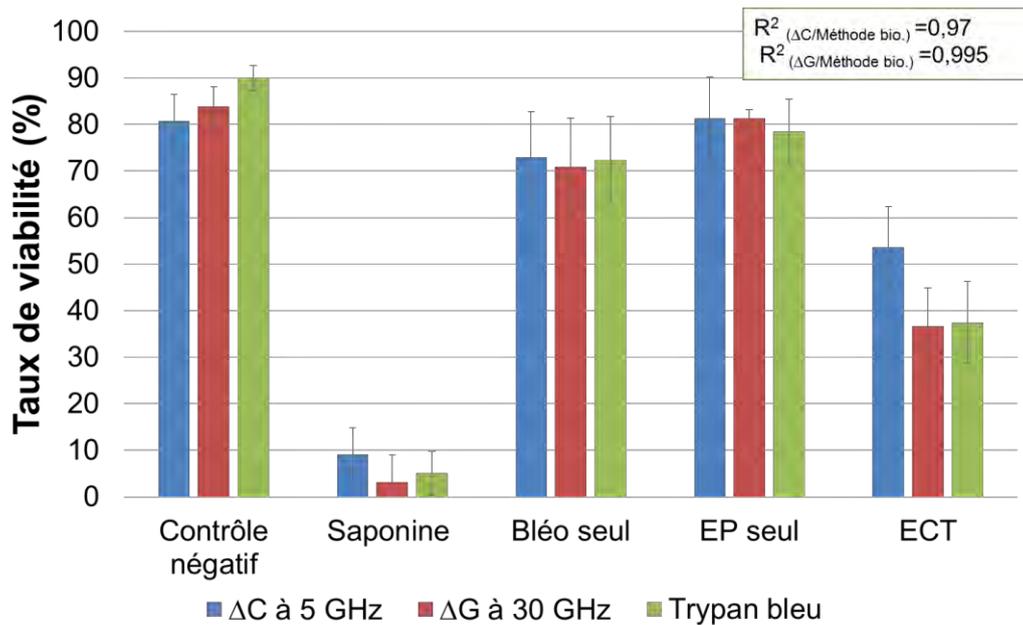


Figure 105 : Comparaison de l'évolution des paramètres ΔC et ΔG extrait de l'analyse diélectrique hyperfréquence et des résultats obtenus avec le test d'exclusion au bleu de trypan.

IV.5 Conclusion

Ce paragraphe IV vous a présenté les résultats expérimentaux d'analyse par spectroscopie HF de cellules individuelles ayant subi différents traitements : chimiques, d'électroporation et enfin d'électrochimiothérapie.

Chaque expérience a été conduite avec un protocole biologique et de mise en œuvre de la spectroscopie HF strict et compatible avec les 2 domaines en synergie (biologie et électronique HF). Pour chaque test, une dizaine de cellules a été mesurée successivement (voir Figures 37, 40 et 45) et les données présentées aux figures 38, 41 et 46 résultent d'expériences tripliquées ($n=3$) amenant à des conclusions « statistiquement acceptables » pour les biologistes.

Sur les 9 situations biologiques investiguées, la classification des niveaux des indicateurs de spectroscopie que sont les contrastes capacitif (ΔC) à 5 GHz et conductif (ΔG) à 30 GHz se révèle être en forte corrélation avec la viabilité cellulaire ($R^2 > 0.94$).

A notre connaissance, c'est la première fois que la spectroscopie HF (dans le domaine du GHz) de cellule unique révèle des résultats en très forte pertinence (corrélation très forte) avec des analyses croisées biologiques.

V. Conclusion

Ainsi, au cours de ce dernier chapitre, nous avons démontré que la spectroscopie HF est capable de produire des données expérimentales de qualité reflétant les propriétés diélectriques de cellules individualisées. La capacité de notre biocapteur à discriminer l'état de viabilité cellulaire a été établie sur une dizaine d'expériences différentes classiquement faites en EP, chacune étant tripliquée et impliquant une dizaine de cellules analysées.

