



HAL
open science

Développement de laboratoires sur puce à ondes électromagnétiques pour l'étude du potentiel cancérigène de nano vésicules

Elisa Lambert

► **To cite this version:**

Elisa Lambert. Développement de laboratoires sur puce à ondes électromagnétiques pour l'étude du potentiel cancérigène de nano vésicules. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0122 . tel-03948780

HAL Id: tel-03948780

<https://theses.hal.science/tel-03948780v1>

Submitted on 20 Jan 2023

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

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

Université de Limoges
ED 653 - Sciences et Ingénierie (SI)
XLIM – UMR CNRS 7252 – Axe RF Elite

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Discipline : Electronique des Hautes Fréquences, Photonique et Système

Présentée et soutenue par
Elisa Lambert

Le 18 novembre 2022

**Développement de laboratoires sur puce à ondes électromagnétiques
pour l'étude du potentiel cancérigène de nano vésicules**

Thèse dirigée par Annie BESSAUDOU, Claire DALMAY et Arnaud POTHIER

JURY :

Président du Jury

M. Fabrice Lalloué, Professeur, UMR INSERM CAPTuR, Université de Limoges

Rapporteurs

M. Morgan Delarue, Chargé de Recherche CNRS, LAAS, Université de Toulouse

M. Olivier Français, Professeur à l'ESIEE, Responsable Département Santé, Energie et Environnement Laboratoire ESYCOM

Examineurs

M. Vincent Senez, Directeur de Recherche CNRS HDR au Laboratoire CANTHER

M. Dominique Rebière, Professeur, IMS, Université de Bordeaux

Mme. Annie Bessaudou, Professeur, XLIM, Université de Limoges

Mme. Claire Dalmay, Maître de conférences, XLIM, Université de Limoges

M. Arnaud Pothier, Chargé de Recherche CNRS, XLIM, Université de Limoges



A toutes celles et ceux qui m'ont soutenu, me soutiennent et me soutiendront

Le succès c'est de tomber sept fois, se relever huit.
Proverbe japonais

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut de Recherche XLIM, au sein de l'équipe RF Elite. Je tiens à remercier Monsieur Stéphane Bila, directeur d'XLIM, de m'avoir accueillie au sein de l'institut XLIM.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes encadrants de thèse : Madame Claire Dalmay, Maître de conférence à l'Université de Limoges pour sa bienveillance, son enthousiasme et ses précieux conseils ; Monsieur Arnaud Pothier, chargé de recherche CNRS à XLIM, pour sa disponibilité, sa patience et ses avis judicieux dans l'orientation et le suivi de mes travaux de thèse. Votre confiance et votre soutien m'ont profondément touché tout au long de ces trois années. J'adresse également mes remerciements à ma directrice de thèse Madame le Professeur Annie Bessaudou d'XLIM pour son attention et ses conseils avisés.

Je souhaite remercier Monsieur le Professeur Fabrice Lalloué du laboratoire CAPTuR d'avoir accepté d'être le rôle de président de jury. J'exprime également ma reconnaissance à Monsieur Morgan Delarue, chargé de recherche du CNRS au LAAS et Monsieur le Professeur Olivier Français l'ESIEE d'avoir accepté de rapporter ce travail et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit. Je tiens aussi à remercier Monsieur Vincent Senez, directeur de recherche CNRS au laboratoire CANTHER, Monsieur le Professeur Dominique Rebière du laboratoire IMS d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et de participer à ce jury.

Un grand merci à l'équipe des biologistes du laboratoire CAPTuR : Madame Barbara Bessette, Madame le Professeur Muriel Mathonnet et Monsieur le Professeur Fabrice Lalloué pour leur patience et leur pédagogie. J'adresse des remerciements particuliers et toute mon amitié à Elodie Barthout, doctorante, pour ses valeurs humaines, son implication et la qualité de notre travail en binôme en dépit des perturbations des activités de recherche en raison de la COVID-19.

Je voudrais remercier Monsieur Cyril Guines pour ses formations et ses conseils lors des phases de fabrication en salle blanche. Merci également à Madame Marie-Laure Guillat qui contribue de façon très importante au bon déroulement de notre vie au laboratoire.

J'adresse des remerciements particuliers à Monsieur le Professeur Ronald Pethig, professeur émérite de l'Université d'Edimbourg et père de la diélectrophorèse pour sa disponibilité, ses conseils et son chaleureux soutien qu'il a témoigné à mon égard.



Un merci sincère à mes collègues et amis doctorants : Thomas, Nour, Nicolas, Ricardo, Eduard, Vincent, Rosa, Benjamin, Mouyad et Léonel pour tous les moments de joie et de partage que nous avons passés ensemble.

Enfin, un énorme merci à ma famille! Chers parents Domi et Thierry, mon frère Arno, merci pour vos encouragements, votre soutien sans faille et votre réconfort dans les moments difficiles. J'ajoute une pensée affectueuse pour mes grands-parents qui m'éclairent de leur amour depuis le ciel.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Glossaire

AC : Courant Alternatif
ATCC : American Type Culture Collection
BACS : Buoyancy Activated Cell Sorting
CCR : Cancer Colorectal
CSCs : Cellules Cancéreuses Souches
DC : Courant Continu
DEP : Diélectrophorèse
DLD : Déplacement Latéral Déterministe
DM : milieu de culture défini indifférenciant les cellules
EVs : Vésicules Extracellulaires
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting
 f_{cm} : Facteur de Clausius-Mossotti
 f_{x01} : Première Fréquence de Transition
 f_{x02} : Deuxième Fréquence de Transition
GBM : Glioblastome Multiforme
MVE : Endosome Multivésiculaire
nDEP : Diélectrophorèse Négative
NHS : N-hydroxysulfosuccinimide
NK : Natural Killer
NM : milieu de culture normal différenciant les cellules
pDEP : Diélectrophorèse Positive
PDMS : PolyDiMéthylSiloxane
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
RMS : Root Mean Square
SVF : Sérum Foetal de Veau
UHF : Ultra Haute Fréquence



Table des matières

| | |
|--|----|
| Introduction générale | 20 |
| Chapitre I. Contexte biologique et physique | 24 |
| I. Introduction | 25 |
| II. Les vésicules extracellulaires : historique de leur découverte et leur rôle au sein de la tumeur ... | 26 |
| II.1. Que sont les vésicules extracellulaires ? | 26 |
| II.2. Les oncosomes : les vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules cancéreuses | 28 |
| II.2.1. Dans le micro-environnement de la tumeur | 29 |
| II.2.2. Dérégulation du système immunitaire | 29 |
| II.2.3. Préparation des niches métastatiques dans les sites secondaires | 31 |
| II.3. Le transfert d'agressivité des cellules souches cancéreuses via les oncosomes | 32 |
| III. Le tri cellulaire comme outils de caractérisation | 35 |
| III.1. Méthodes avec marqueurs cellulaires | 35 |
| III.1.1. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) | 35 |
| III.1.2. Buoyancy Activated Cell Sorting (BACS) | 37 |
| III.2. Méthodes « label-free » | 39 |
| III.2.1. Méthodes passives | 39 |
| III.2.1.a. Déplacement latéral déterministe (DLD) | 39 |
| III.2.1.b. Fractionnement par force de portance et flux de Dean | 41 |
| III.2.2. Méthodes actives | 43 |
| III.2.2.a. Pincés optiques | 43 |
| III.2.2.b. Magnétophorèse | 44 |
| IV. Principe de la diélectrophorèse | 46 |
| IV.1. Polarisation de la particule et force diélectrophorétique | 47 |
| IV.1.1. Phénomène de polarisation | 47 |
| IV.1.2. Force diélectrophorétique | 50 |
| IV.1.2.a. Diélectrophorèse à onde progressive | 51 |
| IV.1.2.b. Diélectrophorèse conventionnelle | 53 |
| IV.2. Pourquoi la DEP Ultra Haute Fréquence ? | 54 |
| IV.2.1. Qu'est-ce qu'une cellule biologique et comment la modéliser physiquement ? | 54 |
| IV.2.2. Propriétés cellulaires influençant la réponse diélectrophorétique | 58 |
| IV.2.3. Exemples d'applications de la diélectrophorèse en basse fréquence | 63 |
| IV.3. Influence des cellules biologiques comme objets diélectriques sur le champ électrique | 65 |
| IV.3.1. Etude de la réflexion du champ électrique à la surface d'un dioptré aux propriétés différentes : application à une sphère homogène | 66 |
| IV.3.2. Lien entre le coefficient de réflexion du champ électrique et le facteur de Clausius-Mossotti | 76 |
| V. Conclusion du Chapitre I | 80 |
| VI. Référence bibliographique du Chapitre I | 81 |
| Chapitre II. Caractérisation d'une cellule individuelle par diélectrophorèse en Ultra Haute Fréquence dans le but d'une discrimination phénotypique | 88 |
| I. Introduction | 89 |
| II. Fonctionnalités du système de caractérisation microfluidique | 91 |
| II.1. Design et banc expérimental du système de caractérisation cellulaire | 91 |
| II.1.1. Design du système de caractérisation cellulaire | 91 |
| II.1.2. Banc expérimental du système de caractérisation cellulaire | 94 |



| | |
|---|-----|
| II.2. Détermination des fréquences de transition f_{x01} et f_{x02} à l'aide du capteur électromagnétique | 95 |
| III. Conditions expérimentales | 98 |
| III.1. Préparation du milieu de suspension cellulaire pour la caractérisation par UHF-DEP | 99 |
| III.2. Choix des lignées cellulaires étudiées | 101 |
| III.2.1. Lignée cellulaire du glioblastome | 101 |
| III.2.2. Lignées cellulaires du cancer colorectal | 101 |
| III.3. Préparation cellulaire et extraction des oncosomes | 103 |
| III.3.1. Enrichissement de la population en cellules souches cancéreuses | 104 |
| III.3.1.a. Par des milieux induisant différents phénotypes | 104 |
| III.3.1.b. Analyse transcriptomique comparative | 106 |
| III.3.2. Extraction et incubation des oncosomes | 108 |
| IV. Discrimination du phénotype cellulaire grâce au microsystème de caractérisation cellulaire : mise en avant du potentiel de la UHF-DEP | 109 |
| IV.1. Identification de la signature UHF-DEP comme biomarqueur électromagnétique discriminant pertinent | 109 |
| IV.1.1. Enrichissement en cellules cancéreuses souches dans le milieu défini DM | 110 |
| IV.1.2. Signatures électromagnétiques f_{x01} et f_{x02} | 111 |
| IV.2. Suivi cinétique de l'acquisition du phénotype souche des cellules cancéreuses différenciées dans un milieu d'enrichissement en CSCs | 113 |
| IV.2.1. Lignée du glioblastome U87-MG | 114 |
| IV.2.2. Lignées du cancer colorectal SW480 et SW620 | 116 |
| IV.3. Suivi cinétique du potentiel transformant des oncosomes sécrétés par des cellules cancéreuses différenciées et par des cellules cancéreuses souches | 121 |
| IV.3.1. Le potentiel différenciant des oncosomes provenant des lignées cellulaires | 122 |
| IV.3.2. Le potentiel différenciant des oncosomes provenant des cultures primaires | 132 |
| IV.3.2.a. Suivi cinétique de l'acquisition du phénotype souche des cellules de cultures primaires dans un milieu d'enrichissement en CSCs | 132 |
| IV.3.2.b. Evaluation du potentiel transformant des EVs de cultures primaires | 135 |
| V. Conclusion du Chapitre II | 139 |
| VI. Référence bibliographique du Chapitre II | 141 |
| Chapitre III. Développement d'un cytomètre électromagnétique basé sur la diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence pour le tri cellulaire en flux | 143 |
| I. Introduction | 144 |
| II. Développement d'un outil de dimensionnement des canaux microfluidiques | 148 |
| II.1. Notions de microfluidique | 148 |
| II.1.1. Calcul des résistances microfluidiques | 150 |
| II.1.2. S'affranchir des contre-pressions extérieures | 153 |
| II.2. Logiciel python avec interfaces graphiques | 155 |
| II.3. Validation fluidique du logiciel de conception développé sous python | 159 |
| III. Conception du microsystème de tri cellulaire de CSCs | 163 |
| III.1. Optimisation microfluidique du cytomètre électromagnétique | 164 |
| III.1.1. Développement d'un module de focalisation cellulaire à l'entrée du canal principal du cytomètre | 164 |
| III.1.2. Optimisation du module de collecte des cellules triées en sortie du canal principal du cytomètre | 172 |
| III.1.3. Géométrie finale du réseau fluidique du cytomètre électromagnétique | 175 |



| | |
|---|-----|
| III.2. Choix de la géométrie des électrodes de déviation..... | 177 |
| III.3. Procédé de fabrication du cytomètre électromagnétique..... | 181 |
| III.3.1. Test de la photolithographie par écriture laser afin de connaître les doses et la vitesse d'écriture optimale..... | 181 |
| III.3.2. Réalisation du tampon en PDMS..... | 184 |
| III.3.3. Fabrication des électrodes | 186 |
| IV. Mise en œuvre expérimentale du cytomètre en flux | 188 |
| IV.1. Validation de l'efficacité du module de focalisation microfluidique | 189 |
| IV.2. Premier test fonctionnel : déviation d'une population cellulaire..... | 190 |
| IV.3. Tri et isolation des CSCs à partir d'une population cellulaire mixte | 194 |
| V. Conclusion du Chapitre III | 200 |
| VI. Référence bibliographique du Chapitre III..... | 202 |
| Conclusions et Perspectives | 204 |
| I. Conclusion | 205 |
| II. Perspectives | 208 |
| II.1. Création d'une banque de signatures électromagnétiques | 208 |
| II.2. Le biocapteur comme outil d'analyse biologique en single-cell | 211 |
| II.3. A la recherche de la valeur du facteur de Clausius-Mossotti aux fréquences d'intérêt | 215 |
| III. Références bibliographiques | 217 |
| Annexes | 218 |
| Productions scientifiques | 222 |



Table des illustrations

| | |
|---|----|
| Figure I.1 : (à gauche) Représentation schématique de la libération des exosomes de la cellule vers le milieu extracellulaire. (à droite) Schéma d'un exosome et de son contenu [4]..... | 27 |
| Figure I.2 : Description schématique du rôle des oncosomes (points rouges) dans la genèse des tumeurs. (A) Favorisation de la vasculogénèse et de la prolifération des cellules tumorales dans le micro-environnement de la tumeur. (B) Préparation des niches pré-métastatiques. (C) Dérégulation des fonctions immunitaires en entravant la réponse anti-tumorale. (D) Recrutement des cellules souches de la moelle osseuse [16]. | 28 |
| Figure I.3 : Schéma explicatif du rôle des CSCs dans la résistance thérapeutique et l'apparition de rechutes [31] | 33 |
| Figure I.4 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux par fluorescence | 36 |
| Figure I.5 : (A) Principe de fonctionnement de la méthode BACS, (B) exemple de fonctionnalisation d'une microbulle avec l'anticorps anti-CD44 [47] | 37 |
| Figure I.6 : Résultats de l'efficacité et de la spécificité de la méthode BACS sur le tri et l'isolement des MDA-MB-231. (A) Quantification des cellules MDA-MB-231 collectées dans le culot et dans le surnageant (B) Relation entre l'efficacité de tri et le nombre de microbulles par cellule (C) Quantification des cellules MDA-MB-453 collectées dans le culot et dans le surnageant [47] | 38 |
| Figure I.7 : Principe du DLD, avec l'exemple d'une périodicité de $N = 5$. (A) Les particules peuvent se déplacer soit en mode déplacement, soit en mode zigzag suivant leur diamètre ; (B) Le design et l'espacement des piliers permettent de découper le flux en $N = 5$ parties égales, serpentant entre les piliers ; (C) Les particules de petites tailles sont emportées par le flux en mode zigzag, tandis que celles de plus grande taille ne peuvent pas suivre le déplacement du flux et sont donc déviées ; (D) Description géométrique de la matrice de piliers qui compose le canal microfluidique [52] | 40 |
| Figure I.8 : (A) Interaction entre la force de portance et la force de Dean dans un canal incurvé pour trier les particules [58] ; (B) Graphique montrant la compétition entre les forces de portance et de Dean en fonction du diamètre des particules à différents nombres de Dean donnés dans un canal de section $100 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ et de rayon de courbure de 3 mm. | 42 |
| Figure I.9 : Principe d'une pince optique. (A) Les rayons lumineux du laser subissent la réflexion et la réfraction lors du changement de milieu à l'interface de la particule. [61] (B) Les forces résultantes de gradient et de diffusion entrent en compétition afin de capturer la particule au point de focalisation. [62] | 44 |
| Figure I.10 : Différentes méthodes de séparation cellulaire rencontrées dans la littérature. En rouge, la diélectrophorèse sera la technique développée tout au long de ce manuscrit. Adapté de [49], [64] | 45 |
| Figure I.11 : Evolution du nombre d'articles référencés sur Scopus traitant de la diélectrophorèse (en bleu) et des laboratoires sur puce (en rouge) | 47 |
| Figure I.12 : Principe d'induction de la force DEP et la réorientation des charges en présence d'un champ électrique (flèches rouges) généré par deux électrodes polarisées par une différence de potentiel : (A) particule chargée et particule diélectrique en présence d'un champ électrique uniforme. La particule chargée subit une nette force de Coulomb, alors que la particule diélectrique subit des forces opposées et égales ($-qE = +qE$), ce qui induit aucun mouvement ; (B) particule diélectrique en présence d'un champ électrique non-uniforme. La particule subit une force nette qui induit un mouvement vers un des bords des électrodes ($-qE_{\text{high}} > +qE_{\text{low}}$). Adapté de [71] | 48 |
| Figure I.13 : Représentation de la déformation des lignes de champ électrique en présence d'une particule diélectrique (A) dans le cas où la particule est plus polarisée que le milieu ; (B) dans le cas où la particule est moins polarisée que le milieu [73] | 50 |
| Figure I.14 : La non-uniformité spatiale de la composante de phase induit une force twDEP [74] | 51 |



| | |
|---|----|
| Figure I.15 : Partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti pour des levures viables (en rouge) et non-viables (en bleu) dans un milieu de conductivité de 10 mS/m. La fréquence de tri (70 kHz) est indiquée en pointillé. [75] | 52 |
| Figure I.16 : (A) Géométrie des électrodes polarisées et déphasées de 90°. Les levures viables se déplacent vers le centre de la courbure des électrodes, indiqué par les flèches. (B) Schéma de la séparation de la gouttelette en deux gouttelettes plus petites. La gouttelette de droite contient plus de cellules de levures viables. [75] | 52 |
| Figure I.17 : (A) La non-uniformité spatiale de l'amplitude du champ électrique induit une force DEP dite conventionnelle. [77] (B) Illustration de l'effet du gradient de champ sur des globules rouges à 100 kHz provoquant de la pDEP et à 10 kHz provoquant de la nDEP [78] | 53 |
| Figure I.18 : (A) Schéma d'une cellule eucaryote et de son contenu interne [79]. (B) Schéma de la structure de la membrane plasmique [80]. | 55 |
| Figure I.19 : (A) Circuit électrique équivalent d'une cellule biologique dans un milieu de suspension. (B) Calcul de la différence de potentiel au travers de la membrane plasmique (bleu) et du noyau (rouge) en fonction de la fréquence pour une cellule de rayon 10 μm et le rayon de son noyau 5 μm [81]. | 56 |
| Figure I.20 : Représentation diélectrique des différents compartiments cellulaires et de leur simplification. (A) Modèle 3-couches avec ϵ_{cm} , c_p , n_e , n_p^* la permittivité complexe respective de la membrane plasmique, du cytoplasme, de l'enveloppe nucléaire, du nucléoplasme, th_{cm} , n_e l'épaisseur de la membrane plasmique et de l'enveloppe nucléaire ; r et r_n le rayon de la cellule et du noyau. (B) Modèle bicouche avec ϵ_n^* la permittivité complexe du noyau. (C) Modèle monocouche avec ϵ_{int}^* la permittivité complexe du contenu cellulaire. Adapté de [85] | 57 |
| Figure I.21 : Simulation numérique du comportement diélectrique d'une cellule en fonction de la fréquence. Le modèle utilisé pour la cellule biologique est le modèle monocouche. (A) Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Les étoiles rouges correspondent aux fréquences choisies pour la simulation COMSOL. (B) Simulation COMSOL du modèle monocouche à différentes fréquences (100 kHz ; 1 MHz ; 20 MHz ; 500 MHz). L'échelle de couleur correspond à l'intensité du champ électrique (V/m) et les lignes noires sont les lignes de courant électriques. | 59 |
| Figure I.22 : Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti avec le logiciel myDEP pour évaluer l'influence des paramètres de la membrane cellulaire. (A) Effet de la variation de la permittivité relative de la membrane plasmique ($\epsilon_{cm} = 90\epsilon_0 ; 100\epsilon_0 ; 110\epsilon_0 ; 120\epsilon_0 \text{ F.m}^{-1}$) (B) Effet de la variation de la conductivité de la membrane plasmique ($\sigma_{cm} = 1.10^{-4} ; 2.10^{-4} ; 3.10^{-4} ; 4.10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$) (C) Effet de la variation de l'épaisseur de la membrane plasmique ($th_{cm} = 400 ; 500 ; 600 ; 700 \text{ nm}$) | 61 |
| Figure I.23 : Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti avec le logiciel myDEP pour évaluer l'influence des paramètres du contenu intracellulaire. (A) Effet de la variation de la permittivité relative du contenu interne ($\epsilon_{int} = 50\epsilon_0 ; 60\epsilon_0 ; 70\epsilon_0 ; 80\epsilon_0 \text{ F.m}^{-1}$) (B) Effet de la variation de la conductivité du contenu interne ($\sigma_{int} = 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 \text{ S.m}^{-1}$) | 62 |
| Figure I.24 : (A) Dimensions et propriétés des cellules sélectionnées ; (B) Schéma du microsystème DEP composé de deux paires d'électrodes. La ligne rouge représente la trajectoire des cellules tumorales circulantes, ici les MDA 231 et la ligne verte représente la trajectoire des cellules composant le sang (érythrocytes, lymphocytes, granulocytes et monocytes). Les rectangles jaunes numérotés représentent les emplacements des images microscopiques ; (C) Images microscopiques du microsystème DEP. Les cellules entourées sont les cellules tumorales circulantes [89]. | 64 |
| Figure I.25 : Simulation numérique de l'influence d'une particule sphérique homogène sur le champ électrique. (A) Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Les étoiles rouges correspondent aux fréquences choisies pour la simulation COMSOL. (B) Simulation COMSOL en l'absence de particule (en haut à gauche) et en présence de particule à différentes fréquences (1 MHz ; 120 MHz ; 150 MHz ; 1 GHz). L'échelle de couleur correspond à l'intensité du champ électrique (V/m) et les lignes noires sont les lignes du champ électrique. | 66 |