La classification de viabilité effectuée par spectroscopie a tout d'abord été calibrée en appliquant un traitement létal aux cellules avec une molécule chimique : la saponine. A l'issue de cette étude, nous avons défini une valeur seuil sur les deux paramètres diélectrique (ΔC à 5 GHz et ΔG à 30 GHz) nous permettant d'établir la classification viable/non-viable. La classification qui s'en est suivie a été confirmée (corrélée) par des analyses biologiques.

Fort de cette aptitude à la détermination par spectroscopie HF de la viabilité cellulaire, nous avons appliqué cette technique, avec toujours une dizaine de cellules testées et des expériences répliquées 3 fois, pour des traitements classiquement employés par les biologistes investiguant l'EP :

1. EP seule à 1 kV/cm et analyse après 24h,
2. EP seule à 1.5 kV/cm et analyse après 24h,
3. EP seule à 1.5 kV/cm et analyse après 3h,
4. EP seule à 1.5 kV/cm et analyse après 5h,
5. EP seule à 1.5 kV/cm et analyse après 7h,
6. Bléomycine seule à 250 nM et analyse après 24h,
7. Bléomycine à 250 nM et EP à 1 kV/cm (ECT) et analyse après 24h.

L'EP correspond à l'application de 8 impulsions électriques de durée 100 μ s et de fréquence 1 Hz. Ces 7 tests, auxquels se rajoutent les contrôles positifs (cellules sans traitement) et négatifs (cellules traitées avec 0.02% de saponine), sont la résultante de 3 plans d'expérience :

- Analyse par spectroscopie HF de l'effet de l'intensité de champs d'EP → tests 1 et 2 pour des champs de 1 kV/cm puis 1.5 kV/cm
- Suivi post EP par spectroscopie HF → tests 3, 4, 5 et 2 pour un suivi post EP de 3, 5, 7 et 24h

- Analyse par spectroscopie HF de la synergie EP + Bléomycine → tests 1, 6 et 7 pour l'EP seule, la Bléomycine seule et la combinaison des deux (=ECT).

L'ensemble des résultats expérimentaux montrent une excellente corrélation ($R^2 > 0.94$) entre la spectroscopie diélectrique hyperfréquence et les méthodes d'analyse biologique ce qui révèle que la technique HF identifie, avec un degré de fiabilité identique à celui des « gold » standards de la biologie, la viabilité cellulaire.

En conclusion, dans ce chapitre de thèse, nous avons démontré que l'approche par spectroscopie diélectrique hyperfréquence associée aux microtechnologies permettant une analyse de cellules individualisées, est une technique fiable et performante pouvant analyser des cellules sous traitements chimiques et/ou électriques et permettant ainsi d'enrichir la vision que les biologistes peuvent avoir des cellules.

VI. Références du Chapitre III

- [1] J. Gao, X.-F. Yin, and Z.-L. Fang, "Integration of single cell injection, cell lysis, separation and detection of intracellular constituents on a microfluidic chip," *Lab. Chip*, vol. 4, no. 1, pp. 47–52, Feb. 2004.
- [2] M. A. McClain, C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, N. L. Allbritton, C. E. Sims, and J. M. Ramsey, "Microfluidic Devices for the High-Throughput Chemical Analysis of Cells," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 21, pp. 5646–5655, Nov. 2003.
- [3] M. B. Fox *et al.*, "Electroporation of cells in microfluidic devices: a review," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 385, no. 3, pp. 474–485, Jun. 2006.
- [4] G. Pucihar, D. Miklavcic, and T. Kotnik, "A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 56, no. 5, pp. 1491–1501, May 2009.
- [5] K. Kinoshita and T. Y. Tsong, "Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 554, no. 2, pp. 479–497, Jul. 1979.
- [6] M. Pavlin *et al.*, "Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell Suspension," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 6, pp. 4378–4390, Jun. 2005.
- [7] J. Glahder, B. Norrild, M. B. Persson, and B. R. R. Persson, "Transfection of HeLa-cells with pEGFP plasmid by impedance power-assisted electroporation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 92, no. 3, pp. 267–276, Nov. 2005.
- [8] G. Saulis and R. Praneviciūte, "Determination of cell electroporation in small-volume samples by using a mini potassium-selective electrode," *Anal. Biochem.*, vol. 345, no. 2, pp. 340–342, Oct. 2005.
- [9] G. Saulis, S. Šatkauskas, and R. Pranevičiūtė, "Determination of cell electroporation from the release of intracellular potassium ions," *Anal. Biochem.*, vol. 360, no. 2, pp. 273–281, Jan. 2007.
- [10] J. Zhuang, W. Ren, Y. Jing, and J. F. Kolb, "Dielectric evolution of mammalian cell membranes after exposure to pulsed electric fields," *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, vol. 19, no. 2, pp. 609–622, Apr. 2012.
- [11] J. Cheng, E. L. Sheldon, L. Wu, M. J. Heller, and J. P. O'Connell, "Isolation of cultured cervical carcinoma cells mixed with peripheral blood cells on a bioelectronic chip," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 11, pp. 2321–2326, Jun. 1998.
- [12] J. Villemejane *et al.*, "Nanomanipulation of living cells on a chip using electric field: general concepts and microdevices," in *DELTA*, Ho-shi-minh, Vietnam, 2010.
- [13] Y. Huang, R. Hölzel, R. Pethig, and X. B. Wang, "Differences in the AC electrostatics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies," *Phys. Med. Biol.*, vol. 37, no. 7, pp. 1499–1517, Jul. 1992.
- [14] 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," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 3, pp. 860–864, Jan. 1995.
- [15] P. Gascoyne, C. Mahidol, M. Ruchirawat, J. Satayavivad, P. Watcharavit, and F. F. Becker, "Microsample preparation by dielectrophoresis: isolation of malaria," *Lab. Chip*, vol. 2, no. 2, pp. 70–75, May 2002.
- [16] E. Salimi *et al.*, "Electroporation and dielectrophoresis of single cells using a microfluidic system employing a microwave interferometric sensor," in *Microwave Symposium Digest (IMS), 2013 IEEE MTT-S International*, 2013, pp. 1–4.
- [17] J. Oblak, D. Krizaj, S. Amon, A. Macek-Lebar, and D. Miklavcic, "Feasibility study for cell electroporation detection and separation by means of dielectrophoresis," *Bioelectrochemistry Amst. Neth.*, vol. 71, no. 2, pp. 164–171, Nov. 2007.
- [18] C. I. Trainito, O. Français, and B. Le Pioufle, "Monitoring the permeabilization of a single cell in a microfluidic device, through the estimation of its dielectric properties based on combined