| | |
|---|----|
| Figure I.26 : Perturbation du champ électrique en présence d'une particule pour différentes valeurs de la fréquence du signal | 67 |
| Figure I.27 : (A) Les modèles de champ montrent comment le champ externe est déformé à la surface d'une particule qui est plus polarisable que le milieu (figure du haut), pour donner un champ interne inférieur au champ externe. Pour une particule moins polarisable que le milieu (figure du bas), le champ externe est déformé autour de la particule et le champ interne est plus grand que le champ externe [72]. (B) Perturbation du champ électrique en présence d'une particule pour différentes valeurs de la fréquence du signal, lorsque les électrodes sont à une distance $x \gg$ rayon de la particule. | 68 |
| Figure I.28 : Réflexion et transmission d'une onde électromagnétique par un dioptre séparant le milieu de suspension et une particule, dans le cas où le champ électrique est dans le plan d'incidence. | 69 |
| Figure I.29 : Graphique de la partie réelle, du module et de la phase du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du champ électrique..... | 71 |
| Figure I.30 : Partie réelle du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence et des approximations basse et haute fréquence. | 72 |
| Figure I.31 : Perturbations de la norme du champ électrique pour différentes valeurs (A) de la conductivité du milieu $\sigma_m = 20, 30, 40, 50, 60$ mS/m ; (B) de la permittivité du milieu $\epsilon_m = 60, 65, 70, 75, 80\epsilon_0$ F/m. Rappelons les paramètres diélectriques de la particule : $\sigma_p = 0.5$ S/m, $\epsilon_p = 50\epsilon_0$ F/m..... | 73 |
| Figure I.32 : Evolution de la partie réelle du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du signal pour trois différentes configurations des paramètres diélectriques du milieu de suspension. La bande jaune désigne la gamme de fréquence exploitée dans ces travaux de thèse..... | 73 |
| Figure I.33 : Perturbations de la norme du champ électrique pour différentes valeurs (A) de la conductivité de la particule $\sigma_p = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5$ S/m ; (B) de la permittivité de la particule $\epsilon_p = 30, 40, 50, 60, 70\epsilon_0$ F/m. Rappelons les paramètres diélectriques du milieu de suspension : $\sigma_m = 20$ mS/m, $\epsilon_m = 78\epsilon_0$ F/m. | 74 |
| Figure I.34 : Evolution de la partie réelle du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du signal pour trois différentes configurations des paramètres diélectriques de la particule. La bande jaune désigne la gamme de fréquence exploitée dans ces travaux de thèse. | 74 |
| Figure I.35 : Evolution de la partie réelle et imaginaire du coefficient de réflexion et du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence du signal. Les propriétés de la particule sont $\sigma_p = 0.5$ S/m & $\epsilon_p = 50\epsilon_0$ F/m et celles du milieu sont $\sigma_m = 20$ mS/m & $\epsilon_m = 78\epsilon_0$ F/m..... | 77 |
| Figure I.36 : Evolution fréquentielle de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (rouge) et du coefficient de réflexion (bleu) lorsque les propriétés diélectriques de la particule et du milieu externe ne permettent pas de mettre en évidence une fréquence de transition. (A) Cas où les permittivités relatives sont égales ; (B) cas où la permittivité relative de la particule est supérieure à celle du milieu..... | 77 |
| Figure I.37 : Perturbation de la norme de polarisation en présence d'une particule pour différentes fréquences du signal..... | 78 |
| Figure II.1 : (A) Photo du capteur quadripôle implémenté sur une puce BiCMOS avec un canal microfluidique ; (B) Image en microscopie électronique à balayage (MEB) du capteur..... | 91 |
| Figure II.2 : Influence de la tension appliquée aux bornes des électrodes (encadré) sur l'intensité du champ électrique dans la membrane plasmique et dans le cytoplasme aux deux fréquences de transition ($f_{x01} = 308$ kHz ; $f_{x02} = 118$ MHz) pour un gap inter-électrode de $40\mu\text{m}$ | 93 |
| Figure II.3 : Banc expérimental utilisé pour les mesures des fréquences de transition BF et UHF. (1) contrôleur de flux externe Elveflow OB1 ; (2) suspension cellulaire ; (3) microsystème de caractérisation DEP, une image zoomée est présentée dans l'encadré rouge ; (4) microscope Scope.A1 Zeiss ; (5) Caméra Axiocam 105 color Zeiss ; (6) Sondes radiofréquences MPI TITAN T26P-GSG-150 ; (7) diviseur de puissance ; (8) amplificateur de puissance Bonn Elektrik BLWA 100-5M ; (9) puissance-mètre Anritsu ML2496A ; (10) commutateur 11713A | |



| | |
|---|-----|
| HP ; (11) générateur basse fréquence Agilent 33150A ; (12) générateur radiofréquence SMB 100A Rhode & Schwarz..... | 94 |
| Figure II.4 : Principe de la mesure de la fréquence de transition. (A) Graphique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti ; (B) Simulation numérique du capteur-quadripôle polarisé. L'échelle des couleurs représente l'intensité du champ électrique. | 96 |
| Figure II.5 : Caractérisation DEP-UHF d'une cellule de lignée SW480 grâce au capteur-quadripôle polarisé avec un signal haute fréquence CW. La seconde fréquence de transition f_{x02} est mesurée à 245MHz. | 97 |
| Figure II.6 : Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti avec le logiciel myDEP pour évaluer l'influence des paramètres diélectriques du milieu de suspension. (A) Effet de la variation de la permittivité relative du milieu ($\epsilon_m = 40 ; 60 ; 80 ; 90 \epsilon_0 \text{ F.m}^{-1}$). (B) Effet de la conductivité du milieu de suspension ($\sigma_m = 20 ; 50 ; 100 ; 500 \text{ mS.m}^{-1}$)..... | 100 |
| Figure II.7 : Illustration de l'invasion tumorale de la muqueuse du côlon à différents stades du cancer [12] | 102 |
| Figure II.8 : Photos de cultures dans des boîtes de pétri de la lignée du glioblastome U87-MG cultivées dans deux conditions : (A) milieu normal (NM) et (B) milieu défini (DM). | 104 |
| Figure II.9 : Photos de cultures dans des boîtes de pétri des lignées du cancer colorectal SW480 et SW620 cultivées dans deux conditions : (A)&(C) milieu normal (NM) et (B)&(D) milieu défini (DM). | 105 |
| Figure II.10 : Principe de la synthèse de protéine (créé avec Biorender)..... | 107 |
| Figure II.11 : Plan des expériences et des conditions d'incubation des lignées cellulaires avec les EVs | 109 |
| Figure II.12 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules cultivées en milieu normal (ligne pointillée) ou en milieu défini (en rouge) pour la lignée du cancer colorectal SW620 | 110 |
| Figure II.13 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition des cellules U87-MG f_{x01} (à gauche) et f_{x02} (à droite), cultivées dans deux conditions différentes : milieu normal (NM) et milieu défini (DM) | 111 |
| Figure II.14 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules cultivées dans les conditions NM (ligne pointillée), en DM (en rose) et en DM+ (en rouge) pour la lignée du glioblastome U87-MG | 114 |
| Figure II.15 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules U87-MG cultivées dans trois différentes conditions : (i) 6 jours en milieu normal NM, (ii) 5 jours en milieu défini DM, (iii) 21 jours en milieu défini DM+ | 115 |
| Figure II.16 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules cultivées dans les conditions NM (ligne pointillée), en DM (en rose) et en DM+ (en rouge) pour la lignée du cancer colorectal SW480 | 117 |
| Figure II.17 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules SW480 cultivées dans trois conditions différentes : (i) 6 jours en milieu normal NM, (ii) 3 jours en milieu défini DM, (iii) 7 jours en milieu défini DM+ | 118 |
| Figure II.18 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules cultivées dans les conditions NM (ligne pointillée), en DM (en rose) et en DM+ (en rouge) pour la lignée du cancer colorectal SW620 | 119 |
| Figure II.19 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules SW620 cultivées dans trois différentes conditions : (i) 6 jours en milieu normal NM, (ii) 3 jours en milieu défini DM, (iii) 7 jours en milieu défini DM+ | 120 |
| Figure II.20 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Lgr5, Sox2, Nanog, Oct4 et Bmi1, entre des cellules SW620 cultivées dans les conditions NM (en bleu) et des cellules SW480 cultivées également dans les conditions NM (ligne pointillée)..... | 122 |



| | |
|---|-----|
| Figure II.21 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules SW480 incubées avec des oncosomes dans trois différentes conditions : (i) incubation pendant 24h avec une dose d'EVs sécrétées par SW620 NM, (ii) incubation pendant 72h avec une dose d'EVs sécrétées par SW620 NM, (iii) incubation pendant 72h avec deux doses d'EVs sécrétées par des cellules SW620 NM | 123 |
| Figure II.22 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules SW480 incubées avec des oncosomes dans trois différentes conditions : (i) incubation pendant 24h avec une dose d'EVs sécrétées par SW620 DM+, (ii) incubation pendant 72h avec une dose d'EVs sécrétées par SW620 DM+, (iii) incubation pendant 72h avec deux doses d'EVs sécrétées par SW620 DM+ | 127 |
| Figure II.23 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules SW480 NM (ligne pointillée), des cellules SW480 NM exposées aux EVs de SW620 NM (en vert) et des cellules SW480 NM exposées aux EVs de SW620 DM+ (en jaune). Les cellules et ces EVs ont été incubées durant 24h | 130 |
| Figure II.24 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation des cellules de cultures primaires (A) CPP14, (B) CPP35 et (C) CPP6, cultivées dans les conditions NM (lignée pointillée) et en DM (en rose) | 132 |
| Figure II.25 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules de cultures primaires, cultivées dans trois différentes conditions : (i) 7 jours en milieu normal NM, (ii) 7 jours en milieu défini DM, (iii) 15 jours en milieu défini DM+ | 133 |
| Figure II.26 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules CPP6 NM incubées avec des EVs sécrétées par des CPP6 DM. Les cellules sont incubées pendant 72h avec deux doses d'EVs. | 135 |
| Figure II.27 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules CPP6 NM (ligne pointillée), des cellules CPP6 NM incubées avec des EVs de CPP6 DM (en jaune). Les cellules ont été incubées avec une dose d'EVs pendant 24h. | 137 |
| Figure III.1 : Principe du fonctionnement du cytomètre DEP pour isoler les CSCs, avec F_{DEP} la force DEP et F_D la force de trainée..... | 144 |
| Figure III.2 : Cytomètre nDEP à quatre sorties développé lors des travaux de thèse de Thomas Provent [1] | 145 |
| Figure III.3 : Implémentation des différents modules du cytomètre diélectrophorétique | 147 |
| Figure III.4 : Illustration des différents régimes d'écoulements possibles grâce à la fumée d'une bougie | 149 |
| Figure III.5 : Profil de vitesse du flux dans le cas d'un écoulement de Poiseuille | 150 |
| Figure III.6 : (A) Exemple d'un réseau microfluidique et (B) son schéma électrique équivalent | 151 |
| Figure III.7 : Exemples de cas courants de singularités rencontrées dans les canaux microfluidiques. Les zones en rouge représentent le décollement de la veine fluide avec une zone de recirculation dans le cas de vitesse d'écoulement élevée. Adapté de [6]. | 153 |
| Figure III.8 : Schéma du banc expérimental permettant de contourner le recourt à des contre-pressions de sortie. (1) Eppendorf d'entrée sous pression ; (2) support de platine de positionnement ; (3) capillaires ; (4) puce microfluidique ; (5) microscope ; (6) support élévateur ; (7) Eppendorf de sortie à pression atmosphérique. ... | 154 |
| Figure III.9 : Simulation numérique de l'écoulement d'un fluide lorsque les sorties sont (A) équilibrées et (B) non équilibrées | 155 |
| Figure III.10 : Aperçu des différentes fenêtres du logiciel python d'aide à la conception d'un réseau microfluidique | 156 |
| Figure III.11 : Schéma présentant la méthode de Hardy-Cross permettant de calculer les débits dans les conduites non équilibrées | 158 |



| | |
|---|-----|
| Figure III.12 : Masque des différents canaux microfluidiques utilisés pour valider expérimentalement le logiciel de conception python | 160 |
| Figure III.13 : Temps de collecte mesuré pour chaque circuit microfluidique fabriqué, à une pression d'entrée donnée | 161 |
| Figure III.14 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans la zone d'injection cellulaire du prototype de cytomètre électromagnétique développé par Thomas Provent. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules | 165 |
| Figure III.15 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans la zone d'injection cellulaire en fonction de l'angle d'inclinaison. (A) $\alpha = 15^\circ$; (B) $\alpha = 30^\circ$; (C) $\alpha = 45^\circ$; (D) $\alpha = 60^\circ$; (E) $\alpha = 90^\circ$. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules | 166 |
| Figure III.16 : Profil de vitesse dans la largeur du canal principal calculé à mi-hauteur et à différentes distances selon x de l'embranchement des deux canaux d'entrée pour chaque valeur d'angle d'inclinaison. (A) $\alpha = 15^\circ$; (B) $\alpha = 30^\circ$; (C) $\alpha = 45^\circ$; (D) $\alpha = 60^\circ$; (E) $\alpha = 90^\circ$ | 168 |
| Figure III.17 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans la zone d'injection cellulaire avec un angle d'inclinaison $\alpha = 15^\circ$ pour différentes pressions à l'entrée du buffer (A) $P_{\text{buffer}} < P_{\text{cellule}}$; (B) $P_{\text{buffer}} \approx P_{\text{cellule}}$; (C) $P_{\text{buffer}} > P_{\text{cellule}}$. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules. | 169 |
| Figure III.18 : (A) Vue du dessus d'une jonction de flow focusing asymétrique, avec Q_i Q_1 Q_2 respectivement les débits des cellules, du buffer prélevé, du buffer après prélèvement [16]. (B) Graphique du ratio de débit prélevé en fonction de l'offset du focus souhaité | 170 |
| Figure III.19 : Module de prélèvement de débit du canal du buffer. (A) Vue 3D du point de branchement composé du canal buffer et d'un canal en boucle fermée avec le schéma équivalent électrique. La région entrant dans le canal latéral est colorée en gris [12]. (B) Vue du dessus, avec Q_0 , Q_1 et Q_2 respectivement débit du buffer, du canal latéral et après le prélèvement et w la largeur du canal de déviation. (C) Ratio de débit prélevé en fonction de la largeur du canal w | 171 |
| Figure III.20 : Géométrie du module de focalisation (A) Géométrie ; (B) Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans la zone de focalisation cellulaire. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules. | 172 |
| Figure III.21 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide au niveau des sorties du cytomètre électromagnétique conçu par Thomas Provent. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules. | 173 |
| Figure III.22 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans le module de sortie du canal principal. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules. | 174 |
| Figure III.23 : Prototype du réseau microfluidique du cytomètre électromagnétique. Chaque couleur indique la fonction du canal. 1. Réservoir pour connexion du capillaire amenant le buffer ; 2. Réservoir pour de connexion du capillaire amenant la suspension cellulaire ; 3. Réservoir pour de connexion du capillaire pour la récupération des cellules non déviées ; 4. Réservoir pour de connexion du capillaire pour la récupération des cellules déviées. | 175 |
| Figure III.24 : Influence de l'angle de déviation θ formé par les électrodes et la paroi du canal principale. (A) Description géométrique des paramètres [1] ; (B) Impact de la tension appliquée aux électrodes sur le f_{cm} critique pour différents angles θ à une vitesse de flux fixée de 3,3 mm/s ; (C) Impact de la vitesse fluide sur le f_{cm} critique pour différents angles θ à une tension fixée de 12,5 Vpp. Un diamètre moyen de 12 μ m pour la cellule a été considéré pour les deux graphiques. | 178 |



| | |
|---|-----|
| Figure III.25 : Simulation électrique des électrodes polarisées pour le tri cellulaire. (A) Géométrie des électrodes dans le canal principal avec un angle $\theta = 10^\circ$, un gap inter-électrode de $30\mu\text{m}$, une largeur de l'électrode signal et de la masse respectivement de $30\mu\text{m}$ et $100\mu\text{m}$; (B) Simulation du champ électrique généré par une tension de 5 V entre les électrodes ; (C) Simulation du gradient de champ $\nabla E^2 $ dans les mêmes conditions. | 180 |
| Figure III.26 : Impacts du spot LASER de $10\mu\text{m}$ de diamètre de l'appareil de lithographie dans le cas où il est défocalisé (en haut à gauche) et focalisé (en bas à droite) | 182 |
| Figure III.27 : Monocouche de film sec DF1050 exposé à différentes doses de modulation laser. (A) La résine a reçu une trop forte dose et a été surexposée ; (B) la résine a reçu une dose correcte de radiation ; (C) la résine n'a pas reçu assez de lumière et est sous-exposée..... | 183 |
| Figure III.28 : Schéma des différentes étapes de la fabrication des canaux microfluidiques moulés dans le PDMS | 185 |
| Figure III.29 : Support de pressage du PDMS sur la puce du cytomètre DEP | 186 |
| Figure III.30 : Procédé de fabrication de l'électrode du cytomètre électromagnétique (Les épaisseurs dessinées ne sont pas à l'échelle)..... | 186 |
| Figure III.31 : Photo de la ligne CPW pour la déviation cellulaire avec un gap inter-électrodes de $30\mu\text{m}$ | 187 |
| Figure III.32 : Focus sur la partie tri du cytomètre électromagnétique, le tampon de PDMS est posé et aligné sur les électrodes de tri (A) Principe du tri de notre cytomètre DEP (B) Visuel du prototype fabriqué. | 188 |
| Figure III.33 : Photos de suspension de levures circulant dans le réseau fluidique du cytomètre électromagnétique (sans électrode) pour différentes pressions du buffer : (A) 20 mbar ; (B) 34 mbar ; (C) 42 mbar en maintenant une pression du canal d'injection à 20 mbar. | 189 |
| Figure III.34 : Influence de la puissance du signal DEP sur la quantité de cellules SW620 NM déviées à une fréquence fixée de 600MHz (pour une vitesse de déplacement dans le canal principal estimée à $3,6\text{ mm/s}$)..... | 191 |
| Figure III.35 : Impact de la tension appliquée aux électrodes sur le f_{cm} critique pour un angle $\theta = 10^\circ$, une vitesse de flux de $3,6\text{ mm/s}$ et un diamètre cellulaire de $12\mu\text{m}$. Les courbes rouges et bleues représentent le f_{cm} maximal estimé pour les cellules SW620 NM à la fréquence de 600MHz pour deux cellules ayant une fréquence de transition f_{x02} minimale ou maximale. | 193 |
| Figure III.36 : Signatures électromagnétiques UHF-DEP des populations SW620 NM et SW620 DM | 195 |
| Figure III.37 : Evolution de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence et selon les signatures électromagnétiques mesurées pour les SW620 NM (courbes bleues) et SW620 DM (courbes rouges). Le f_{cm} critique est déterminé sur une plage de valeurs possibles pour un angle θ de 10° , une tension de $19,3\text{ Vpp}$ et une vitesse de flux comprise entre 5 mm/s et 9 mm/s | 196 |
| Figure III.38 : Photos des cellules collectées en fin de tri aux deux sorties du cytomètre DEP pour différentes fréquences du signal. Les cellules vertes sont les SW620 DM et les cellules rouges sont les SW620 NM. | 198 |
| Figure IV.9 : Cellules adhérentes sur les électrodes formant un amas | 208 |
| Figure IV.2 : Banque de données des signatures électromagnétiques pour différentes lignées tumorales commerciales (α indique que les données proviennent de travaux de Rémi Manczak; GBM : glioblastome ; MB : médulloblastome)..... | 210 |
| Figure IV.3 : Banque de données des signatures électromagnétiques pour les patients atteints d'une tumeur colorectale de différents stades (en bleu foncé) ou de métastases du foie (en bleu clair) | 211 |
| Figure IV.4 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules CPP14 NM incubées avec des EVs sécrétées par (A) des CPP6 NM et (B) par des CPP6 DM. Les cellules sont exposées pendant 72h avec deux doses d'EVs. | 212 |
| Figure IV.5 : Concept de système basé sur un principe de caractérisation et de séparation de cellules d'intérêt pour une future analyse biologique en single-cell | 214 |