- dielectrophoresis and electrorotation in situ experiments,” *Electrophoresis*, vol. 36, no. 9–10, pp. 1115–1122, May 2015.
- [19] T. Ci, B. E. S. F. O., and L. P. B., “The Electrorotation as a Tool to Monitor the Dielectric Properties of Spheroid During the Permeabilization,” *J. Membr. Biol.*, vol. 249, no. 5, pp. 593–600, 2016.
- [20] A. Tixier-Mita *et al.*, “Detection of micro-beads by impedance spectroscopy: Towards a wholly integrated electronic device for biological cells applications,” in *2014 Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS (DTIP)*, 2014, pp. 1–6.
- [21] H. E. Ayliffe, A. B. Frazier, and R. D. Rabbitt, “Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrated metal electrodes,” *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 8, no. 1, pp. 50–57, Mar. 1999.
- [22] S. Gawad, L. Schild, and P. H. Renaud, “Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing,” *Lab. Chip*, vol. 1, no. 1, pp. 76–82, Sep. 2001.
- [23] A. Mercanzini, P. Colin, J.-C. Bensadoun, A. Bertsch, and P. Renaud, “In vivo electrical impedance spectroscopy of tissue reaction to microelectrode arrays,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 56, no. 7, pp. 1909–1918, Jul. 2009.
- [24] K. J. Müller, M. Horbaschek, K. Lucas, U. Zimmermann, and V. L. Sukhorukov, “Electrotransfection of anchorage-dependent mammalian cells,” *Exp. Cell Res.*, vol. 288, no. 2, pp. 344–353, Aug. 2003.
- [25] T. García-Sánchez, M. Guitart, J. Rosell-Ferrer, A. M. Gómez-Foix, and R. Bragós, “A new spiral microelectrode assembly for electroporation and impedance measurements of adherent cell monolayers,” *Biomed. Microdevices*, vol. 16, no. 4, pp. 575–590, Aug. 2014.
- [26] S. C. Bürgel, C. Escobedo, N. Haandbæk, and A. Hierlemann, “On-chip electroporation and impedance spectroscopy of single-cells,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 210, pp. 82–90, Apr. 2015.
- [27] C. I. Trainito, O. Français, and B. Le Pioufle, “Analysis of pulsed electric field effects on cellular tissue with Cole–Cole model: Monitoring permeabilization under inhomogeneous electrical field with bioimpedance parameter variations,” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 29, pp. 193–200, May 2015.
- [28] A. L. Garner *et al.*, “Ultrashort electric pulse induced changes in cellular dielectric properties,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 362, no. 1, pp. 139–144, Oct. 2007.
- [29] G. Chen *et al.*, “Conductivity in Jurkat cell suspension after ultrashort electric pulsing,” presented at the 3rd International workshop on biological effect of EMFs, 2004.
- [30] K. Grenier *et al.*, “Recent Advances in Microwave-based Dielectric Spectroscopy at the Cellular Level for Cancer Investigations,” *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 61, no. 5, pp. 2023–2030, May 2013.
- [31] “PETALE | Mesure de bioimpédance électrique par capteurs interdigités.” [Online]. Available: <https://petale.univ-lorraine.fr/notice/view/univ-lorraine-ori-20275?resultBackUrl=>. [Accessed: 20-Nov-2016].
- [32] K. Grenier *et al.*, “Integrated Broadband Microwave and Microfluidic Sensor Dedicated to Bioengineering,” *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 57, no. 12, pp. 3246–3253, Dec. 2009.
- [33] J. Zhao, “Cell individuality: A basic multicellular phenomenon and its role in the pathogenesis of disease,” *Med. Hypotheses*, vol. 44, no. 5, pp. 400–402, May 1995.
- [34] T. Chen, F. Artis, D. Dubuc, J. J. Fournié, M. Poupot, and K. Grenier, “Microwave biosensor dedicated to the dielectric spectroscopy of a single alive biological cell in its culture medium,” in *Microwave Symposium Digest (IMS), 2013 IEEE MTT-S International*, 2013, pp. 1–4.
- [35] G. A. Ferrier, S. F. Romanuik, D. J. Thomson, G. E. Bridges, and M. R. Freeman, “A microwave interferometric system for simultaneous actuation and detection of single biological cells,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 23, pp. 3406–3412, Dec. 2009.
- [36] Y. Ning *et al.*, “Broadband Electrical Detection of Individual Biological Cells,” *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 62, no. 9, pp. 1905–1911, Sep. 2014.
- [37] Y. Yang *et al.*, “Distinguishing the viability of a single yeast cell with an ultra-sensitive radio frequency sensor,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 5, pp. 553–555, Mar. 2010.
- [38] T. Chen, *Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasive de la cellule unique : applications en cancérologie*. Toulouse 3, 2012.

- [39] J. Zhang, K. L. Tan, and H. Q. Gong, "Characterization of the polymerization of SU-8 photoresist and its applications in micro-electro-mechanical systems (MEMS)," *ResearchGate*, vol. 20, no. 6, pp. 693–701, Sep. 2001.
- [40] Y.-J. Chuang, F.-G. Tseng, J.-H. Cheng, and W.-K. Lin, "A novel fabrication method of embedded micro-channels by using SU-8 thick-film photoresists," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 103, no. 1–2, pp. 64–69, Jan. 2003.
- [41] "Principes fondamentaux de l'analyse de réseaux - National Instruments." [Online]. Available: <http://www.ni.com/white-paper/11640/fr/#toc3>. [Accessed: 17-Nov-2016].
- [42] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada, "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)," *Int. J. Cancer*, vol. 26, no. 2, pp. 171–176, Aug. 1980.
- [43] K. V. Balan *et al.*, "Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, Chios mastic gum," *Vivo Athens Greece*, vol. 19, no. 1, pp. 93–102, Feb. 2005.
- [44] M. Shakibaei, A. Mobasheri, C. Lueders, F. Busch, P. Shayan, and A. Goel, "Curcumin Enhances the Effect of Chemotherapy against Colorectal Cancer Cells by Inhibition of NF- κ B and Src Protein Kinase Signaling Pathways," *PLOS ONE*, vol. 8, no. 2, p. e57218, févr 2013.
- [45] M. Mold, H. Eriksson, P. Siesjö, A. Darabi, E. Shardlow, and C. Exley, "Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 6287, Sep. 2014.
- [46] I. Podolak, A. Galanty, and D. Sobolewska, "Saponins as cytotoxic agents: a review," *Phytochem. Rev.*, vol. 9, no. 3, pp. 425–474, Sep. 2010.
- [47] E. Baumann, G. Stoya, A. Völkner, W. Richter, C. Lemke, and W. Linss, "Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure," *Acta Histochem.*, vol. 102, no. 1, pp. 21–35, Feb. 2000.
- [48] E. De Geyter, L. Swevers, T. Soin, D. Geelen, and G. Smagghe, "Saponins do not affect the ecdysteroid receptor complex but cause membrane permeation in insect culture cell lines," *J. Insect Physiol.*, vol. 58, no. 1, pp. 18–23, Jan. 2012.
- [49] A. Cabrera-Orozco, C. Jiménez-Martínez, and G. Dávila-Ortiz, "Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functionality," 2013.
- [50] J. Teissie, M. Golzio, and M. P. Rols, "Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1724, no. 3, pp. 270–280, Aug. 2005.
- [51] M. R. Prausnitz, B. S. Lau, C. D. Milano, S. Conner, R. Langer, and J. C. Weaver, "A quantitative study of electroporation showing a plateau in net molecular transport.," *Biophys. J.*, vol. 65, no. 1, pp. 414–422, Jul. 1993.
- [52] M. P. Rols and J. Teissie, "Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon.," *Biophys. J.*, vol. 58, no. 5, pp. 1089–1098, Nov. 1990.
- [53] M. P. Rols and J. Teissie, "Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration.," *Biophys. J.*, vol. 75, no. 3, pp. 1415–1423, Sep. 1998.
- [54] P. J. Canatella, J. F. Karr, J. A. Petros, and M. R. Prausnitz, "Quantitative Study of Electroporation-Mediated Molecular Uptake and Cell Viability," *Biophys. J.*, vol. 80, no. 2, pp. 755–764, Feb. 2001.
- [55] B. Gabriel and J. Teissie, "Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1266, no. 2, pp. 171–178, Apr. 1995.
- [56] M. Marty *et al.*, "Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study," *Eur. J. Cancer Suppl.*, vol. 4, no. 11, pp. 3–13, Nov. 2006.
- [57] L. W. Matthiessen, H. H. Johannesen, H. W. Hendel, T. Moss, C. Kamby, and J. Gehl, "Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: a phase II clinical trial," *Acta Oncol. Stockh. Swed.*, vol. 51, no. 6, pp. 713–721, Jul. 2012.