Figure IV.6 : Principe de fonctionnement d'un système de caractérisation cellulaire 2-en-1 216

Figure IV.7 : Simulation numérique de la compétition des forces DEP et de trainée sur le piégeage d'une cellule biologique en fonction de la tension appliquée aux électrodes. (A) Déplacement de la cellule au sein du quadripole, (B) Norme des forces DEP et de trainée sur l'axe de déplacement possible de la cellule..... 217

Table des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau I.1 : Valeurs des différents paramètres diélectriques et géométriques utilisés dans les simulations de la Figure I.21..... | 59 |
| Tableau I.2 : Tableau de synthèse sur l'étude de l'influence d'une particule homogène diélectrique sur le champ électrique..... | 79 |
| Tableau II.1 : Tableau des caractéristiques des modèles cellulaires caractérisés dans ces travaux de thèse..... | 103 |
| Tableau II.2 : Valeurs des deux fréquences de transition de la lignée SW620..... | 112 |
| Tableau II.3 : Répartition des fréquences de transition mesurées en fonction des différentes conditions de culture de la lignée U87-MG..... | 116 |
| Tableau II.4 : Synthèse des mesures de la fréquence de transition UHF de la lignée SW480..... | 118 |
| Tableau II.5 : Bilan des mesures de la fréquence de transition UHF de la lignée SW620..... | 120 |
| Tableau II.6 : Synthèse du plan d'expérience (cf Figure II.11)..... | 123 |
| Tableau II.7 : Distribution des fréquences de transition mesurées selon les zones prédéfinies (CSCs, zone de recouvrement, cellules différenciées SW480 proches de la médiane, cellules différenciées haute fréquence) en fonction des différentes conditions d'exposition des EVs de SW620 NM..... | 125 |
| Tableau II.8 : Distribution des fréquences de transition mesurées selon les zones prédéfinies (CSCs, zone de recouvrement, cellules différenciées SW480 proches de la médiane, cellules différenciées haute fréquence) en fonction des différentes conditions d'exposition des EVs de SW620 DM+..... | 128 |
| Tableau II.9 : Tableau reportant les valeurs mesurées des fréquences de transition UHF des cultures primaires..... | 134 |
| Tableau II.10 : Synthèse du plan d'expérience (cf Figure II.11)..... | 135 |
| Tableau II.11 : Tableau reportant la répartition des fréquences de transition mesurées selon les zones prédéfinies (CSCs, 1 ^{er} groupe EVs, zone de creux, 2 ^e groupe EVs, cellules différenciées haute fréquence) en fonction des différentes conditions d'exposition des EVs de CPP6 DM..... | 136 |
| Tableau III.1 : Géométrie des canaux microfluidiques moulés au-dessus d'un film polymère de 50µm d'épaisseur selon les dessins présentés sur la Figure III.12..... | 160 |
| Tableau III.2 : Tableau reportant les valeurs expérimentales et théoriques de la résistance hydraulique des différents microsystèmes..... | 162 |
| Tableau III.3 : Dimensions des canaux du cytomètre électromagnétique..... | 176 |
| Tableau III.4 : Paramètres diélectriques internes utilisés au calcul des tracés du facteur CM de la Figure III.37..... | 196 |
| Tableau III.5 : Résultats de la distribution des cellules de la sortie n°1 du cytomètre pour différentes fréquences du signal DEP..... | 198 |
| Tableau III.6 : Résultats de la distribution des cellules de la sortie n°2 du cytomètre pour différentes fréquences du signal DEP..... | 199 |
| Tableau IV.1 : Description des lignées tumorales commerciales caractérisées ainsi que la valeur médiane de la fréquence de transition UHF..... | 209 |
| Tableau IV.2 : Synthèse du plan d'expérience..... | 211 |
| Tableau IV.3 : Répartition des fréquences de transition mesurées selon les zones prédéfinies (Cellules CPP14 NM basse fréquence, cellules CPP14 NM haute fréquence, cellules différenciées haute fréquence) en fonction des différentes expositions des EVs de CPP6 NM/DM..... | 213 |



Introduction générale



Notre organisme est composé d'environ 200 types de cellules différentes de par leur fonction ou leur spécialisation. Le renouvellement de celles-ci est permis grâce au cycle de division cellulaire appelé mitose. A chaque étape du cycle, des processus de régulations extracellulaires et des points de contrôle intracellulaires assurent son bon fonctionnement et l'obtention de deux cellules filles identiques. En l'absence de signaux prolifératifs ou lorsque la cellule vieillit et devient sénescence, c'est-à-dire lorsque la cellule a atteint son nombre maximal de duplications, elle est mise en état de quiescence et ne se divise plus. De plus, en présence de dommages cellulaires non réparables comme des mutations de l'ADN ou des anomalies chromosomiques, les cellules démarrent un processus de mort programmée appelée apoptose. Cependant, lorsque l'accumulation d'anomalies génétiques devient trop importante, les mécanismes de régulation peuvent devenir défailants, entraînant un dérèglement du cycle cellulaire. Certaines cellules acquièrent la capacité de proliférer de manière anarchique et excessive et de devenir immortelles. Les mutations liées aux gènes oncogéniques favorisent et activent le fonctionnement anormal de la cellule tandis que les gènes « suppresseurs de tumeur » mutés deviennent inactifs. Ces cellules dérégulées, dites cancéreuses, ne répondent plus aux stimuli de la régulation cellulaire. Elles finissent par former dans le tissu d'origine une masse appelée tumeur. La seconde étape dans la progression du cancer est la vascularisation de ce dernier afin d'y apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires à la prolifération cellulaire, jusqu'à ce que les cellules cancéreuses développent la capacité de migrer et de voyager à travers les réseaux sanguin et lymphatique afin de coloniser les organes voisins et y former des métastases.

Selon l'Institut National du Cancer, les cancers représentent la première cause de décès chez l'homme, et la deuxième chez la femme en France. En effet, on parle « des » cancers car chaque type de tumeurs possède ses propres caractéristiques : ils se développent à des vitesses différentes, et répondent à des traitements différents. Le cancer colorectal (CCR), ou cancer du côlon et du rectum, est le troisième cancer le plus fréquent au niveau national. Il touche chaque année plus de 43 000 personnes et cause environ 17 000 décès. Dans plus de 80 % des cas, il provient d'une tumeur bénigne qui évolue lentement et finit par devenir cancéreuse. Le taux de survie moyen à 5 ans des patients atteints de CCR est de 63% en 2018. Ce chiffre est en continuelle augmentation grâce aux diagnostics réalisés à des stades tumorales plus précoces et à des progrès thérapeutiques importants permettant un meilleur suivi et une meilleure prise en charge des patients.

Malgré ces progrès, la résistance aux traitements reste un problème majeur et récurrent dans la prise en charge du cancer colorectal. L'une des hypothèses pour expliquer cet échec thérapeutique repose sur l'émergence de cellules souches cancéreuses (CSCs) capables de résister aux traitements radiothérapeutiques et chimiothérapeutiques. En effet, le phénotype indifférencié des CSCs pourrait



expliquer le maintien de la maladie résiduelle, ces dernières ayant la capacité de régénérer la masse tumorale, ce qui favoriserait les récives. Les CSCs reflètent l'agressivité de la tumeur en terme de prolifération, d'invasion et de colonisation. Leur présence au sein de la tumeur ou en périphérie représente un facteur de mauvais pronostic pour le patient. C'est pourquoi, aujourd'hui la détection des CSCs à partir de biopsies de tumeurs de patients en utilisant des biomarqueurs est cruciale pour établir la valeur pronostique sur la réponse thérapeutique afin d'adapter la gestion de la maladie. Cependant, le caractère souche reste difficile à identifier pour les biologistes avec les techniques actuelles.

De plus, durant ces dernières années, les chercheurs se sont particulièrement intéressés aux vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les cellules cancéreuses. Elles participent de manière proactive à la communication entre la tumeur et son micro-environnement et il a été suggéré qu'elles pourraient permettre aux CSCs d'exercer un contrôle sur les cellules avoisinantes. En particulier, les EVs pathologiques produites par les CSCs sont soupçonnées de propager l'agressivité tumorale en transférant du matériel génétique et protéique capable d'induire une transformation oncogénique des cellules cancéreuses différenciées.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet Oncosome Track financé par la région Nouvelle-Aquitaine et associant les laboratoires d'XLIM UMR-7252 et CAPTuR UMR INSERM 1308 de l'Université de Limoges. L'objectif du projet est de contribuer à l'émergence de nouvelles stratégies d'analyse en cancérologie et au développement d'outils diagnostiques permettant d'évaluer simplement et rapidement les propriétés des EVs afin de les corrélérer avec le potentiel d'agressivité de la tumeur.

Mes travaux de thèse ont consisté à développer un laboratoire sur puce à ondes électromagnétiques afin d'étudier le potentiel cancérigène des EVs, en se basant sur le principe de la diélectrophorèse (DEP). A partir de l'exploitation d'un microsystème développé lors de la thèse de Fatima Hjejj, un des objectifs de mes travaux a été de détecter les cellules reconnues comme étant les plus agressives en identifiant leurs signatures diélectrophorétiques, afin de pouvoir quantifier l'évolution du niveau d'agressivité des cellules cibles mises au contact d'EVs. La finalité vise à tirer profit de ces signatures électromagnétiques pour concevoir des biopuces microfluidiques qui permettront de trier les cellules les plus agressives d'une tumeur en les séparant par DEP haute fréquence. Des premiers prototypes de cytomètres diélectrophorétiques ont été élaborés précédemment lors des travaux de thèse de Thomas Provent. La poursuite du développement de cet outil constitue un autre des objectifs de mes travaux de thèse en collaboration avec Elodie Barthout, doctorante en biologie. Ce manuscrit de thèse se décompose par conséquent en trois chapitres.



Le premier chapitre permettra de définir le contexte biologique et physique de mes recherches. Nous verrons plus précisément le rôle des nano-vésicules dans la communication intracellulaire et la tumeur. Puis nous ferons un état de l'art des méthodes actuelles de caractérisation cellulaire, mettant en avant les avantages de la DEP. Les approches physiques seront décrites, puis nous aborderons l'originalité de ces travaux de cette thèse consistant à monter dans les gammes de fréquences de la centaine de MHz pour la détection du phénotype indifférencié.

Le second chapitre portera sur la discrimination de cellules présentant un phénotype souche par le système de caractérisation UHF-DEP. Son principe de fonctionnement sera décrit. Dans un premier temps, nous disposons de deux types de lignées cellulaires commerciales de CCR possédant des stades différents. Les cellules seront mises en culture dans deux milieux dont l'un favorise la différenciation et l'autre enrichit la culture en CSCs. Puis, les EVs sécrétées par les CSCs seront incubées avec des cellules cancéreuses différenciées sur des périodes plus ou moins longues. La signature électromagnétique des populations ainsi incubées sera mesurée pour évaluer si les EVs ont induit des modifications intracellulaires remarquables sur les cellules initiales. Dans un deuxième temps, le potentiel transformant d'EVs de cultures primaires issues du patient (cellules non immortalisées) sera étudié, permettant de poser les bases d'une étude pré-clinique.

Le troisième chapitre présentera la conception et la réalisation d'un cytomètre diélectrophorétique haute fréquence. Une étude et une optimisation de l'architecture du réseau microfluidique seront réalisées dans le but de collecter les sous-populations cellulaires isolées par l'action d'un champ électrique répulsif généré par un signal de fréquence de plusieurs centaines de MHz. Les résultats expérimentaux viendront valider le dimensionnement fluidique mais aussi le principe de déviation par la répulsion du champ électrique à l'aide d'une population cellulaire issue d'une même culture cellulaire. Enfin, nous présenterons des résultats préliminaires concernant une première preuve de concept de tri et d'isolation de la sous-population des cellules souches cancéreuses par le cytomètre diélectrophorétique.

Finalement, nous conclurons ce manuscrit par une synthèse générale et par de futurs développements qu'il nous semblerait pertinents de mener dans la continuité des travaux que nous avons réalisés.



Chapitre I. Contexte biologique et physique



I. Introduction

Les travaux de cette thèse portent sur le développement d'un laboratoire sur puce à ondes électromagnétiques ultra hautes fréquences. Au cours de l'étude, deux systèmes microfluidiques seront présentés : un premier système développé lors de travaux antérieurs [1], sera exploité afin de caractériser et d'analyser des cellules d'une même population mais présentant des phénotypes différents ; un deuxième système dont le développement a commencé lors de la thèse de Thomas Provent [2] et se poursuivra au cours de cette thèse, permet de trier une suspension cellulaire.

Dans ce chapitre, nous allons aborder le contexte biologique de la thèse. Nous présenterons le rôle dans l'organisme et dans la communication intercellulaire des nanovésicules d'intérêt appelées vésicules extracellulaires (EVs). Ces nanovésicules sont sécrétées par les cellules et dans le contexte de cette thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux oncosomes, c'est-à-dire des EVs sécrétées par des cellules cancéreuses. De plus, au sein d'une tumeur solide se trouve une sous-population de cellules appelées cellules souches cancéreuses (CSCs) qui sont des cellules particulièrement agressives et dont leur rôle est le sujet de nombreuses études. La notion d'agressivité du cancer est directement liée à la présence de ce groupe de cellules dans le tissu tumoral. Comme les CSCs présentent un phénotype plus agressif que les cellules cancéreuses différenciées, on s'attend à ce que leurs oncosomes aient un effet plus important. La problématique du projet OncosomeTrack lié à la thèse consiste à déterminer le rôle et l'impact des oncosomes des CSCs sur le potentiel d'agressivité du cancer. En effet, ces oncosomes semblent avoir une influence importante dans la progression, la tolérance et l'invasion tumorale, comme nous allons l'explicitier dans la première partie de ce chapitre. Dans ce contexte, les enjeux et attentes des biologistes concernent la caractérisation et le tri cellulaire. Plus précisément, il s'agit de pouvoir identifier puis séparer les CSCs de l'ensemble de la population de cellules cancéreuses afin d'en connaître la proportion et de la corrélérer au potentiel agressif de la tumeur.

Par la suite, nous exposerons différentes méthodes de séparation cellulaire rencontrées dans la littérature de manière non-exhaustive. Nous mettrons en avant les techniques sans marqueurs biologiques en présentant leurs avantages et inconvénients.

Enfin, nous porterons l'accent sur la méthode d'analyse et de tri qui fait l'objet de l'étude de cette thèse. Nous décrirons plus précisément le principe de diélectrophorèse sur des particules sphériques homogènes puis sur des objets plus complexes comme les cellules du vivant. Nous prendrons en compte un modèle simplifié mono-enveloppe d'une cellule afin d'étudier son comportement diélectrophorétique à basse et à haute fréquences, mettant en exergue l'utilisation de cette dernière gamme de fréquence dans la discrimination des phénotypes cellulaires recherchés. Pour terminer cette étude sur le phénomène



de diélectrophorèse, nous nous intéresserons à l'influence des cellules biologiques comme objets diélectriques sur les perturbations locales du champ électrique.

II. Les vésicules extracellulaires : historique de leur découverte et leur rôle au sein de la tumeur

Les EVs sont naturellement secrétées par l'ensemble des cellules du corps y compris par les cellules cancéreuses. Ces dernières, appelées oncosomes, jouent un rôle majeur dans la progression tumorale et sont soupçonnées d'être des vecteurs de transfert d'agressivité [3].

II.1. Que sont les vésicules extracellulaires ?

Les EVs sont des vésicules extracellulaires dont le diamètre peut varier entre 30 nm et 200 nm. Ces nano-vésicules sont secrétées par différents types de cellules et sont présentes dans les fluides biologiques tels que le sang, l'urine et la salive. Ces vésicules sont relarguées grâce aux endosomes multivésiculaires (MVEs) qui se forment dans le cytoplasme de la cellule et contiennent les EVs (Figure I.1). Puis la membrane des MVEs fusionne avec celle de la cellule, libérant les EVs dans le milieu extracellulaire [4].

Les EVs ont été observées pour la première fois en 1983 [5]. En effet, lors de la mise en culture de réticulocytes (cellules précurseurs des globules rouges), Pan et Johnstone se sont aperçus que le récepteur de la transferrine (protéine permettant de réguler le stockage du fer) était expulsé des cellules grâce à de petites vésicules : les EVs. Ce fait a été observé durant la maturation des réticulocytes en hématies, communément appelées globules rouges. Cette maturation est accompagnée de la disparition du récepteur de la transferrine à la surface des cellules. A ce stade, les chercheurs suggèrent que les EVs serviraient aux cellules à évacuer leurs déchets.



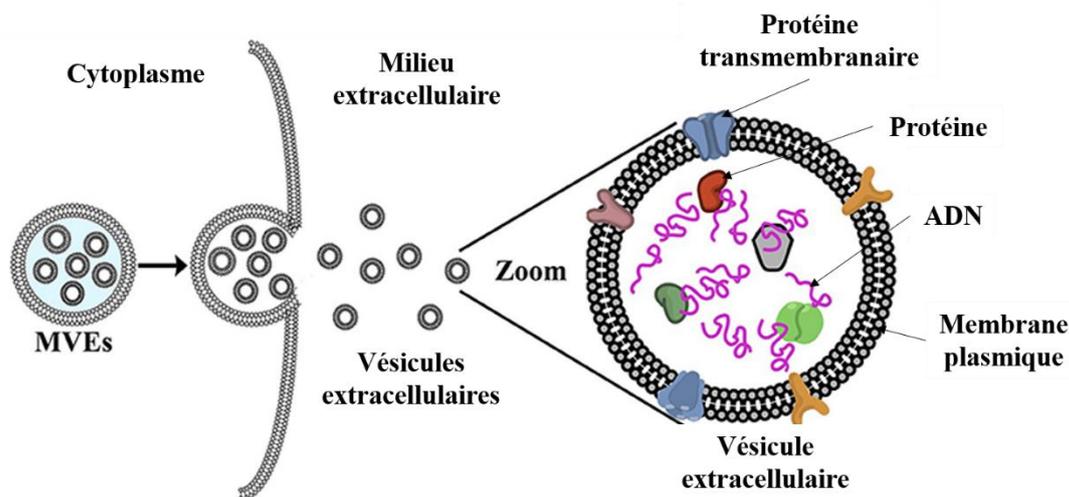


Figure I.1 : (à gauche) Représentation schématisée de la libération des exosomes de la cellule vers le milieu extracellulaire. (à droite) Schéma d'un exosome et de son contenu [4]

Cependant, en 2007, Lotvall et Valadi [6] ont montré que les EVs jouent un rôle important dans la communication intercellulaire en transportant du matériel génétique (ADN, ARN, ARNm, miARN) ainsi que des protéines et des protéines transmembranaires. Il est important de noter que les acides ribonucléiques (ARN, miARN...) régulent l'expression des protéines et donc peuvent modifier le contenu protéinique des cellules cibles. Tout ceci est protégé grâce à la membrane plasmique des exosomes, constituée d'une bicouche phospholipidique, ce qui empêche la dégradation et la dispersion dans le milieu extracellulaire de son contenu (Figure I.1). De ce fait, chaque EV est caractéristique de la cellule qui l'a secrétée [7]. Le contenu des EVs a été recensé et classifié selon le type de cellules les sécrétant, dans des bases de données publiques et accessibles sur internet : ExoCarta¹ et Vesiclepedia².

Une fois dans le milieu extracellulaire, les EVs sont reconnues par les cellules cibles grâce aux protéines transmembranaires et extracellulaires présentées à la surface de la membrane des EVs. Cela active différentes voies de signalisation cellulaire permettant l'incorporation des EVs, telles que la phagocytose, l'endocytose ou bien la fusion directe avec la membrane plasmique de la cellule hôte, afin de transférer le matériel génétique et protéique dans le cytoplasme [8]. La présence d'une membrane plasmique permet aux EVs une assimilation plus aisée par les cellules.

En étant l'un des éléments principaux de la communication intercellulaire, les EVs sont impliquées entre autres dans les fonctions immunitaires [9], le développement et la différenciation des cellules souches [10], les fonctions neuronales [11] et la régénération tissulaire [12], [13]. Les EVs sont soupçonnées d'être des médiateurs dans la propagation de maladies, notamment en transportant des

¹ Site : <http://exocarta.org/#>

² Site : <http://microvesicles.org/>



peptides responsables de maladies neurodégénératives tels que l'amyloïde- β , la protéine tau (pour la maladie d'Alzheimer) et les prions (pour les encéphalopathies spongiformes transmissibles) [14].

Comme les autres cellules, les cellules tumorales sécrètent leurs propres EVs, appelées oncosomes dont nous allons à présent décrire plus en détail le rôle.

II.2. Les oncosomes : les vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules cancéreuses

Les oncosomes sont activement et abondamment sécrétées par les cellules tumorales et sont spécifiques du type de tumeur [15]. Transportant le matériel génétique provenant des cellules cancéreuses, le rôle de ces vésicules dans le développement des tumeurs suscite l'intérêt de nombreux chercheurs (Figure I.2).