- [58] Y. Tamzali, L. Borde, M. P. Rols, M. Golzio, F. Lyazrhi, and J. Teissie, "Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: a retrospective study of 48 cases," *Equine Vet. J.*, vol. 44, no. 2, pp. 214–220, Mar. 2012.
- [59] J. Gehl, T. Skovsgaard, and L. M. Mir, "Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs," *Anticancer. Drugs*, vol. 9, no. 4, pp. 319–325, Apr. 1998.
- [60] S. Orłowski, J. Bełhradec, C. Paoletti, and L. M. Mir, "Transient electroporation of cells in culture," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 37, no. 24, pp. 4727–4733, Dec. 1988.
- [61] L. M. Mir, O. Tounekti, and S. Orłowski, "Bleomycin: revival of an old drug," *Gen. Pharmacol.*, vol. 27, no. 5, pp. 745–748, Jul. 1996.
- [62] A. Gothelf, L. M. Mir, and J. Gehl, "Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 29, no. 5, pp. 371–387, Oct. 2003.
- [63] O. Tounekti, G. Pron, J. Bełhradec, and L. M. Mir, "Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized," *Cancer Res.*, vol. 53, no. 22, pp. 5462–5469, Nov. 1993.
- [64] G. Pron *et al.*, "Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 57, no. 1, pp. 45–56, Jan. 1999.
- [65] S. N. Roy and S. B. Horwitz, "Characterization of the association of radiolabeled bleomycin A2 with HeLa cells," *Cancer Res.*, vol. 44, no. 4, pp. 1541–1546, Apr. 1984.
- [66] M. Cemazar, C. S. Parkins, A. L. Holder, D. J. Chaplin, G. M. Tozer, and G. Sersa, "Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy," *Br. J. Cancer*, vol. 84, no. 4, pp. 565–570, Feb. 2001.
- [67] G. A. Hofmann, S. B. Dev, S. Dimmer, and G. S. Nanda, "Electroporation therapy: a new approach for the treatment of head and neck cancer," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 46, no. 6, pp. 752–759, Jun. 1999.
- [68] B. Poddevin, S. Orłowski, J. Bełhradec, and L. M. Mir, "Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 42, pp. S67–S75, Dec. 199.

Conclusion générale et perspectives

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit porte sur la spectroscopie diélectrique hyperfréquence et l'efficacité de son utilisation dans le cadre de l'analyse des cellules soumises à l'électroporation seule ou couplée à une molécule cytotoxique (électrochimiothérapie).

Nos travaux peuvent être découpés en deux parties distinctes mais complémentaires et contiguës et dont cette conclusion va souligner la synergie.

La première partie a été consacrée à la transposition à l'échelle micrométrique (quelques dizaines de micromètres pour le traitement de quelques dizaines de cellules) de l'électroporation cellulaire qui est usuellement réalisée/maitrisée à l'échelle de quelques millimètres pour le traitement de quelques centaines de milliers de cellules. Nous avons démontré par simulation et expérimentalement l'efficacité de l'électroporation on-chip réalisée sur un micro-composant microfluidique développé au LAAS-CNRS. Cette efficacité se traduit en termes (1) de tensions nécessaires qui sont de l'ordre de quelques volts seulement, (2) de taux de perméabilisation : quasi 100% pour une tension inter-électrodes de 6V (8 impulsions de 100 μ s répétées toutes les secondes) et (3) de viabilité cellulaire post EP : 94% pour une tension inter-électrodes de 6V (8 impulsions de 100 μ s répétées toutes les secondes).

La deuxième partie du travail a été basée sur la spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules individualisées avec objectif de démontrer l'intérêt de son emploi pour l'analyse des effets de l'électroporation. Nous avons ainsi pu expérimentalement démontrer, aux travaux de plus de trois cents caractérisations de cellules individuelles déclinant sept tests, chacun tripliqué et organisé en trois plans d'expériences, une très forte corrélation entre les résultats de spectroscopie HF et les résultats biologiques d'évaluation de la viabilité cellulaire. Nous avons notamment pu démontrer que la spectroscopie HF est capable de quantifier et suivre l'effet potentialisé de molécules thérapeutiques par le champ électrique, sur les cellules. Ces résultats révèlent que la spectroscopie diélectrique hyperfréquence est une technique fiable (autant que les « gold » standards de la biologie) et performante (à forte potentialité – voir ci-dessous –) pouvant analyser des cellules sous traitements chimiques et/ou électriques.