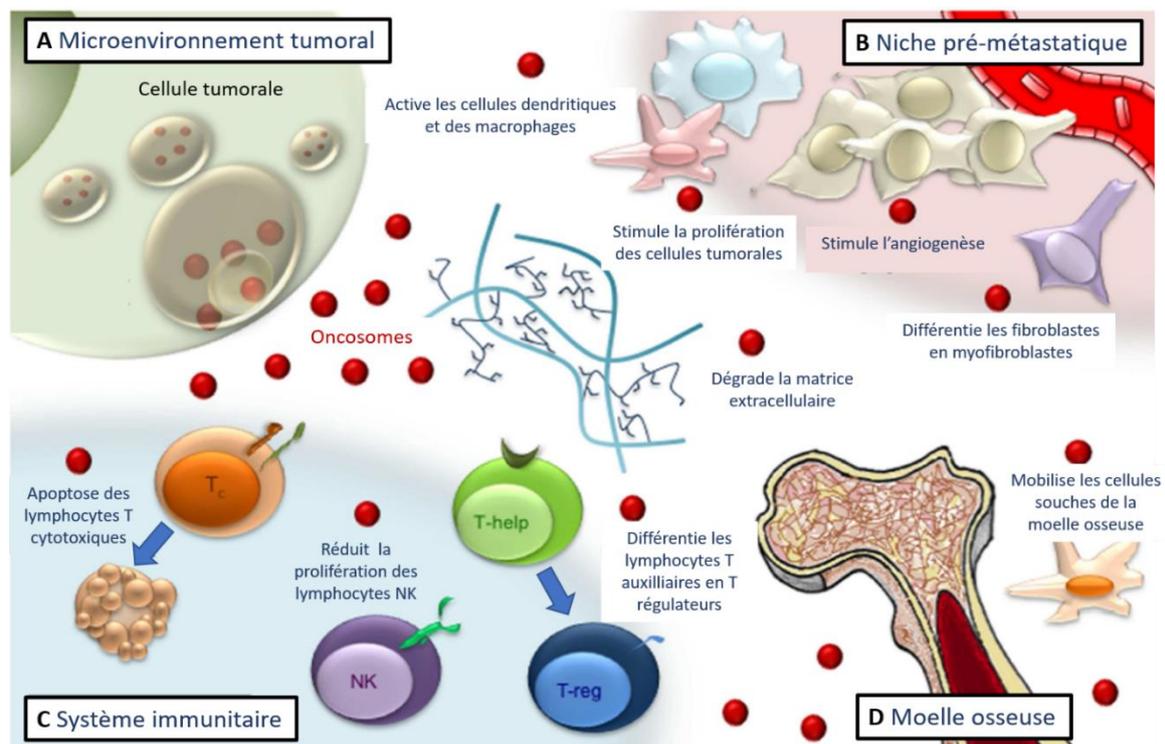


Figure I.2 : Description schématique du rôle des oncosomes (points rouges) dans la genèse des tumeurs. (A) Favorisation de la vasculogénèse et de la prolifération des cellules tumorales dans le micro-environnement de la tumeur. (B) Préparation des niches pré-métastatiques. (C) Dérégulation des fonctions immunitaires en entravant la réponse anti-tumorale. (D) Recrutement des cellules souches de la moelle osseuse [16].



Les oncosomes agissent à différents endroits dans le corps et ont des rôles différents en fonction du stade de la tumeur comme nous allons le détailler ci-dessous.

II.2.1. Dans le micro-environnement de la tumeur

Le micro-environnement tumoral présente un pH plus acide autour de 6 (il est d'environ 7,4 dans le sang), ce qui encouragerait la sécrétion d'oncosomes et leur absorption par les cellules saines. Une étude menée par Parolini [17] sur l'influence du pH sur les EVs, montre qu'en milieu acide, les propriétés physiques et chimiques de la membrane plasmique des EVs sont modifiées : la rigidité de la membrane augmente lorsque le pH diminue et la composition lipidique de la membrane se voit enrichie des lipides SM et GM3. Ces lipides facilitent la fusion des oncosomes avec la membrane plasmique des cellules avoisinantes.

De plus, les EVs spécifiquement sécrétées par les cellules cancéreuses contiennent du matériel génétique et protéinique comme par exemple le gène codant la protéine P53, responsable de la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (mort cellulaire programmée), des gènes codant des facteurs de croissance, la protéine KRAS (qui favorise la prolifération cellulaire) et la protéine MET [16]. Cette dernière favorise le développement de la tumeur mais aussi l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) afin d'alimenter la tumeur en nutriments. Ces gènes et ces protéines sont appelés « proto-oncogènes » car ils favorisent la division cellulaire. La mutation de ces gènes peut provoquer un dérèglement du métabolisme cellulaire, engendrant ainsi un cancer.

Une fois absorbé par les cellules voisines à la tumeur, le contenu oncogène des oncosomes a le potentiel d'initier des réponses cellulaires, ce qui faciliterait l'assimilation des caractéristiques tumorales aux cellules voisines [17]. La vascularisation de la tumeur est également favorisée, permettant d'apporter des nutriments et de l'oxygène nécessaires aux cellules cancéreuses pour leur survie [18].

II.2.2. Dérégulation du système immunitaire

Le système immunitaire permet de différencier le « soi » du « non-soi » et de se défendre de ce dernier à l'aide de systèmes innés et adaptatifs. Les cellules cancéreuses sont des cellules du « soi » dont l'ADN a subi des mutations, entraînant une prolifération incontrôlable de ces cellules devenues immortelles. En 1992, une étude concernant la reconnaissance des cellules cancéreuses par les lymphocytes T, a mis en avant la présence d'antigènes tumoraux exprimés à la surface des cellules cancéreuses [19]. Les antigènes sont des fragments de peptides représentatifs de l'état de la cellule qui permettent la surveillance immunitaire.



Les cellules du système inné interviennent en premier face à l'agent pathogène dans l'organisme. Les cellules Natural Killers (NK) sont des lymphocytes cytotoxiques du système inné. Elles ont deux rôles majeurs : induire l'apoptose des cellules infectées et sécréter des cytokines IFN- γ , molécules activant les macrophages. Les NK peuvent reconnaître les cellules du « non-soi » grâce à des anticorps ou si elles ne présentent pas ou très peu de complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH I) à leur surface. Ces dernières molécules permettent de présenter des antigènes aux cellules de l'immunité. Les NK sont capables de reconnaître les cellules tumorales comme du « non-soi » et ainsi d'induire leur mort cellulaire. Afin de combattre le système immunitaire, les oncosomes neutralisent l'activité cytotoxique des NK [16]. En effet, il a été montré que lorsque les NK incorporent les oncosomes dans leur cytoplasme, l'expression de la perforine est bloquée. La perforine est une des molécules responsables de la lyse des cellules, elle joue un rôle majeur dans le contrôle de la croissance des tumeurs. Cette protéine est produite grâce à l'activation de la kinase JAK3 par la phosphorylation de la molécule STAT5. Les oncosomes bloquent la phosphorylation et par conséquent l'expression de la perforine [20]. Ils sont aussi responsables de la réduction de la prolifération des cellules NK. En effet, dans le cas du cancer du poumon, les chercheurs Cong et Wang ont quantifié le nombre de globules blancs en fonction du stade de la tumeur [21]. Le nombre de NK diminue drastiquement à partir du stade 2 du cancer, qui correspond à l'expansion tumorale. Ceci peut être expliqué par le blocage de la mitose (division cellulaire) des cellules NK par les oncosomes. Ces derniers vont bloquer l'expression de la cycline D3, responsable de la transition de la phase G1 (phase de croissance) à la phase S (phase de réplication de l'ADN) de la mitose [20]. Les oncosomes réduisent donc la prolifération des cellules NK et entravent leur activité cytotoxique, permettant ainsi la progression de la tumeur.

Les cellules du système immunitaire adaptatif interviennent plus tardivement après l'infection. Elles sont composées de lymphocytes B, et de lymphocytes T. Ces cellules sont spécifiques, c'est-à-dire qu'après une sélection clonale, les lymphocytes ayant reconnu l'antigène de l'agent pathogène sont activés et prolifèrent. Cette activation est induite par la molécule interleukine IL-2, sécrétée par les lymphocytes T-auxiliaires. Afin de se soustraire à la surveillance du système immunitaire, les cellules cancéreuses sécrètent des oncosomes portant sur leur surface la protéine transmembranaire ICOSL. Ce peptide, une fois présenté à son récepteur ICOS, va induire la prolifération des lymphocytes T-régulateurs [22]. Ce type de cellules inhibe l'activité immunitaire en consommant l'interleukine IL-2 et en sécrétant des cytokines suppressives telles que l'IL-10 ou TGF- β . Ces lymphocytes participent à la tolérance de la tumeur. De plus, les oncosomes peuvent directement intervenir pour entraver l'activité des lymphocytes T-auxiliaires et T-cytotoxiques en délivrant la cytokine TGF- β 1 [23]. Cette molécule agit également sur les lymphocytes B en induisant leur apoptose [24].



II.2.3. Préparation des niches métastatiques dans les sites secondaires

Les métastases constituent le stade final de la progression d'un cancer. Ce sont des tumeurs qui se développent dans des organes autres que celui abritant la tumeur primaire. Elles se sont formées à partir des cellules cancéreuses de la tumeur initiale, qui ont migré grâce aux vaisseaux lymphatiques et sanguins. Selon l'Institut National du Cancer³, les métastases sont responsables de 90 % des décès par cancer.

Même si la formation des métastases reste peu comprise, en 1889, Paget constate que sur plus de 735 patientes atteintes d'un cancer du sein, 241 ont aussi développé un cancer du foie et 70 un cancer du poumon [25]. Il suggère que la distribution des métastases n'est pas aléatoire et que certains organes sont prédisposés afin de devenir des sites secondaires. Il remarque notamment que les propriétés du microenvironnement des organes jouent un rôle important dans l'implantation des métastases. Il établit l'hypothèse « seed and soil », en suivant la métaphore d'une plante (la tumeur initiale) qui, pour se développer, parsème ses graines (cellules cancéreuses) et ne croît que sur un sol fertile (site secondaire). Les oncosomes modifient le microenvironnement des organes afin de « préparer le terrain » pour l'invasion tumorale [16], on parle alors de niche pré-métastatiques.

Une des voies possibles à la modification du microenvironnement est le recrutement des cellules souches de la moelle osseuse. Les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs de croissance, des cytokines et des protéines solubles afin de mobiliser les cellules de la moelle osseuse. Quant aux oncosomes, ces derniers « éduquent » les cellules souches de la moelle osseuse afin d'induire soit un phénotype pro-vascularisation (notamment grâce à la protéine MET) soit un phénotype pro-métastatique [26]. Avec ce dernier phénotype, les cellules de la moelle osseuse remodelent la matrice extracellulaire en sécrétant activement le récepteur de la fibronectine, une protéine facilitant l'adhésion cellulaire. Puis, cette protéine est fabriquée par les fibroblastes, cellules responsables de la formation de la matrice extracellulaire [27].

De plus, les oncosomes permettent de modifier directement le milieu extracellulaire des sites secondaires en induisant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes [28]. Ces cellules ont la particularité de se contracter grâce à la production d'actine. Elles sont présentes lors de blessures et participent à la cicatrisation en maintenant la plaie fermée et en produisant abondamment du collagène. Dans le cas d'un cancer, l'accumulation des myofibroblastes permet de supporter la croissance de la tumeur et la vascularisation [16] (Figure I.2).

³ Site : <https://www.e-cancer.fr/>



Les oncosomes produits par les cellules cancéreuses participent à la progression et à la croissance tumorale, à l'angiogenèse, à la tolérance immunitaire vis-à-vis de la tumeur mais aussi au développement des métastases dans les sites secondaires.

II.3. Le transfert d'agressivité des cellules souches cancéreuses via les oncosomes

Le terme de cancer agressif englobe plusieurs notions telles que sa capacité à proliférer rapidement, de migrer et former des métastases mais aussi sa résistance aux traitements conventionnels. Le grade d'une tumeur permet de définir son niveau d'agressivité en se fondant sur l'aspect physique des cellules cancéreuses. Le grade augmente avec le risque de développement rapide du cancer et d'apparition de métastases. De plus, à haut grade, le risque de réapparition de la tumeur après rémission complète, est élevé. Malgré l'amélioration des thérapies conventionnelles, et d'après le journal Cancer Therapy Advisor⁴, le risque de récurrences s'élève à 17 % pour le cancer colorectal et à 30 % pour le cancer du sein (chiffres pour les Etats-Unis). Quant au glioblastome (GBM), qui représente 20 % des tumeurs du cerveau, le taux de récurrence est de 90% à 100 %. Le glioblastome est la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus maligne à l'âge adulte. Il est classé comme étant un gliome de haut grade (grade IV), considéré comme les tumeurs les plus agressives du système nerveux central.

Les rechutes et l'agressivité des tumeurs peuvent être en partie expliquées par l'hétérogénéité présente au sein de la population cellulaire de la tumeur, tant au niveau génétique que morphologique [29], ce qui constitue un défi thérapeutique. Cette hétérogénéité est suscitée par la présence de cellules dites « hidden tumor initiating cells » appelées cellules souches cancéreuses (CSCs) au sein du tissu tumoral [30]. Cette sous-population possède les caractéristiques des cellules souches, c'est-à-dire qu'elles présentent un phénotype indifférencié associé à des capacités d'auto-renouvellement, ce qui permet de régénérer l'ensemble de la tumeur. De plus, en raison de leurs propriétés de cellules quiescentes, c'est-à-dire dormantes, les CSCs sont résistantes à la radio et à la chimiothérapie ciblant préférentiellement les cellules proliférant très rapidement (Figure I.3) [30]. Par conséquent, la présence de CSCs dans les tumeurs solides est signe de forte agressivité du cancer.

⁴ Site : <https://www.cancertherapyadvisor.com/>



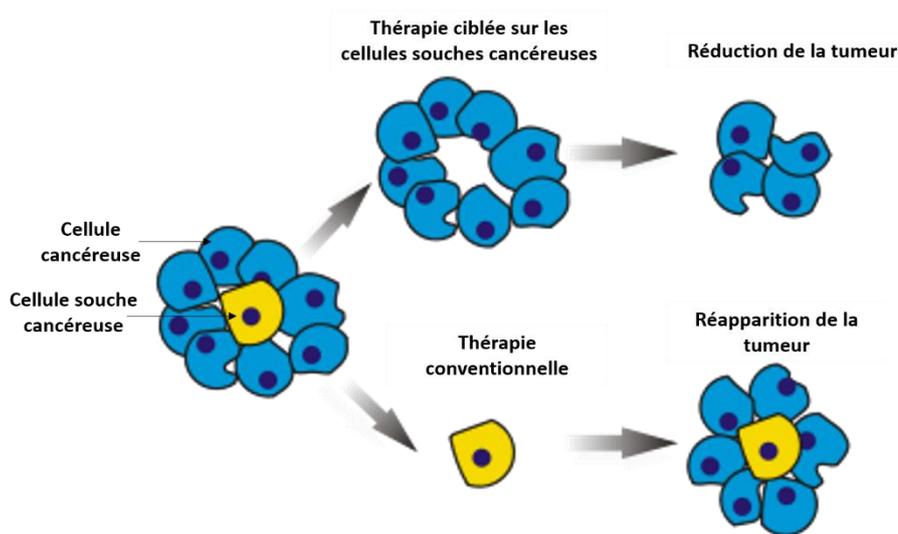


Figure I.3 : Schéma explicatif du rôle des CSCs dans la résistance thérapeutique et l'apparition de rechutes [31]

L'acquisition de la résistance à la chimiothérapie de certaines cellules de la tumeur ou des tissus environnants ajoute une difficulté au traitement contre le cancer, ce qui rend ce dernier plus agressif. Les CSCs, étant indifférentes aux traitements conventionnels actuels, peuvent avoir transmis cette caractéristique aux cellules cancéreuses différenciées via les oncosomes. En effet, les chercheurs du laboratoire CAPTuR et du CHU de Limoges ont mis en avant ce phénomène dans le cas du GBM [3]. Ils se sont intéressés au gène *YKL-40* qui est associé à un état indifférencié des cellules du GBM, c'est-à-dire qu'il est fortement exprimé par les CSCs. L'extinction de ce gène a pour conséquence la détérioration de la capacité de prolifération et de formation de neuro-sphères en culture in vitro qui sont liées au phénotype souche, réduisant ainsi l'agressivité des cellules cancéreuses du fait de la perte de l'état indifférencié. Les oncosomes produits par les cellules indifférenciées ont été mis en contact avec les cellules dont l'expression du gène *YKL-40* est éteinte. Ces dernières ont recouvré leurs fonctions biologiques de prolifération active, les rendant plus agressives grâce au transfert de protéines par les oncosomes. Ces résultats mettent en évidence le mécanisme de propagation du caractère agressif via les oncosomes dans le cas du GBM.

Dans ce contexte, l'objectif des travaux de cette thèse est d'étudier le rôle et l'impact des oncosomes dans le transfert d'agressivité des cellules tumorales dans le cadre des cancers colorectaux. Pour ce faire, l'idée est de mettre en contact des oncosomes sécrétés par les CSCs avec des cellules cancéreuses différenciées et de caractériser ces dernières quelques jours après l'ingestion des oncosomes. L'avantage de l'outil de caractérisation cellulaire utilisé réside dans sa capacité à discriminer les CSCs des cellules cancéreuses différenciées. Autrement dit, dans ce projet, ce ne sont pas les EVs directement qui seront caractérisées par voie électromagnétique mais l'effet qu'elles produisent sur les cellules. La détection par des biomarqueurs des CSCs capables de transférer leur caractère agressif au sein des tumeurs solides donne une valeur pronostique pour évaluer la virulence de



la tumeur et prévenir le risque de récurrence. La notion de biomarqueurs peut être définie de manière générale comme n'importe quel indicateur biologique mesurable capable de reconnaître une population cible. Il peut être de différentes natures : cellulaire, moléculaire en utilisant des marqueurs, ou basé sur des caractéristiques physiologiques et morphologiques. Actuellement, l'identification des CSCs peut être réalisée grâce à des biomarqueurs immuno-fluorescents couplés à la cytométrie en flux et/ou à l'analyse protéinique. Cependant, l'une des principales difficultés rencontrées dans la caractérisation des CSCs est le manque de marqueurs véritablement spécifiques à ces cellules. C'est pourquoi un panel de biomarqueurs génériques est analysé pour identifier la présence de CSCs en fonction du niveau d'expression de ces biomarqueurs génériques. Néanmoins, ces marqueurs peuvent être également exprimés individuellement par d'autres cellules cancéreuses [30] et par des cellules souches non cancéreuses [32], [33]. Le marqueur le plus couramment utilisé est le CD133 qui est une protéine transmembranaire dont la fonction biologique reste encore floue [34]. Les cellules du GBM exprimant fortement le marqueur sont capables de former des embryons de tumeurs sous forme de neuro-sphères en culture in vitro, caractéristiques des CSCs. Cependant, selon [31], il existe un sous-ensemble de CSCs qui n'expriment pas le marqueur CD133, ce qui limite son utilisation pour reconnaître les cellules souches du GBM par rapport à d'autres cellules non CSCs. Les CSCs ne peuvent donc pas être identifiées par la seule expression de CD133, il en va de même pour le cancer colorectal (CCR) [32]. Parmi les immuno-marqueurs les plus utilisés, en plus de CD133 on peut trouver :

- Nanog : ce facteur de transcription régule l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches embryonnaires. Une expression élevée de Nanog dans le cancer est corrélée à des propriétés malignes telles que l'invasion cellulaire, la clonogénicité et la résistance thérapeutique [37])
- Sox2 : dans le CCR, il est localisé dans les cellules de la crypte de l'épithélium intestinal, constituant les cellules souches. Sox2 bloque la différenciation des cellules et son expression est corrélée avec l'invasion métastatique et des ganglions lymphatiques [38]
- Oct4 : il est exprimé dans le cytoplasme des cellules et est responsable du maintien des cellules souches, de la croissance tumorale et des métastases. Cependant, il est également exprimé dans les cellules normales du côlon [38])
- Bmi1 : il joue un rôle important dans l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules souches cancéreuses [39]
- Lgr5 : il est uniquement exprimé par les cellules souches de la crypte intestinale en cours de division. Son expression coïncide avec la croissance et la récurrence tumorale [38].

Nanog, Sox2 et Oct4 sont responsables de la capacité des CSCs à maintenir leur pluripotence et leur auto-renouvellement [33].



Le gold standard pour classifier une cellule comme étant cancéreuse souche reste un test fonctionnel tel que la clonogénicité. Ce test consiste à vérifier la capacité d'une CSC isolée des autres cellules à initier et générer une tumeur [40]. Cependant, de telles expériences nécessitent jusqu'à 20 à 40 jours de processus et ne sont donc pas viables pour être mises en œuvre en routine clinique. On comprend bien que les biologistes ont donc besoin de pouvoir caractériser plus rapidement les CSCs et les identifier, afin de pouvoir adapter le traitement contre le cancer. Par la suite, d'autres méthodes de caractérisation seront abordées.