Pendant nos travaux de thèse, nous nous sommes confrontés à plusieurs problématiques qui nous ont permis de mieux appréhender la complexité d'étudier le vivant. Nos expérimentations nous ont permis d'obtenir différents résultats innovants tout en ouvrant différentes perspectives.

En effet, l'électrogénothérapie constitue une application très intéressante de l'électroporation, comme expliqué dans le chapitre I. Il serait donc intéressant d'appliquer notre métrologie d'EP sur puce afin d'étudier ce phénomène, dans le but d'améliorer le taux de réussite de transfection cellulaires.

Fort de la validation de la fiabilité de la spectroscopie HF à évaluer la viabilité cellulaire, nous pouvons raisonnablement envisager que l'opération dans cette gamme de fréquence (GHz) soit très prometteuse pour l'analyse de matériels biologiques, puisque les ondes électromagnétiques pénètrent alors à l'intérieur de la cellule en sondant son contenu. La manière dont nous avons traité les résultats de spectroscopie nous a, en effet, limité (à la détection de viabilité) dans ce qu'elle est capable de révéler. Dès lors que notre approche est maintenant « biologiquement » validée, il serait intéressant d'effectuer une analyse plus fine des spectres HF obtenus dans les différentes conditions, pour en retirer plus d'informations intracellulaires que la viabilité.

Au cours de ce travail, deux briques distinctes ont été posées: l'électroporation on-chip et l'analyse de l'électroporation par la spectroscopie diélectrique HF. Pour chacune des briques, nous avons veillé à leur inter-compatibilité. Il serait donc intéressant de pouvoir faire fusionner (c'est à dire de co-intégrer) ces deux briques afin de mener une analyse par spectroscopie diélectrique HF de cellules individualisés électroporées et/ou chimiquement traitées *in-situ*. Nous désignons par *in situ* la possibilité de faire l'électroporation et/ou le traitement chimique d'une cellule unique au sein du micro-composant présenté au chapitre 3 et de suivre les variations de la signature HF immédiatement après le traitement. Cette perspective d'étude permet ainsi de remettre en lumière l'ensemble de notre travail visant la convergence des microtechnologies, des hyperfréquences et de la biologie dans le contexte de l'électroporation.

Production Scientifique

Revues Internationales

A. Tamra, D. Dubuc, M.P. Rols, K. Grenier, “*Microwave Monitoring of Single Cell Monocytes Subjected to Electroporation*”, Transactions on Microwave Theory and Techniques, 2016 (Accepté).

A. Tamra, D. Dubuc, M.P. Rols, K. Grenier, “*On-chip electroporation device with interdigitated electrodes for delivery of foreign molecules*”, Lab on Chip, 2016 (En rédaction).

Conférences Internationales

A. Tamra, D. Dubuc, M.P. Rols, K. Grenier, “*Microwave dielectric spectroscopy for single cell irreversible electroporation monitoring*”, International Microwave Symposium, Mai 2016, San Francisco, Californie, Etats-Unis. (Oral)

A. Tamra, D. Dubuc, K. Grenier, M.P. Rols, “*Microwave sensing of cells subjected to ElectroChemoTherapy ECT*”, World Congress on Electroporation, Septembre 2015, Portoroz, Slovénie. (Oral)

A. Tamra, D. Dubuc, K. Grenier, M.P. Rols, “*New micro-devices, using electromagnetic sensor, dedicated for analysis of cells subjected to ElectroChemoTherapy ECT*”, Electroporation based Technologies and Treatments International Workshop, Novembre 2014, Ljubljana, Slovénie. (Oral).