III. Le tri cellulaire comme outils de caractérisation

Dans cette partie, nous allons voir différentes méthodes de tri cellulaire à des fins de caractérisation. Les procédés conventionnels utilisent des immuno-marqueurs afin d'effectuer le tri cellulaire. Cependant, d'autres méthodes sans marqueurs se développent et nous verrons pourquoi une stratégie sans marqueurs est particulièrement pertinente dans le contexte de la caractérisation des cellules souches cancéreuses.

III.1. Méthodes avec marqueurs cellulaires

III.1.1. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

La cytométrie en flux activée par fluorescence (FACS) est la méthode d'analyse et de tri cellulaire la plus répandue dans les laboratoires (Figure I.4). Son principe est basé sur le marquage des cellules cibles au sein de la suspension cellulaire à l'aide d'anticorps couplés à un fluorochrome. Cette suspension hétérogène est introduite dans le cytomètre en flux avec une vitesse très importante de l'ordre de 10 m/s [41]. Grâce à des flux de focalisation latéraux, les cellules sont alignées au centre du cytomètre puis passent une par une devant un système optique. Ce système est composé d'un faisceau laser et de deux détecteurs. Un premier détecteur collecte les données sur la taille des cellules en analysant l'intensité de la lumière absorbée par ces dernières. Un deuxième détecteur, situé à 90° du premier, recueille les données concernant la structure intracellulaire (granulosité, rapport nucléocytoplasmique...) avec l'intensité de la lumière diffusée. Si les cellules cibles passent devant le système optique, alors un signal de fluorescence sera émis et détecté. A partir de ce dernier, on obtient deux informations : le nombre de cellules exprimant le marqueur d'intérêt et l'intensité de la fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de marqueurs dans chaque cellule.



A la sortie du cytomètre se trouve une buse vibrante, fractionnant le flux en gouttelettes et enfermant une unique cellule. En fonction de l'intensité de fluorescence détectée précédemment, les gouttelettes sont chargées électriquement. Puis ces gouttelettes chargées sont déviées grâce à des déflecteurs électromagnétiques. Les cellules sont donc isolées et triées.

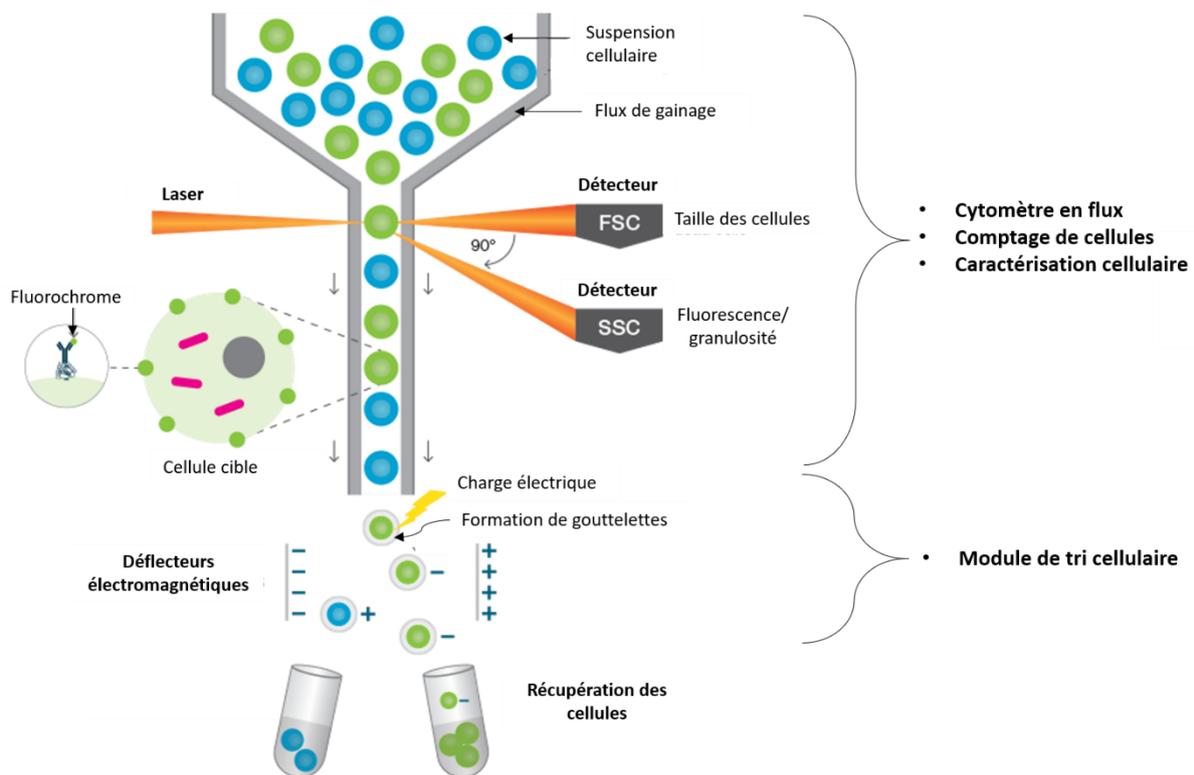


Figure I.4 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux par fluorescence⁵

Le FACS est une technique de tri et d'analyse performante permettant d'obtenir plusieurs informations concernant la morphologie cellulaire et la signature fluorescente à partir d'une population hétérogène de cellules. Depuis sa création à la fin des années 60 par Herzenberg [42], le cytomètre en flux a été optimisé jusqu'à atteindre une vitesse de tri de 50 000 cellules par seconde [43]. De plus, l'analyse individuelle des cellules permet d'obtenir un taux de pureté très élevé de plus de 95 % [44]. Cependant, le fractionnement en gouttelettes par vibration cause des dommages aux cellules. En post-tri, la viabilité des cellules baisse de 10 % et beaucoup de débris cellulaires peuvent être observés dans l'échantillon recueilli [45]. Un autre désavantage est le coût important du cytomètre en flux qui compte

⁵ Source : <https://www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/benefits-fluorescence-activated-cell-sorting-stem-cell-research?ID=Q0JH51RT8IG9>



en plus du système optique, un module de tri électrique ainsi que les coûts relatifs à l'analyse elle-même dont en particulier celui des fluorochromes à coupler avec les cellules cibles.

III.1.2. Buoyancy Activated Cell Sorting (BACS)

En réponse au prix coûteux de la cytométrie en flux par fluorescence, la technique de tri cellulaire activé par flottabilité (BACS) a été développée à partir de 2010 [46]. Cette technique repose sur la flottabilité de microbulles. Elles sont recouvertes par une couche soit de lipides, soit de polymères ou encore de protéines, et leur cœur est composé de gaz. Leur diamètre est de l'ordre du micromètre. Les microbulles sont fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques aux cellules cibles afin de les isoler.

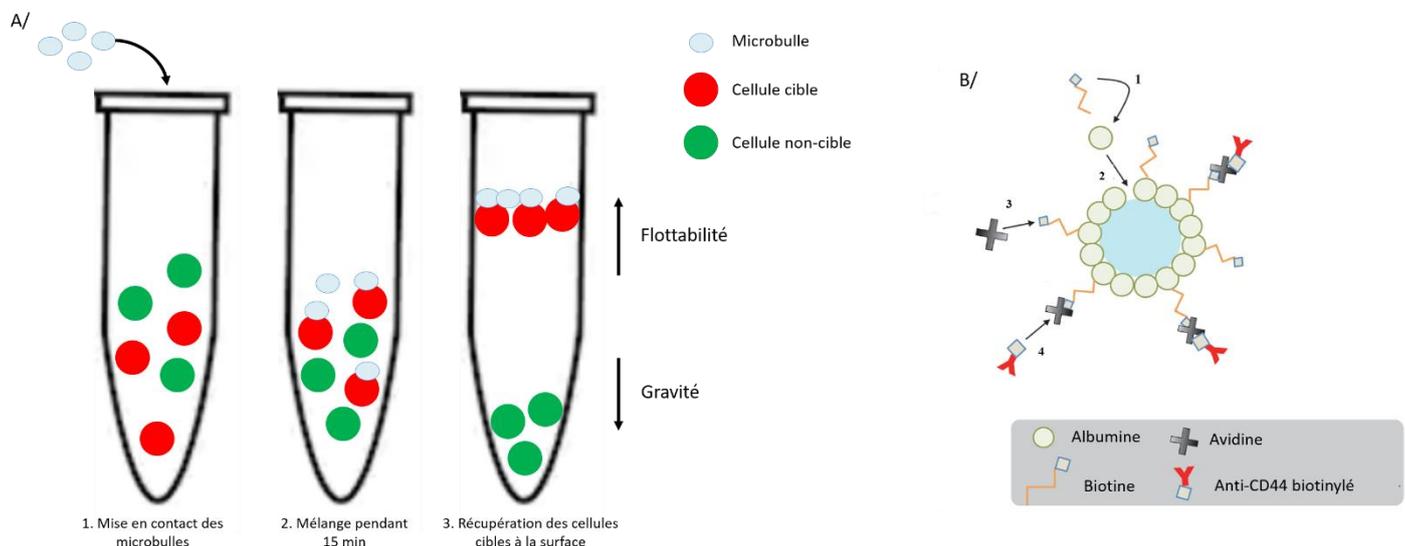


Figure I.5 : (A) Principe de fonctionnement de la méthode BACS, (B) exemple de fonctionnalisation d'une microbulle avec l'anticorps anti-CD44 [47]

La

Figure I.5A décrit le principe du BACS. Après la fonctionnalisation des microbulles, ces dernières sont mises en contact avec la population dont on veut isoler des cellules cibles. Lors du mélange, les microbulles se lient spécifiquement aux cellules cibles grâce à des anticorps à leur surface. Tandis que les cellules non-cibles sédimentent au fond de l'éppendorf, les cellules cibles quant à elles, remontent à la surface. Ces dernières sont donc isolées, triées et peuvent être récupérées. Le BACS ne requière aucun équipement spécifique et est rapide, ce qui fait que cette technique est plus rentable que le FACS, mais elle nécessite tout de même l'achat des anticorps.



Grâce à cette méthode, il est possible de distinguer des types cellulaires très proches. L'équipe du chercheur Liou a utilisé le BACS afin de séparer des cellules du cancer du sein (MDA-MB-231 vs MDA-MB-453) [47]. Pour se faire, les chercheurs fonctionnalisent des microbulles (Figure I.5B) avec les anticorps anti-CD44, qui se lie spécifiquement aux cellules cancéreuses MDA-MB-231. Les microbulles sont recouvertes d'une couche de protéine albumine. La protéine biotine est ensuite greffée à la surface des microbulles grâce au composé *N*-hydroxysulfosuccinimide (NHS) ester. La réaction va activer le groupe carboxyle de l'albumine afin de réagir avec le groupe amine de la biotine. Puis les biotines-microbulles sont incubées avec la protéine avidine pendant 2h. La liaison avidine-biotine fait partie des liaisons non-covalentes les plus fortes connues dans la nature [48]. Enfin, les anticorps biotylés sont incubés avec les microbulles.

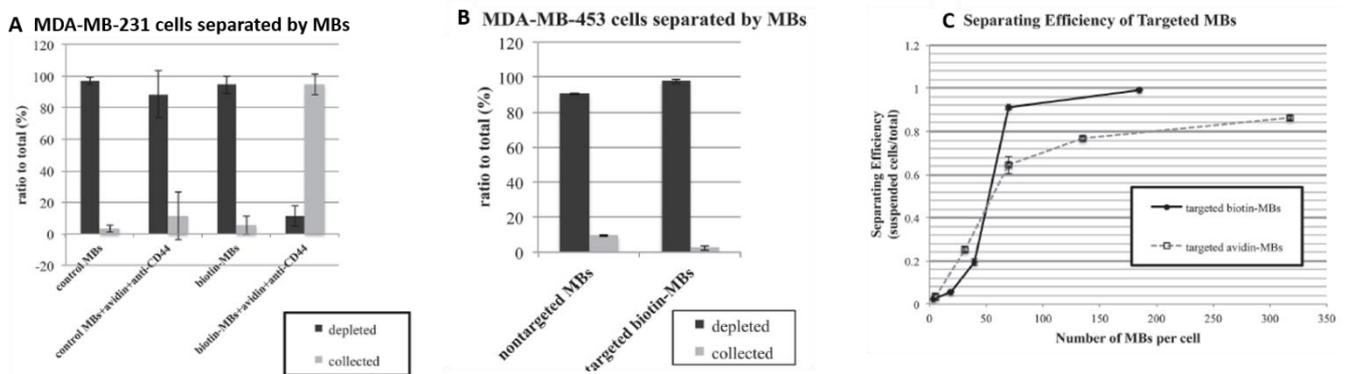


Figure I.6 : Résultats de l'efficacité et de la spécificité de la méthode BACS sur le tri et l'isolement des MDA-MB-231. (A) Quantification des cellules MDA-MB-231 collectées dans le culot et dans le surnageant (B) Relation entre l'efficacité de tri et le nombre de microbulles par cellule (C) Quantification des cellules MDA-MB-453 collectées dans le culot et dans le surnageant [47]

Les résultats quant à l'efficacité du tri et la spécificité de l'isolation des cellules MDA-MB-231 sont présentés dans la Figure I.6. Les microbulles fonctionnalisées avec les anticorps anti-CD44 se lie spécifiquement aux cellules MDA-MB-231 et permettent de les isoler, puis de les collecter à la surface de l'ependorf (Figure I.6A). Toutes autres cellules, comme les MDA-MB-453, tombent au fond du culot (Figure I.6B). Cependant, afin d'augmenter l'efficacité du tri par BACS, il faut un ratio microbulles/cellule élevé. Le rendement atteint 90% pour un ratio de 70 microbulles par cellule et 99% pour un ratio de 185 microbulles par cellule (trait plein sur la Figure I.6C).

Ces deux techniques présentées, le FACS et le BACS, utilisent des marqueurs spécifiques qui peuvent se lier à la membrane plasmique des cellules cibles. Ces méthodes de tri requièrent pour la fluorescence, un équipement coûteux et sa maintenance, une formation du personnel ainsi que l'achat des anticorps spécifiques et la mise en œuvre des étapes de marquage. Quant au BACS, l'étape



préparatrice intermédiaire de la fonctionnalisation des microbulles est primordiale et nécessite un temps de préparation. De plus, le marquage cellulaire peut influencer le comportement de la cellule [49] et donc limite les analyses supplémentaires et la remise en culture des cellules marquées. En outre, le problème évoqué dans la partie précédente concernant la controverse sur les marqueurs spécifiques des cellules cancéreuses souches, poussent les chercheurs à développer d'autres méthodes de tri cellulaire sans marqueurs cellulaires, appelées « label-free ».

III.2. Méthodes « label-free »

Les techniques « label-free » peuvent se classer en 2 catégories. Les méthodes dites passives qui reposent sur l'interaction entre les cellules, la géométrie de la puce microfluidique et l'écoulement du fluide. Les méthodes actives qui emploient un champ extérieur (acoustique, magnétique, optique ou électrique) afin de trier les cellules.

III.2.1. Méthodes passives

III.2.1.a. Déplacement latéral déterministe (DLD)

La technique du déplacement latéral déterministe (DLD) permet de trier les particules selon leur taille. C'est une méthode de tri reposant sur une matrice d'obstacles géométriques disposés dans un canal microfluidique. L'arrangement spécifique des piliers dans le canal permet de contrôler la trajectoire des particules en fonction d'un diamètre critique D_c . Les particules dont le diamètre est plus petit que le diamètre critique, suivront le mode « zigzag », tandis que les autres particules avec un diamètre plus grand, seront déviées en mode « déplacement » (Figure I.7A). L'effet déterministe vient du fait qu'en régime laminaire les lignes de courant du fluide ne se mélangent pas et par conséquent, les particules suivent ces lignes de courant.

Un motif de piliers (Figure I.7D) est répété périodiquement dans le canal microfluidique. D_p correspond au diamètre des piliers, λ à la distance entre deux centres des piliers et $\Delta\lambda$ au décalage horizontal du centre du pilier par rapport à celui de la ligne précédente. Ces paramètres permettent d'en déduire la périodicité N du système de tri :

$$N = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} \quad (I.1)$$



Le diamètre critique correspond à [50] :

$$D_c = 1.4 * (\lambda - D_p) * N^{-0.48} \quad (I.2)$$

Ainsi, avec une géométrie appropriée, on peut choisir un diamètre critique pertinent pour effectuer le tri. Il est possible de trier des particules de l'ordre du millimètre [51], du micromètre [52] et même de l'ordre de la dizaine de nanomètre [53].

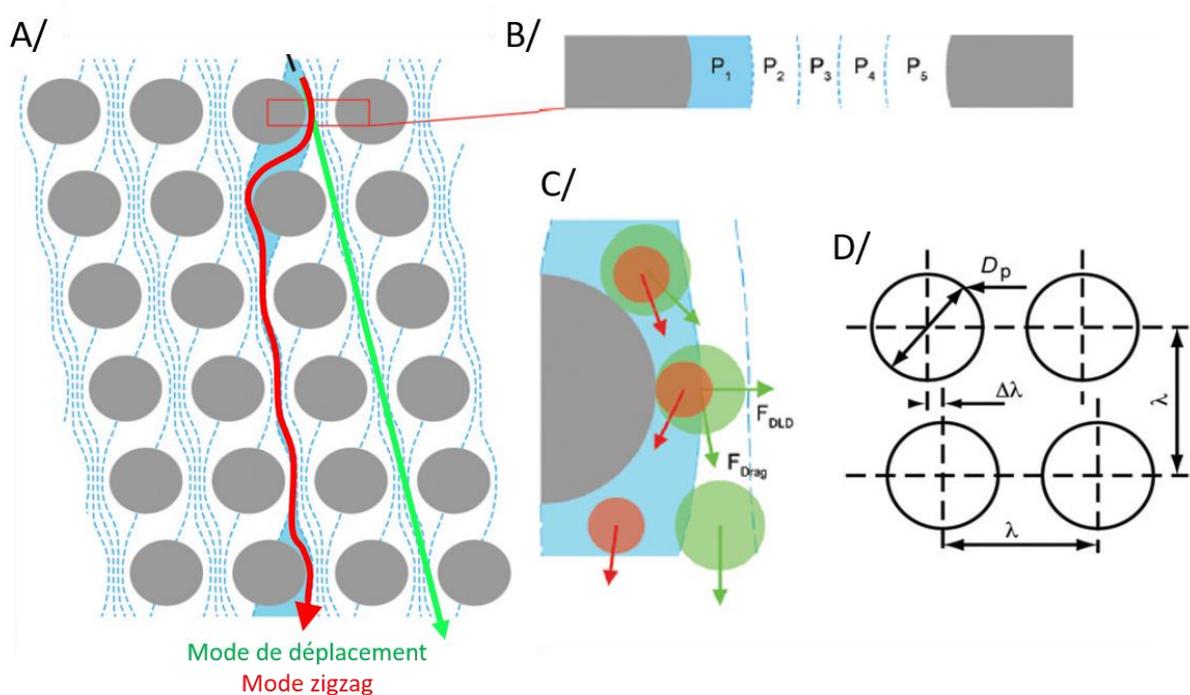


Figure I.7 : Principe du DLD, avec l'exemple d'une périodicité de $N = 5$. (A) Les particules peuvent se déplacer soit en mode déplacement, soit en mode zigzag suivant leur diamètre ; (B) Le design et l'espacement des piliers permettent de découper le flux en $N = 5$ parties égales, serpentant entre les piliers ; (C) Les particules de petites tailles sont emportées par le flux en mode zigzag, tandis que celles de plus grande taille ne peuvent pas suivre le déplacement du flux et sont donc déviées ; (D) Description géométrique de la matrice de piliers qui compose le canal microfluidique [52]

En rencontrant un obstacle, le fluide va se fractionner en N parties égales (Figure I.7B). Les lignes de flux vont alors serpenter dans la matrice de piliers sans se mélanger. En effet, à l'échelle de la microfluidique, l'écoulement du fluide se fait en régime laminaire où seule la diffusion joue un rôle important selon la taille des particules [50]. Les particules dont le diamètre est inférieur à D_c , ont leur centre de gravité situé dans la largeur de la première ligne de flux (Figure I.7C). En régime laminaire, cette particule restera dans la première ligne de flux et donc sinuera entre les piliers, c'est ce qu'on appelle le mode « zigzag ». Pour les particules dont le diamètre est supérieur à D_c , leur centre de gravité



se situe en dehors de la première ligne de flux. Elles sont alors repoussées vers la deuxième ligne de flux. La déviation continue à chaque rencontre avec un pilier, c'est ce qu'on appelle le mode « déplacement ».

Le mécanisme de tri du DLD repose donc sur une géométrie préalablement dessinée dans le canal microfluidique. Pour séparer des particules de plus de deux tailles différentes, il est nécessaire d'insérer des matrices de piliers en série avec un diamètre critique D_c différent et de plus en plus petit [54]. Afin d'avoir un bon rendement de tri, la vitesse du flux est habituellement faible, inférieure à $1 \mu\text{L}/\text{min}$.

III.2.1.b. Fractionnement par force de portance et flux de Dean

Indépendamment de la forme du canal microfluidique, les particules subissent deux forces perpendiculaires au mouvement : la force de portance de cisaillement et la force de portance induite par la paroi. La première force est due au profil parabolique de la vitesse du fluide dans le canal microfluidique. Le gradient de vitesse du fluide est plus élevé du côté de la paroi que du centre du canal, donc la force de portance de cisaillement pousse la particule vers la paroi du canal. Lorsque la particule se rapproche de la paroi, l'écoulement du fluide est perturbé par la présence de cette dernière et devient asymétrique au niveau de la particule. La force de portance induite par la paroi apparaît et repousse la particule vers le centre du canal. En superposant ces deux forces, on observe une migration latérale dans le canal microfluidique [55]. La force de portance s'exprime de la manière suivante [56]:

$$F_p = \frac{\rho U_m^2 a^4}{D_h^2} f_c \quad (\text{I.3})$$

Avec ρ la masse volumique du fluide, U_m la vitesse maximale du fluide, D_h le diamètre hydraulique du canal microfluidique, a le diamètre de la particule et $f_c (= 0,5)$ le coefficient de portance. Ce coefficient dépend de la position de la particule dans le canal et du nombre de Reynolds. Il décrit l'équilibre entre les deux forces de portance.

Cela permet d'en déduire la vitesse de migration latérale d'une particule sphérique [56]:

$$U_p = \frac{\rho U_m^2 a^3}{3\pi\mu D_h^2} f_c \quad (\text{I.4})$$

Avec μ la viscosité dynamique du fluide.

La vitesse de migration des particules est proportionnelle au volume de la particule. La force de portance pousse les particules vers la position d'équilibre qui se situe à environ $0,2D_h$ [55], cette position ne dépend pas de la taille des particules. Cependant, les particules les plus grandes atteindront leur



équilibre plus rapidement. Néanmoins, si l'on veut déplacer à leur nouvelle position d'équilibre des particules de 10 µm de diamètre dans un canal de section 100 µm x 50 µm avec une vitesse fluide de 33 mm/s, on atteint une longueur de canal de 12 cm minimum [57]. Le problème principal est qu'il est nécessaire d'avoir une vitesse de fluide élevée pour réduire la longueur du canal microfluidique.

La Figure I.8A propose un système d'enroulement du canal microfluidique afin de pallier à ce problème. Avec la courbure du canal apparaissent des forces centripètes qui engendrent des variations de pression et de vitesse du fluide au niveau des parois. Un second flux vient alors s'ajouter au flux principal : le flux de Dean (en pointillé rouge). Ce flux est caractérisé par le nombre de Dean [56] :

$$De = Re \sqrt{\frac{D_h}{2R}} \quad (I.5)$$

Avec Re le nombre de Reynolds et R le rayon de courbure du canal microfluidique.

A nombre de Dean faible ($De < 50$), le flux se compose de deux vortex circulant dans des sens opposés. Les particules se trouvant en haut ou en bas du canal sont repoussées vers la paroi interne du canal. Lorsque les particules sont situées sur le plan médian, elles sont déplacées vers le centre du canal. La vitesse de migration latérale moyenne ainsi que la force de Dean s'expriment de la manière suivante [57] :

$$U_{Dean} = 1,8 * 10^{-4} * De^{1,63} \quad (I.6)$$

$$F_{Dean} = 3\pi\mu * U_{Dean} * a \quad (I.7)$$

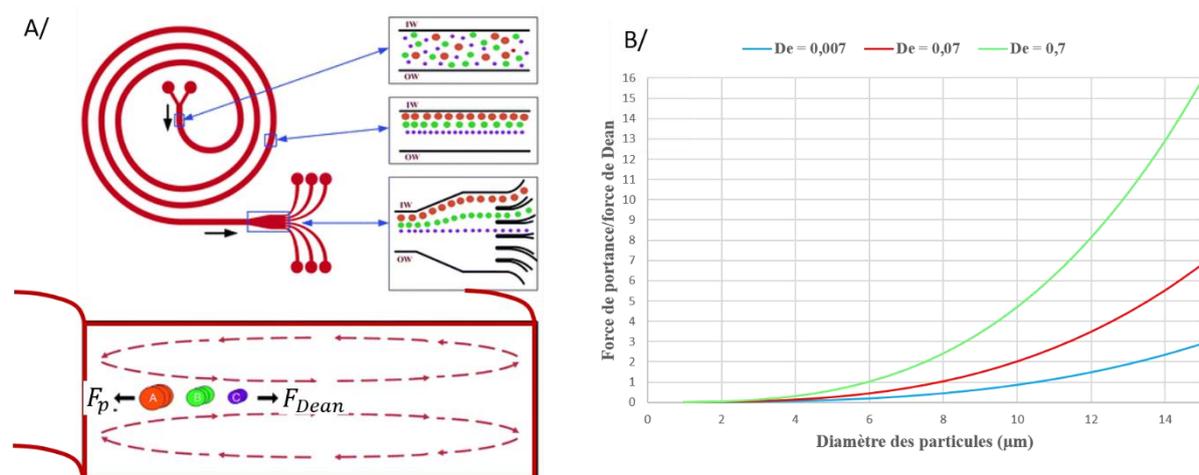


Figure I.8 : (A) Interaction entre la force de portance et la force de Dean dans un canal incurvé pour trier les particules [58] ; (B) Graphique montrant la compétition entre les forces de portance et de Dean en fonction du diamètre des particules à différents nombres de Dean donnés dans un canal de section 100 µm x 50 µm et de rayon de courbure de 3 mm.



Dans des canaux courbés, la force de Dean et la force de portance entrent en compétition. Le graphique de la Figure I.8B montre le ratio entre la force de portance et la force de Dean en fonction du diamètre des particules pour différents nombres de Dean donnés. Lorsque ce ratio est supérieur à 1, la force de portance entraîne toutes les particules de diamètre plus important vers l'équilibre à $0,2D_h$. Lorsque le ratio est inférieur à 1, une nouvelle position d'équilibre s'établit en fonction du diamètre de la particule, à vitesse de fluide fixée. On peut donc séparer des particules de tailles différentes [57], [58].

On remarque que lorsque le nombre de Dean augmente, la gamme de tailles de particules sous influence de la force de Dean et donc triables diminue. En effet, à vitesse fluidique élevée, les vortex de Dean sont prépondérants et une recirculation du fluide s'opère. Les particules se retrouvent mélangées sur toute la largeur du canal et le tri ne peut plus s'effectuer.

Les méthodes de tri passives permettent de séparer des particules de tailles différentes. On peut imaginer ces principes fluidiques mis en œuvre pour trier des cellules dont les morphologies sont hétérogènes. C'est principalement le cas, lorsque l'échantillon étudié est le sang. Il est possible de séparer les différentes cellules sanguines : plaquettes dont le diamètre est de $1\ \mu\text{m}$ à $3\ \mu\text{m}$, les globules rouges dont leur diamètre est d'environ $8\ \mu\text{m}$ et les globules blancs dont le diamètre varie de $5\ \mu\text{m}$ à $20\ \mu\text{m}$ [54]. Cependant, le tri recherché selon le degré d'agressivité de la cellule cancéreuse repose sur des caractéristiques internes et sur son contenu intracellulaire. Les méthodes passives ne semblent pas adaptées pour notre cas.

III.2.2. Méthodes actives

III.2.2.a. Pincés optiques

En 2018, le prix Nobel de physique a récompensé le chercheur Ashkin qui a mis au point la technique des pincés optiques en 1986 [59]. Cette technique permet de piéger et de manipuler des particules de taille variant de quelques nanomètres à plusieurs micromètres, grâce à un faisceau laser fortement focalisé.

D'après les lois de Snell-Descartes, lorsqu'un rayon lumineux subit un changement de milieu de propagation en traversant une interface, une partie du faisceau est réfractée tandis que l'autre partie est réfléchi (Figure I.9A). Le phénomène de réfraction s'accompagne d'un changement de quantité de mouvement qui résulte en une force extérieure appliquée sur la particule ($F_{\text{réfraction}}$ qui est dirigée le long de l'axe optique et vers le point de focalisation). Cette force dite de gradient est d'autant plus importante dès lors que la particule se trouve proche du point de focalisation du laser. Grâce au gradient



d'intensité gaussien, la particule se retrouve alors piégée au centre du faisceau (Figure I.9B). De plus, une force de diffusion est engendrée et pousse la particule dans le sens de propagation du faisceau laser. Suivant la taille de la particule par rapport à la longueur d'onde du laser, la particule sera soumise soit à la diffusion de Mie ($r \gg \lambda$), soit la diffusion de Rayleigh ($r \ll \lambda$). La force de diffusion doit être inférieure à la force de gradient pour un piégeage efficace. En balayant le faisceau latéralement, on peut déplacer des particules. En effet, les pinces optiques ont été utilisées afin de déplacer des cellules neuronales photoréceptrices non adhérentes sur la boîte de culture vers un groupe de cellules neuronales adhérentes [60].

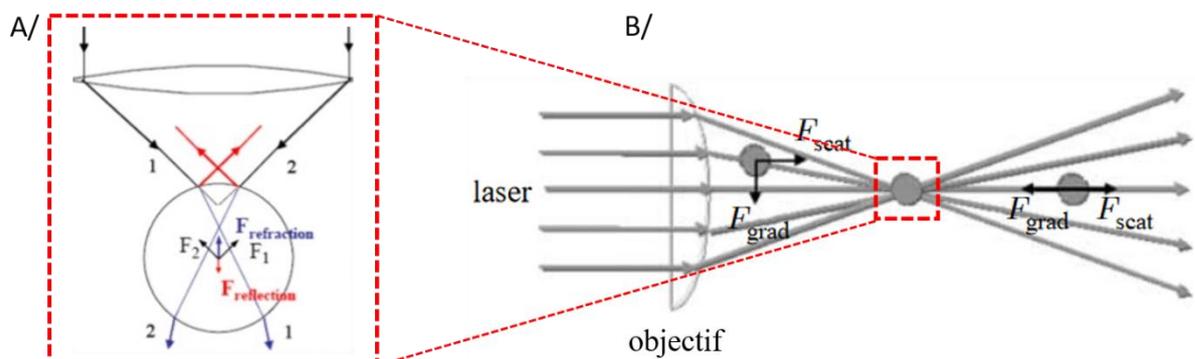


Figure I.9 : Principe d'une pince optique. (A) Les rayons lumineux du laser subissent la réflexion et la réfraction lors du changement de milieu à l'interface de la particule. [61] (B) Les forces résultantes de gradient et de diffusion entrent en compétition afin de capturer la particule au point de focalisation. [62]

Cependant, la technique des pinces optiques soulève plusieurs désavantages. Tout d'abord, l'indice de réfraction de la particule doit être supérieur à l'indice du milieu environnant. En travaillant avec des objets biologiques, l'intensité du flux lumineux peut être trop puissante, produisant de la chaleur et des dommages à l'échantillon. Enfin, afin de générer des forces de gradient plus importantes pour rendre le piégeage plus efficace, le faisceau laser doit être fortement focalisé et pour ce faire, des objectifs de microscope à forte ouverture numérique doivent être employés [61].

III.2.2.b. Magnétophorèse

La magnétophorèse est une technique de tri reposant sur les propriétés magnétiques intrinsèques de l'hémoglobine. Cette protéine est présente dans les globules rouges et transporte de l'oxygène des poumons vers le reste de l'organisme. La présence de cations Fe^{2+} permet la fixation de molécules de dioxygène. Lors de la fixation à l'ion ferreux, la molécule de dioxygène est réduite à l'ion superoxyde, tandis que le cation Fe^{2+} est oxydé en Fe^{3+} . Dans cet état, l'hémoglobine appelée oxyhémoglobine, est



diamagnétique. En absence d'oxygène, l'hémoglobine appelée désoxyhémoglobine, est paramagnétique [49].

Une application de la magnétophorèse pour le sang est la détection de complications de grossesse et des anomalies fœtales. Un module microfluidique permet d'isoler les globules rouges nucléés (NRBC) des autres cellules sanguines [63]. Cependant, il est nécessaire de passer l'échantillon dans une matrice de piliers DLD afin de le purifier des globules rouges matures, étant donné que le diamètre des cellules cibles est 3 à 5 fois supérieur aux globules rouges cibles. Les cellules récupérées sont ensuite incubées avec du nitrite de sodium NaNO_2 , afin de rendre les hémoglobines paramagnétiques. Puis, l'échantillon est passé dans une colonne magnétique de champ 1,4 T, qui retient les NRBC tout en laissant passer les globules blancs qui sont eux diamagnétiques. Après ces deux étapes, le taux de pureté est de 99,9 % à un débit faible (0,35 mL/h).

Nous avons entrevu dans cette partie, de manière non exhaustive, différentes méthodes de tri cellulaire, que ce soit avec marqueurs ou sans marqueur. Plusieurs autres techniques présentes dans la littérature peuvent également être mises en œuvre comme l'illustre la Figure I.10.

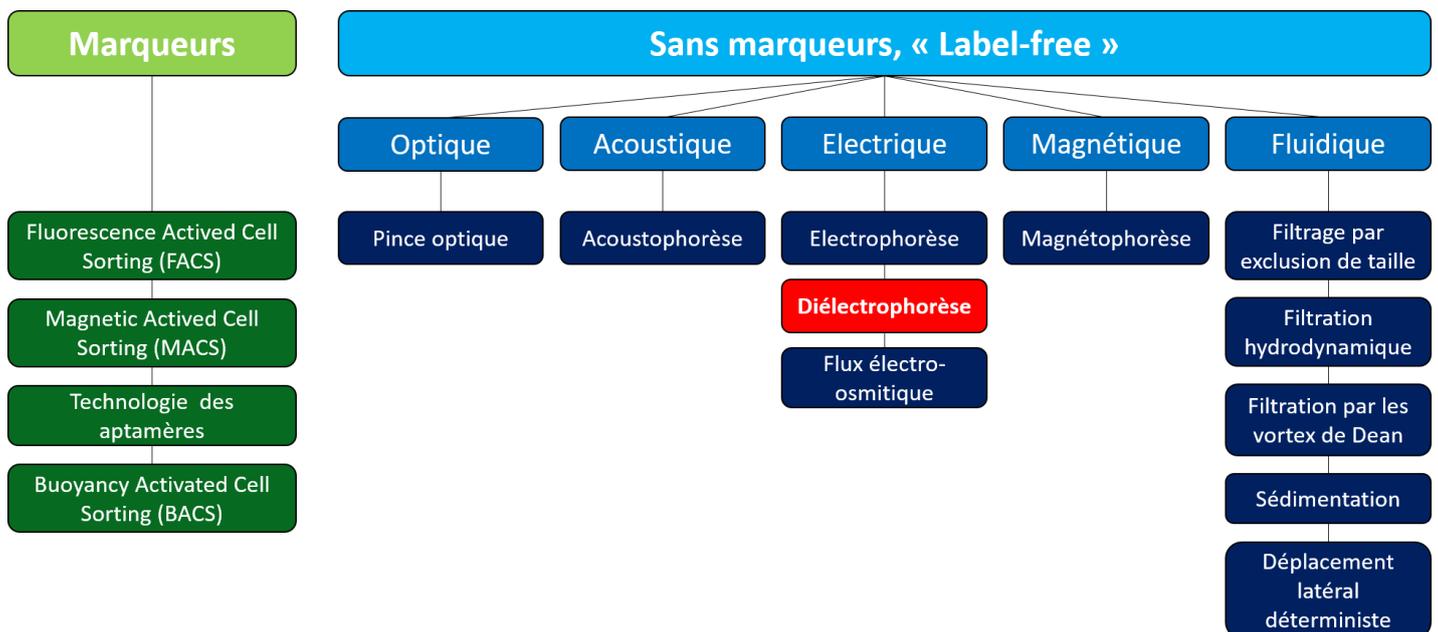


Figure I.10 : Différentes méthodes de séparation cellulaire rencontrées dans la littérature. En rouge, la diélectrophorèse sera la technique développée tout au long de ce manuscrit. Adapté de [49], [64]

Parmi ces méthodes, la diélectrophorèse est phénomène physique qui repose sur les propriétés diélectriques des cellules. Cette technique va être mise à profit dans ces travaux de thèse et nous allons tout d'abord en présenter les principes dans la partie suivante.



IV. Principe de la diélectrophorèse

La diélectrophorèse (DEP), pour la première fois observée par H. Polh en 1951, est un phénomène physique décrivant le mouvement d'une particule dans un champ électrique non-uniforme [65]. Ce principe est aujourd'hui notamment utilisé dans le cas de particules électriquement neutres mais polarisables, comme par exemple les cellules du vivant. Ce qui rend cette technique intéressante est que ses effets dépendent des propriétés diélectriques intrinsèques de la particule [66]. C'est pourquoi, la diélectrophorèse peut être utilisée dans le cadre de la caractérisation, de la manipulation et du tri cellulaire. De plus, cette technique ne nécessite pas d'avoir recours à des marqueurs biologiques risquant de modifier le comportement cellulaire, et elle est de surcroît sans contact mécanique avec les particules, ce qui limite les dommages possibles aux cellules.

La diélectrophorèse s'est notamment développée à partir de la fin des années 1990, grâce à l'émergence des laboratoires sur puce (Figure I.11). Ces microsystèmes ont pour but d'effectuer une ou plusieurs mesures sur des échantillons chimiques ou biologiques de très faible volume, de l'ordre de quelques μL [61]. Pour ce faire, différentes fonctions sont intégrées sur la puce, comme par exemple l'extraction et la purification de l'échantillon, la détection et le tri de particules... [67]. Le traitement et la manipulation d'échantillon de petit volume peuvent ainsi permettre de limiter les interventions invasives sur les patients. La possibilité de l'automatisation et de la parallélisation des analyses grâce à la microélectronique permet de réduire le coût de fabrication mais aussi de réduire le temps d'analyse. Les nombreux avantages des laboratoires sur puce en font un domaine de recherche crucial et en plein essor notamment pour le diagnostic *in vitro*.



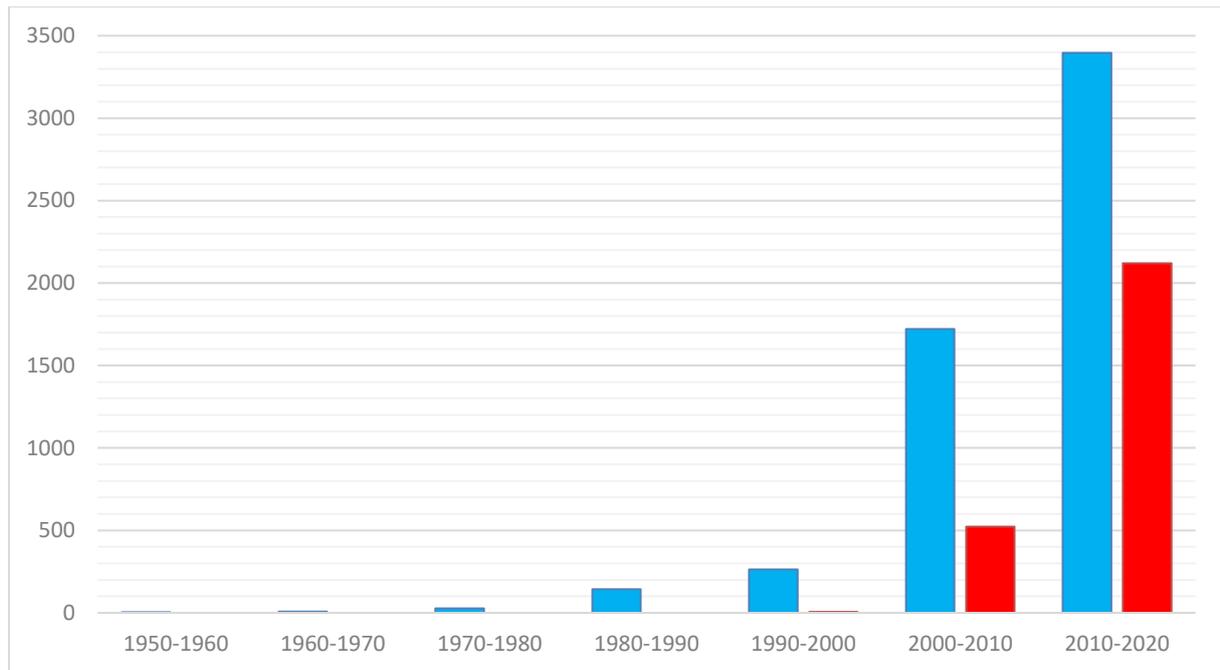


Figure I.11 : Evolution du nombre d'articles référencés sur Scopus traitant de la diélectrophorèse (en bleu) et des laboratoires sur puce (en rouge)

IV.1. Polarisation de la particule et force diélectrophorétique

La diélectrophorèse est une méthode de diagnostic *in vitro* peu coûteuse, non invasive et sans marqueurs moléculaires, qui induit une force de déplacement sur des particules polarisables en suspension dans un champ électrique non uniforme.

Dans le cas d'un champ électrique à courant continu (DC), la tension appliquée aux bornes des électrodes est fortement élevée afin de générer une force DEP suffisante pour dévier les cellules [68]. En effet, la tension DC peut atteindre dans certains cas en moyenne une centaine de volts [69], [70] à la différence de champs générés par des tensions alternatives. Or, par effet Joule, la température dans les canaux microfluidiques augmente, ce qui impacte la viabilité cellulaire. En effet, une augmentation de plus de 4°C au-dessus de leur température physiologique entraîne une mort cellulaire rapide [71]. Par la suite, on considère un champ électrique à courant alternatif (AC) de pulsation ω et de phase φ .

IV.1.1. Phénomène de polarisation

En présence d'un champ électrique uniforme (Figure I.12A), une particule chargée (qui possède au moins une charge libre) dans un milieu de suspension est soumise à la force de Coulomb qui induit un mouvement vers une des deux électrodes en fonction du signe de la charge totale. Dans le cas d'une



particule diélectrique (qui possède des charges peu mobiles), le champ électrique induit un moment dipolaire dû à la réorientation des charges à l'interface entre la particule et le milieu de suspension. Ce phénomène de polarisation redistribue les charges de manière égale en raison de l'uniformité du champ électrique. Les deux forces de Coulomb opposées sont de même amplitude ($|-qE| = |+qE|$) et dans ce cas, elles s'annulent. Donc aucun mouvement de la particule n'est observé.

Lorsque le champ électrique est non-uniforme (Figure I.12B), le gradient de champ introduit un déséquilibre dans les forces de Coulomb ($|-qE_{high}| > |+qE_{low}|$) et la résultante des forces est non-nulle. Donc un mouvement de la particule peut être observé. Ce phénomène est appelé la diélectrophorèse.

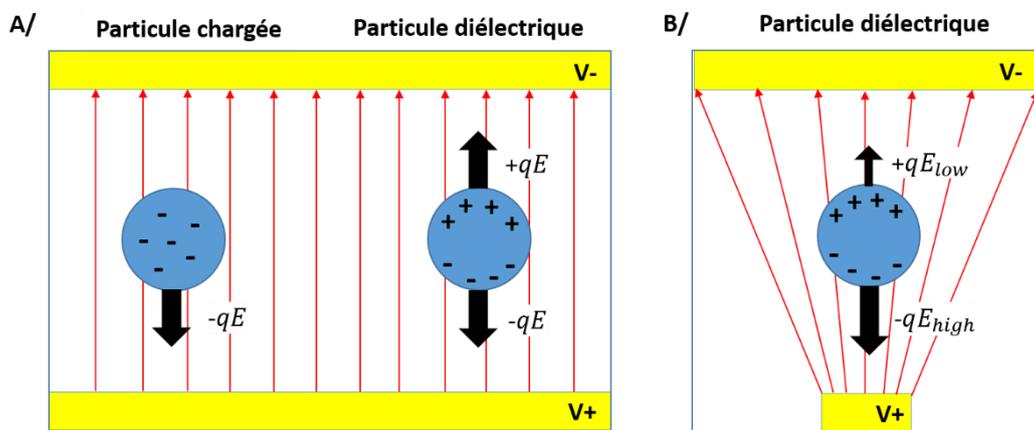


Figure I.12 : Principe d'induction de la force DEP et la réorientation des charges en présence d'un champ électrique (flèches rouges) généré par deux électrodes polarisées par une différence de potentiel : (A) particule chargée et particule diélectrique en présence d'un champ électrique uniforme. La particule chargée subit une nette force de Coulomb, alors que la particule diélectrique subit des forces opposées et égales ($|-qE| = |+qE|$), ce qui induit aucun mouvement ; (B) particule diélectrique en présence d'un champ électrique non-uniforme. La particule subit une force nette qui induit un mouvement vers un des bords des électrodes ($|-qE_{high}| > |+qE_{low}|$). Adapté de [71]

Les charges à l'interface entre la particule et le milieu de suspension sont réorientées suivant la polarisabilité de la particule et du milieu. La polarisabilité est décrite comme étant le moment dipolaire induit et l'expression du moment dipolaire est la suivante [72] :

$$\vec{p} = 4\pi \cdot r^3 \cdot \epsilon_m \cdot f_{CM}(\omega) \cdot \vec{E} \quad (I.8)$$

Avec r le rayon de la particule, ϵ_m la permittivité du milieu de suspension et $f_{CM}(\omega)$ le facteur de Clausius-Mossotti (facteur CM) et \vec{E} le champ électrique efficace, c'est-à-dire que l'on considère une amplitude « root mean square » (RMS).



Le facteur de Clausius-Mossotti décrit l'état de polarisation d'une particule dans un milieu de suspension. Il dépend des propriétés diélectriques (permittivité et conductivité) du milieu extra particulaire et de la particule [72]:

$$f_{CM}(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (I.9)$$

Avec ϵ_m^* , ϵ_p^* les permittivités complexes respectives du milieu de suspension et de la particule.

En effet, dans le domaine fréquentiel, on peut écrire la densité de courant totale telle que :

$$\vec{J}_{tot} = \vec{J}_c + \vec{J}_p + \vec{J}_m + \vec{J}_D \quad (I.10)$$

Avec $\vec{J}_c = \sigma \vec{E}$, la densité de courant de conduction et σ la conductivité.

$\vec{J}_p = \frac{d\vec{P}}{dt} = j\omega\epsilon_0\chi\vec{E}$, la densité de courant de polarisation, ϵ_0 la permittivité du vide et χ la susceptibilité électrique, rappelons que $\epsilon_r = 1 + \chi$

$\vec{J}_m = \vec{rot} \vec{M}$, la densité de courant d'aimantation, avec \vec{M} , le vecteur de la densité volumique du moment magnétique. Dans notre cas, en l'absence de champ magnétique, la densité de courant est nulle.

$\vec{J}_D = \epsilon_0 \frac{d\vec{E}}{dt} = j\omega\epsilon_0\vec{E}$, la densité de courant de déplacement.

On peut réécrire la densité de courant totale telle que :

$$\vec{J}_{tot} = \sigma \vec{E} + j\omega\epsilon_0(\chi + 1)\vec{E} = j\omega \left(\epsilon_0\epsilon_r - j\frac{\sigma}{\omega} \right) \vec{E} \quad (I.11)$$

On peut ainsi identifier l'expression de la permittivité complexe $\epsilon^* = \epsilon - j\frac{\sigma}{\omega}$. Cela permet de tenir compte du fait que le diélectrique présente des pertes d'énergie associées au mouvement des charges libres induit par le champ électrique ou à la relaxation des dipôles permanents. En réinjectant cette expression dans la formule du facteur de Clausius-Mossotti, on obtient :

$$f_{CM}(\omega) = \frac{(\epsilon_p - \epsilon_m) - \frac{j}{\omega}(\sigma_p - \sigma_m)}{(\epsilon_p + 2\epsilon_m) - \frac{j}{\omega}(\sigma_p + 2\sigma_m)} \quad (I.12)$$

Le facteur de Clausius-Mossotti est un nombre complexe qui dépend de la fréquence du champ électrique. Le signe du facteur de Clausius-Mossotti détermine l'orientation du moment dipolaire. S'il est positif (Figure I.13A), alors la particule est plus polarisable que le milieu et le moment dipolaire induit est orienté dans le sens du champ électrique. Les lignes de champ électrique sont attirées dans la particule. Si le facteur du Clausius-Mossotti est négatif (Figure I.13B), alors la particule est moins polarisable que le milieu et le moment dipolaire induit est opposé au champ électrique. Les lignes de



champ électrique contourne la particule. Les déformations du champ en présence d'une particule diélectrique seront décrites par la suite.

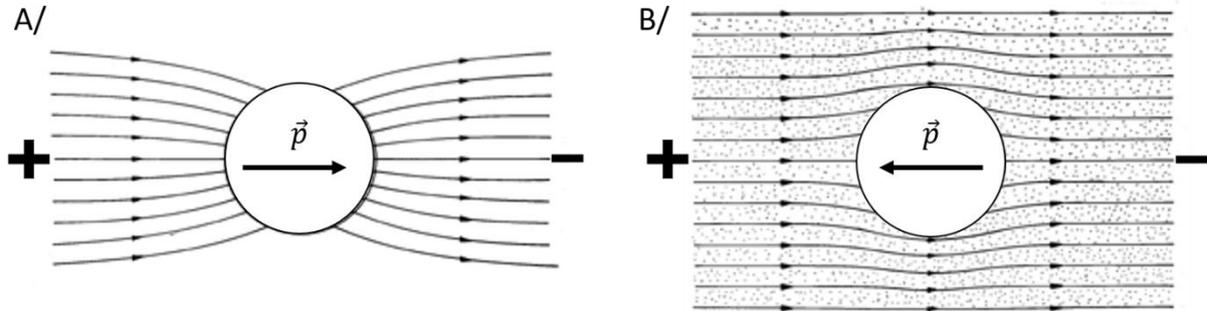


Figure I.13 : Représentation de la déformation des lignes de champ électrique en présence d'une particule diélectrique (A) dans le cas où la particule est plus polarisée que le milieu ; (B) dans le cas où la particule est moins polarisée que le milieu [73]

IV.1.2. Force diélectrophorétique

La force diélectrophorétique exercée sur la particule polarisée dans un champ électrique non-uniforme est en fait la force exercée sur un dipôle. Elle s'exprime de la manière suivante [68] :

$$\vec{F}_{DEP} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E} \quad (I.13)$$

Avec ∇ (nabla), l'opérateur différentiel vectoriel par rapport aux coordonnées cartésiennes.

En combinant (I.8) et (I.13), on obtient :

$$\vec{F}_{DEP} = 4\pi * r^3 * \epsilon_m * f_{CM}(\omega) * (\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} \quad (I.14)$$

Avec $(\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E}$ le produit entre le champ électrique et le gradient de champ électrique. Sous la condition nécessaire et suffisante d'un champ électrique \vec{E} non rotationnel, on peut établir l'identité remarquable suivante [72] : $2(\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} = \nabla E^2$ (I.15)

En utilisant l'identité (I.15) et en faisant la moyenne temporelle de la force DEP dans le cas d'un champ non-uniforme complexe, c'est-à-dire en prenant la partie réelle de (I.14), on obtient l'expression suivante [72] :

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 [Re[f_{CM}] \nabla E_{rms}^2 + Im[f_{CM}] (E_{rms,x}^2 \nabla \varphi_x + E_{rms,y}^2 \nabla \varphi_y + E_{rms,z}^2 \nabla \varphi_z)] \quad (I.16)$$

Avec $Re[f_{CM}]$ et $Im[f_{CM}]$ la partie réelle et la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti. L'équation (I.16) met en évidence le fait que la force DEP est dépendante du volume de la particule. Elle est constituée de deux termes :



- $F_{DEP\ conventionnelle} = 2\pi\epsilon_m r^3 Re[f_{CM}] \nabla E_{rms}^2$, appelée la force DEP conventionnelle. Elle dépend de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti et du gradient de champ au carré.
- $F_{twDEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 Im[f_{CM}] (E_{rms,x}^2 \nabla \varphi_x + E_{rms,y}^2 \nabla \varphi_y + E_{rms,z}^2 \nabla \varphi_z)$, appelée la force DEP à onde progressive (twDEP). Elle dépend de la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti et du gradient de la phase du champ électrique.

Ces deux termes vont être explicités dans les paragraphes suivants.

IV.1.2.a. Diélectrophorèse à onde progressive

La diélectrophorèse dite à onde progressive est orientée selon le gradient de la phase du champ électrique. Le signe de la force twDEP est donné par la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti dont l'expression est la suivante :

$$Im[f_{CM}] = \frac{\omega(\epsilon_p - \epsilon_m)(\sigma_p + 2\sigma_m) - \omega(\sigma_p - \sigma_m)(\epsilon_p + 2\epsilon_m)}{\omega^2(\epsilon_p + 2\epsilon_m)^2 + (\sigma_p + 2\sigma_m)^2} \quad (I.17)$$

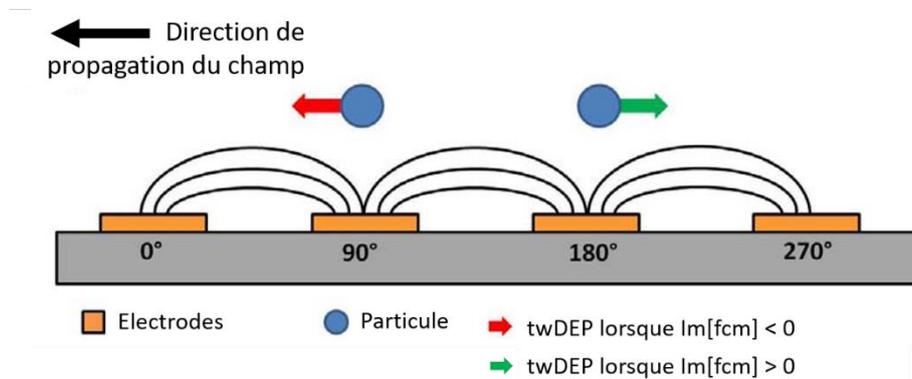


Figure I.14 : La non-uniformité spatiale de la composante de phase induit une force twDEP [74]

Afin de créer un gradient de phase, il est nécessaire d'utiliser un réseau d'électrodes dont les signaux sont déphasés. Dans le schéma de la Figure I.14, les signaux sont de même amplitude mais déphasés chacun de 90° par rapport au précédent. Lorsque la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti est positive, la particule se déplace vers les régions où la phase est plus élevée. Le sens de déplacement est opposé à la direction de propagation du champ électrique. En revanche, lorsque la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti est négative, la particule se dirige vers les régions de faibles phases. Le sens de déplacement est colinéaire à la direction de propagation du champ électrique.



La diélectrophorèse à ondes progressives peut être utilisée par exemple pour séparer des levures viables de celles non viables [75]. Lors de cette étude, les propriétés diélectriques des levures selon leur état de viabilité ont pu être déterminées [76] et la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti (Figure I.15) a pu être évaluée en fonction de la fréquence du champ électrique dans un milieu de suspension de basse conductivité : $\sigma = 10 \text{ mS/m}$.

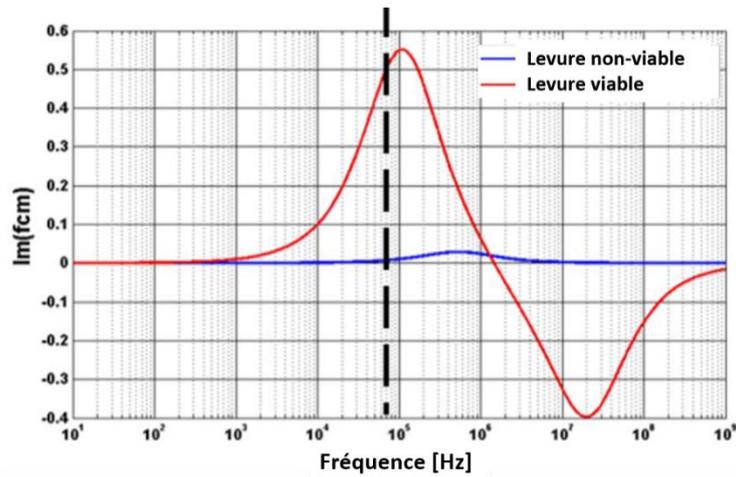


Figure I.15 : Partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti pour des levures viables (en rouge) et non-viables (en bleu) dans un milieu de conductivité de 10 mS/m. La fréquence de tri (70 kHz) est indiquée en pointillé. [75]

Pour cet exemple, la fréquence de tri sélectionnée est de 70 kHz. En effet, à cette fréquence, la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti pour les levures viables présente une amplitude beaucoup plus importante que pour les levures non-viables. Il en résulte que la force $twDEP$ sera plus importante pour les levures viables.

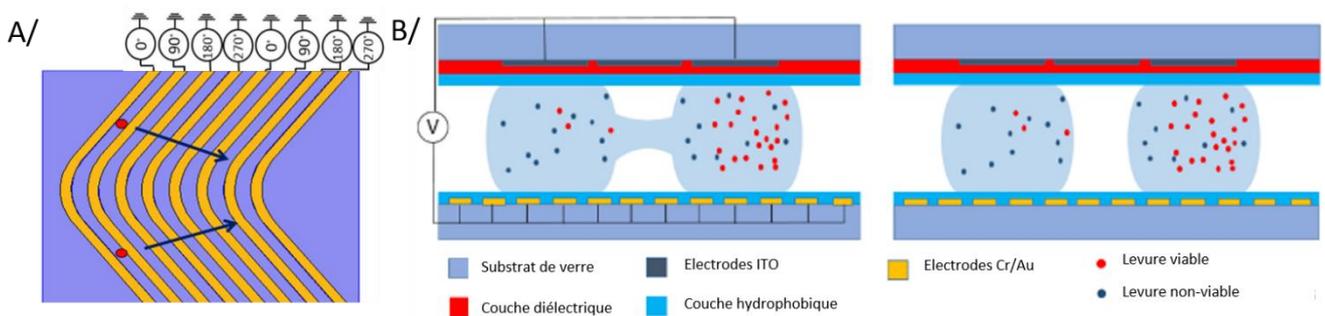


Figure I.16 : (A) Géométrie des électrodes polarisées et déphasées de 90°. Les levures viables se déplacent vers le centre de la courbure des électrodes, indiqué par les flèches. (B) Schéma de la séparation de la gouttelette en deux gouttelettes plus petites. La gouttelette de droite contient plus de cellules de levures viables. [75]



A partir d'une goutte contenant des levures, il est possible de la diviser en deux selon la viabilité des levures. Pour ce faire, le réseau d'électrodes de la Figure I.16A est alimenté par quatre signaux déphasés de 90°. Les électrodes ont une forme de boomerang afin d'attirer les levures viables vers les zones de phase plus élevée, c'est-à-dire vers le centre de la courbure des électrodes. Grâce à la twDEP, les levures viables seront accumulées vers la partie la plus à droite de la goutte. Le réseau d'électrode est situé sur la partie inférieure du dispositif de séparation sur la Figure I.16B. Les électrodes sur la partie supérieure sont de forme carrée et servent à la séparation de la goutte initiale en deux gouttes filles. Ainsi, il serait possible de récupérer les levures viables dans la goutte fille la plus à droite.

Dans notre cas, nous utilisons un unique signal dont l'amplitude peut être modifiée (cas de la DEP conventionnelle). En l'absence d'un gradient de phase de notre champ électrique appliqué, nous pouvons négliger la force twDEP pour le reste de l'étude. La force DEP pourra donc s'écrire sous la forme suivante :

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \operatorname{Re}[f_{CM}] \nabla E_{rms}^2 \quad (I.18)$$

IV.1.2.b. Diélectrophorèse conventionnelle

La diélectrophorèse dite conventionnelle dépend entre autres, du gradient d'intensité du champ au carré. Le signe de la force DEP est donné par la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti dont l'expression est la suivante :

$$\operatorname{Re}[f_{CM}] = \frac{\omega^2(\epsilon_p - \epsilon_m)(\epsilon_p + 2\epsilon_m) + (\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m)}{\omega^2(\epsilon_p + 2\epsilon_m)^2 + (\sigma_p + 2\sigma_m)^2} \quad (I.19)$$

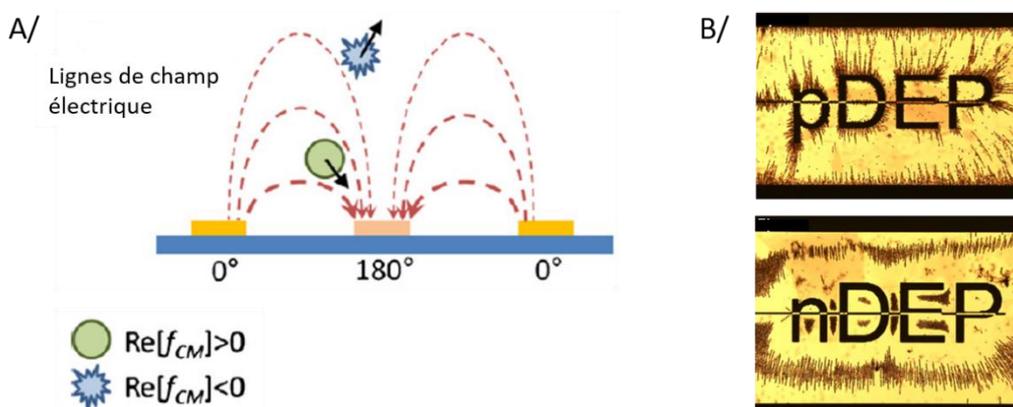


Figure I.17 : (A) La non-uniformité spatiale de l'amplitude du champ électrique induit une force DEP dite conventionnelle. [77] (B) Illustration de l'effet du gradient de champ sur des globules rouges à 100 kHz provoquant de la pDEP et à 10 kHz provoquant de la nDEP [78]



En effet, le sens de déplacement de la particule dépend du signe de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (Figure I.17). En effet, si celle-ci est positive, alors la particule est attirée vers les zones de champ fort, c'est-à-dire vers les électrodes. C'est ce qu'on appelle la DEP positive (pDEP). Au contraire, si la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est négative, alors la particule est repoussée vers les zones de champ faible. C'est ce qu'on appelle la DEP négative (nDEP).

D'après l'équation (I.18), la force DEP dépend du volume de la particule, de l'intensité du gradient au carré du champ électrique. Et à travers la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti, la force DEP dépend de la fréquence du champ électrique et des propriétés diélectriques de la particule et du milieu de suspension.

Soumise à la force DEP, Une cellule biologique peut être assimilée à une particule diélectrique quasi sphérique, Par la suite, nous allons voir comment modéliser une cellule biologique soumise à un champ non-uniforme. Puis nous allons étudier l'influence des propriétés diélectriques des cellules sur leur réponse diélectrophorétique.

IV.2. Pourquoi la DEP Ultra Haute Fréquence ?

IV.2.1. Qu'est-ce qu'une cellule biologique et comment la modéliser physiquement ?

Les cellules biologiques sont les unités structurelles et fonctionnelles de base qui composent tous les organismes connus. Il existe deux types fondamentaux de cellules : procaryote et eucaryote. Les cellules procaryotes regroupent les organismes unicellulaires tels que les bactéries. Elles ne possèdent pas de noyau, ce qui signifie que l'ADN généralement circulaire, flotte librement dans le cytoplasme. La taille des cellules procaryotes varie entre 1 μm et 5 μm de diamètre. Au contraire, les cellules eucaryotes composent les organismes multicellulaires. Leur matériel génétique est protégé et contenu dans un noyau et sa membrane nucléaire. La taille des cellules eucaryotes varie entre une dizaine de μm pour les cellules animales à une centaine de μm pour les cellules végétales. Pour la suite de l'étude, on ne considère que les cellules eucaryotes. La Figure I.18 présente le contenu intracellulaire et la structure de la membrane plasmique qui entoure la cellule.



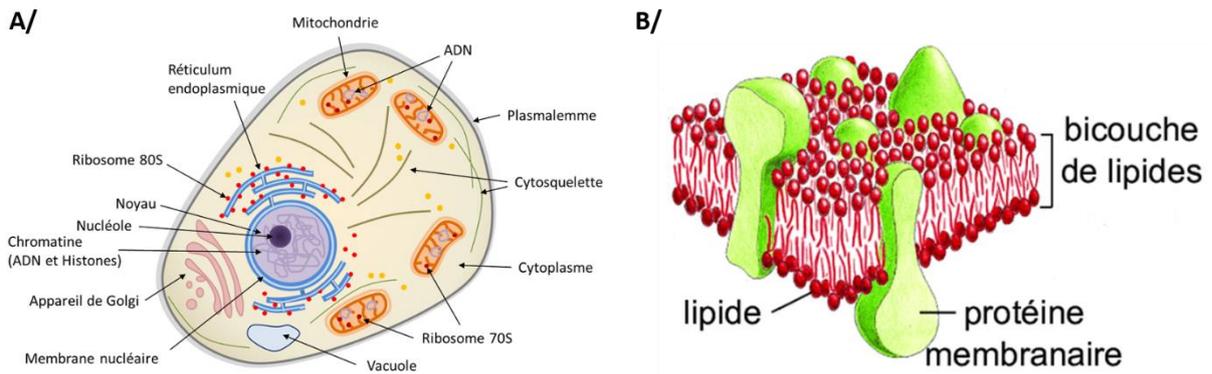


Figure I.18 : (A) Schéma d'une cellule eucaryote et de son contenu interne [79]. (B) Schéma de la structure de la membrane plasmique [80].

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche de phospholipides. Ces lipides sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils possèdent une tête hydrophile et deux queues hydrophobes. En milieu aqueux, les molécules amphiphiles s'organisent de manière à ce que la tête hydrophile soit en contact avec les molécules d'eau. La cohésion de la membrane est alors entièrement assurée par des interactions non covalentes entre les chaînes hydrophobes. Cette bicouche de lipides est donc imperméable aux molécules hydrophiles et aux ions. Les cellules peuvent réguler la concentration de diverses espèces chimiques de leur cytosol grâce aux protéines transmembranaires. Elles permettent de transporter et d'échanger des molécules entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. La membrane plasmique représente la frontière entre le contenu intracellulaire, c'est-à-dire le cytoplasme et le noyau, et la matrice extracellulaire et assure ainsi la viabilité de la cellule. Le cytoplasme désigne la région de la cellule comprise entre la membrane plasmique et le noyau. Il est constitué principalement d'eau et comprend plusieurs organites tels que l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique (Figure I.18A) et des protéines nécessaires au bon fonctionnement de la cellule.

Une cellule apparaît comme un objet biologique complexe. Afin de prédire le comportement d'une cellule biologique soumise à un champ électrique, elle doit donc être modélisée avec un modèle plus simple afin de réduire le nombre de paramètres diélectriques associés à chaque composant de la cellule. La cellule est fréquemment subdivisée en compartiments que l'on considère comme étant homogène : la membrane plasmique, le cytoplasme, l'enveloppe nucléaire et le nucléoplasme.

La cellule dans un milieu de suspension peut être modélisée électriquement sous la forme d'un circuit électrique simple (Figure I.19A). Le milieu de suspension avec ses propres caractéristiques électriques, modélisées par une capacité C_m et une résistance R_m , est mis en parallèle avec la cellule biologique. La membrane plasmique est modélisée par une résistance R_{cm} en parallèle avec une capacité C_{cm} . Le cytoplasme est considéré comme étant un milieu homogène et conducteur avec une résistance



R_{cp} . Les caractéristiques électriques du noyau pris en compte sous la forme d'une capacité C_n et de résistance R_n sont mises en parallèle avec le cytoplasme.

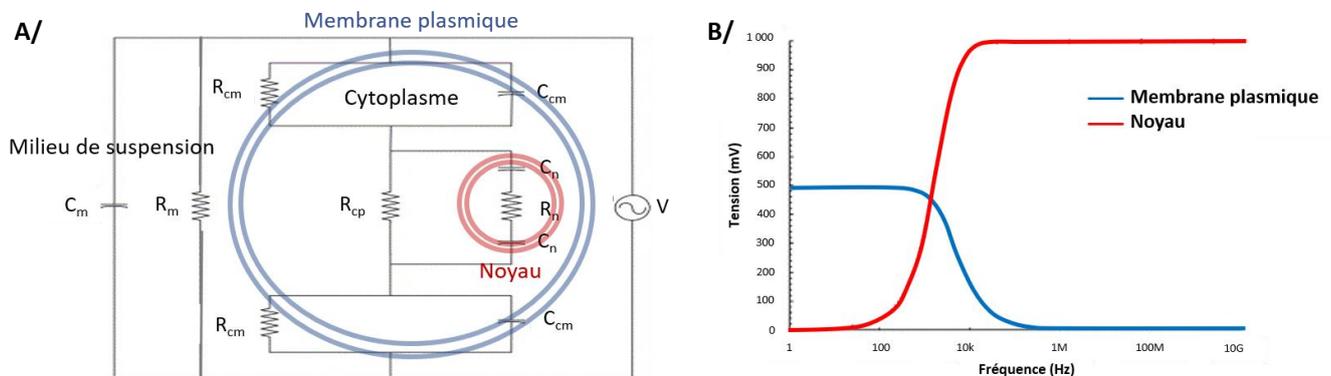


Figure I.19 : (A) Circuit électrique équivalent d'une cellule biologique dans un milieu de suspension. (B) Calcul de la différence de potentiel au travers de la membrane plasmique (bleu) et du noyau (rouge) en fonction de la fréquence pour une cellule de rayon $10 \mu\text{m}$ et le rayon de son noyau $5 \mu\text{m}$ [81].

Grâce à un logiciel de simulation circuit tel que Cadence Spectre Circuit Simulator, il est possible de modéliser la réponse électrique de la cellule biologique à partir du modèle équivalent de la Figure I.19A, en fonction de la fréquence du signal appliqué dans cette étude. Les valeurs des différents paramètres proviennent de [81] qui a aussi réalisé l'étude. Les valeurs des résistances et des capacités du cytoplasme et du nucléoplasme ont été estimées en utilisant une cellule de forme cubique de $10 \mu\text{m}$ de côté et un noyau de $5 \mu\text{m}$ de côté. Leurs résistivités sont considérées comme étant les mêmes avec une valeur de $100 \Omega \cdot \text{cm}$. La capacité spécifique de la membrane plasmique utilisée est de $1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$. Celle de l'enveloppe nucléaire est de $0,5 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$, car cette enveloppe est composée de deux membranes de phospholipides. La tension simulée d'entrée est de 1 Vpp . La réponse en fréquence de la tension à travers la membrane plasmique (en bleu) et à travers le noyau (en rouge) est présentée Figure I.19B. Le comportement électrique de la membrane cellulaire est celui d'un filtre passe-bas. En effet, à basse fréquence, c'est la résistance de la membrane qui prédomine tandis que la capacité réagit en tant que circuit ouvert. Au contraire, plus on augmente la fréquence, plus la capacité prend le pas sur la résistance en la court-circuitant. L'influence de la membrane plasmique sur la réponse électrique de la cellule diminue avec l'augmentation en fréquence du signal. Concernant le noyau, la tension à travers le noyau est très faible à basse fréquence. Tandis qu'à haute fréquence, lorsque la membrane plasmique se comporte comme un court-circuit et devient transparente, un potentiel apparaît à l'intérieur de la cellule.

Le circuit électrique équivalent permet donc en première approche, de modéliser le comportement d'une cellule biologique soumise à un champ électrique en fonction de la fréquence de ce dernier. Dans le cas de l'électro-manipulation, ce sont les propriétés diélectriques de la cellule et du milieu de suspension qui ont une importance. Comme chaque composant de la cellule possède ses



propres caractéristiques diélectriques (permittivité et conductivité), il est possible d'utiliser la diélectrophorèse pour manipuler et caractériser la molécule d'ADN [82], [83] mais aussi des protéines [84]. Le modèle multicouche (Figure I.20) dans lequel la cellule est divisée en différents compartiments aux propriétés homogènes, est fréquemment retrouvé dans la littérature et utilisé afin de prédire plus finement le comportement diélectrique de la cellule [85]–[87]. Ainsi, dans la Figure I.20A, le cœur de la cellule représente le nucléoplasme (np) et les trois couches autour sont respectivement l'enveloppe nucléaire (ne), le cytoplasme (cp) et la membrane plasmique (cm). La simplification vers le modèle monocouche se fait étape par étape, en calculant la permittivité complexe équivalente du noyau (n) de la Figure I.20B, puis en la calculant pour le contenu intracellulaire (int) de la Figure I.20C.

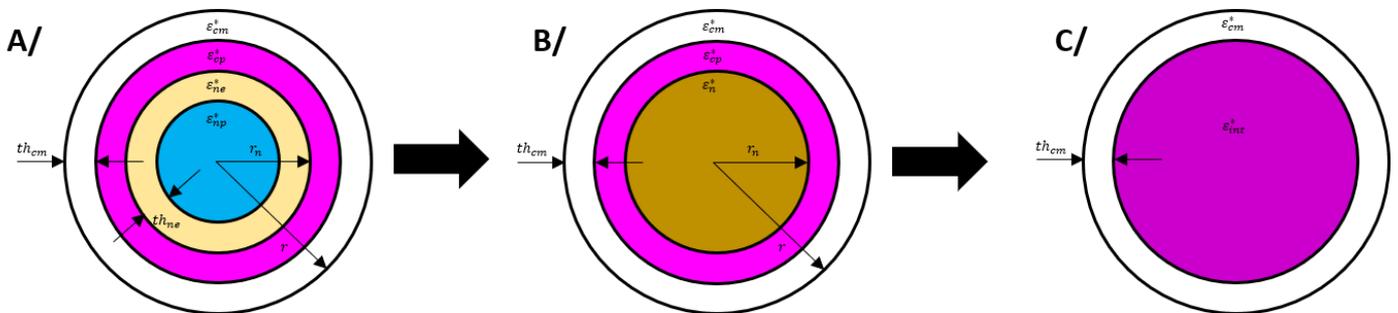


Figure I.20 : Représentation diélectrique des différents compartiments cellulaires et de leur simplification. (A) Modèle 3-couches avec $\epsilon_{cm}^*, \epsilon_{cp}^*, \epsilon_{ne}^*, \epsilon_{np}^*$ la permittivité complexe respective de la membrane plasmique, du cytoplasme, de l'enveloppe nucléaire, du nucléoplasme, $th_{cm,ne}$ l'épaisseur de la membrane plasmique et de l'enveloppe nucléaire ; r et r_n le rayon de la cellule et du noyau. (B) Modèle bicouche avec ϵ_n^* la permittivité complexe du noyau. (C) Modèle monocouche avec ϵ_{int}^* la permittivité complexe du contenu cellulaire. Adapté de [85]

La première simplification, également connue sous le nom de modèle bicouche (Figure I.20B), consiste à regrouper le nucléoplasme et l'enveloppe nucléaire afin de former un modèle diélectrique global du noyau. Sa permittivité complexe équivalente s'écrit alors de la manière suivante [85] :

$$\epsilon_n^* = \epsilon_{ne}^* \frac{\left(\frac{r_n}{r_n - th_{ne}}\right)^3 + 2 \left(\frac{\epsilon_{np}^* - \epsilon_{ne}^*}{\epsilon_{np}^* + 2\epsilon_{ne}^*}\right)}{\left(\frac{r_n}{r_n - th_{ne}}\right)^3 - \left(\frac{\epsilon_{np}^* - \epsilon_{ne}^*}{\epsilon_{np}^* + 2\epsilon_{ne}^*}\right)} \quad (I.20)$$

La deuxième simplification, appelée le modèle monocouche (Figure I.20C) consiste à réunir le noyau et le cytoplasme en une seule enveloppe afin de former le modèle global du contenu intracellulaire. Sa permittivité complexe équivalente est l'expression suivante :

$$\epsilon_{int}^* = \epsilon_{cp}^* \frac{\left(\frac{r - th_{cm}}{r_n}\right)^3 + 2 \left(\frac{\epsilon_n^* - \epsilon_{cp}^*}{\epsilon_n^* + 2\epsilon_{cp}^*}\right)}{\left(\frac{r - th_{cm}}{r_n}\right)^3 - \left(\frac{\epsilon_n^* - \epsilon_{cp}^*}{\epsilon_n^* + 2\epsilon_{cp}^*}\right)} \quad (I.21)$$



Le modèle monocouche considère le cytoplasme et son contenu comme une sphère homogène enveloppée par la membrane plasmique. Ce modèle permet de réduire les paramètres diélectriques à considérer car on ne prend en compte que la permittivité complexe du contenu intracellulaire, de la membrane cellulaire et du milieu de suspension. En effet, le facteur de Clausius-Mossotti ne dépend que de ces paramètres et de la fréquence du champ appliqué. Par la suite, c'est à partir du modèle monocouche que seront réalisées les simulations numériques du comportement en fréquence de la cellule biologique soumise à un champ électrique non uniforme.

IV.2.2. Propriétés cellulaires influençant la réponse diélectrophorétique

D'après l'équation (18), c'est le facteur de Clausius-Mossotti qui influence le signe de la force DEP selon les propriétés diélectriques de la cellule, du milieu de suspension et de la fréquence du signal. On peut alors étudier la réponse fréquentielle de $\text{Re}[f_{\text{cm}}]$ à paramètres diélectriques fixés. Par la suite, des simulations numériques ont été réalisées sur COMSOL Multiphysics à partir du modèle cellulaire monocouche, présent dans la littérature.

La Figure I.21 illustre le comportement de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence. Le graphique de la Figure I.21A a été représenté grâce au logiciel myDEP [88]. Les paramètres diélectriques et la géométrie de la cellule sont reportés dans le Tableau I.1. L'épaisseur de la membrane plasmique a été multipliée par 100 pour éviter les problèmes de maillage dans le logiciel de simulation. En conséquence, la permittivité relative et la conductivité de la membrane ont été adaptées proportionnellement afin de conserver le comportement diélectrique de la cellule.

On peut remarquer une alternance entre le comportement nDEP (force DEP répulsive) et le comportement pDEP (force DEP attractive). A basse fréquence (inférieure à 400 kHz) et à très haute fréquence (supérieure à 150 MHz), $\text{Re}[f_{\text{cm}}]$ est négatif alors que dans la gamme de fréquence intermédiaire (entre 500 kHz et 100 MHz), $\text{Re}[f_{\text{cm}}]$ est positif. Deux fréquences de transition apparaissent lorsque la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti s'annule. A ces fréquences spécifiques, la cellule n'est plus soumise à la force DEP. f_{x01} est la fréquence de transition pour les basses fréquences et f_{x02} est la fréquence de transition pour les très hautes fréquences.



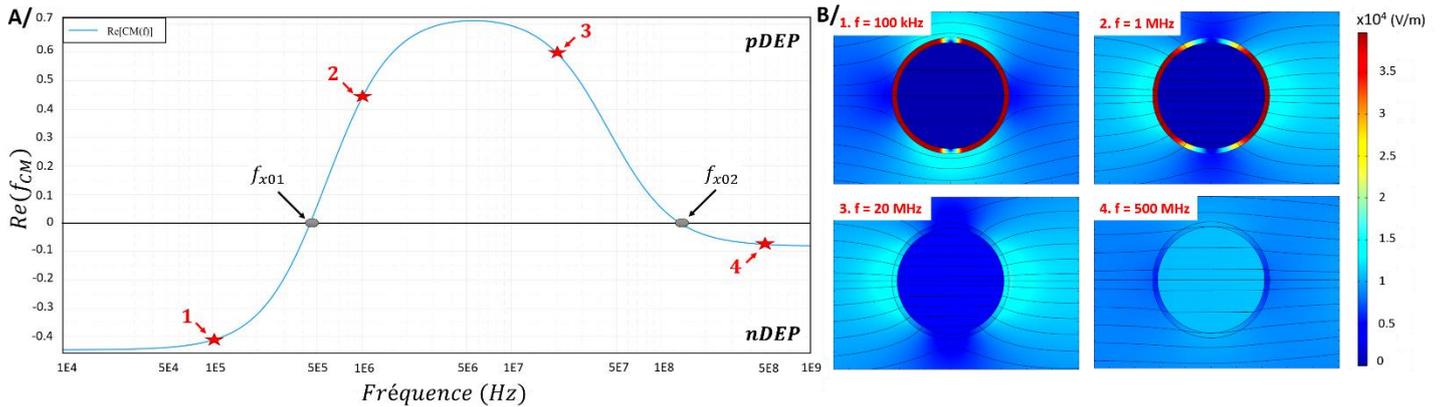


Figure I.21 : Simulation numérique du comportement diélectrique d'une cellule en fonction de la fréquence. Le modèle utilisé pour la cellule biologique est le modèle monocouche. (A) Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Les étoiles rouges correspondent aux fréquences choisies pour la simulation COMSOL. (B) Simulation COMSOL du modèle monocouche à différentes fréquences (100 kHz ; 1 MHz ; 20 MHz ; 500 MHz). L'échelle de couleur correspond à l'intensité du champ électrique (V/m) et les lignes noires sont les lignes de courant électriques.

Tableau I.1 : Valeurs des différents paramètres diélectriques et géométriques utilisés dans les simulations de la Figure I.21

| Nom du paramètre | Valeur |
|---|--------------------------|
| Rayon de la particule (r) | 11,5 μm |
| Epaisseur de la membrane (th_{cm}) | 700 nm |
| Permittivité relative du contenu intracellulaire (ϵ_{int}) | 50 |
| Conductivité du contenu intracellulaire (σ_{int}) | 0,5 S/m |
| Permittivité relative de la membrane plasmique (ϵ_{cm}) | 100 |
| Conductivité de la membrane plasmique (σ_{cm}) | $1,43 \cdot 10^{-4}$ S/m |
| Permittivité relative du milieu de suspension (ϵ_m) | 78 |
| Conductivité du milieu de suspension (σ_m) | 0,02 S/m |

En complément de la représentation de $Re[f_{cm}]$, la cellule biologique a été modélisée baignant dans son milieu de suspension de faible conductivité et en présence du champ électrique (Figure I.21B). La simulation a été réalisée avec le logiciel COMSOL Multiphysics® à l'aide du module AC/DC electric current. Les mêmes paramètres que ceux du Tableau I.1 ont été utilisés dans la modélisation afin que les résultats concordent avec la courbe de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Comme évoqué précédemment, la cellule est considérée au travers du modèle monocouche avec au centre, le contenu intracellulaire et avec la membrane plasmique en tant qu'enveloppe. Les deux électrodes sont à une distance de 50 μm du centre de la cellule. La tension appliquée est de 1 Vpp et les couleurs correspondent à l'intensité du champ électrique (en V/m) qui vont du bleu foncé où l'intensité du champ est quasi-nulle, au rouge foncé où l'intensité du champ est maximale. Les fréquences simulées ont été



choisies de sorte qu'on puisse étudier la réponse diélectrique de la cellule en basse fréquence (100 kHz et 1 MHz) avec le comportement nDEP et pDEP, de même en haute fréquence (20 MHz et 500 MHz).

Tout d'abord, au niveau du champ électrique, les lignes de courant (lignes noires sur la Figure I.21B) semblent contourner la cellule lorsque celle-ci présente un comportement nDEP. Alors qu'en pDEP, les lignes de courant sont attirées dans la cellule. Cela confirme bien la représentation du champ électrique de la Figure I.13 lorsque le moment dipolaire change d'orientation. Une étude plus complète sera menée par la suite à partir d'une sphère homogène. D'après la simulation, à basse fréquence, le champ électrique ne pénètre pas l'intérieur de la cellule alors que le maximum de l'intensité du champ se situe dans la membrane plasmique. Cette-dernière agit comme un isolant et l'onde électromagnétique devient plus sensible aux propriétés physiques et diélectriques de la membrane cellulaire. Plus la fréquence du signal augmente (à partir de 20 MHz), plus le champ électrique pénètre dans la cellule et sonde le contenu cellulaire. A plus haute fréquence, la membrane plasmique se retrouve court-circuitée et devient transparente devant l'onde électromagnétique qui peut alors interagir avec l'intérieur de la cellule. Cette deuxième approche numérique, en complément de la Figure I.19B, permet de mieux se rendre compte de l'évolution fréquentielle du comportement diélectrique de la cellule en fonction de ses propriétés et de pouvoir faire le lien avec la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Afin d'aller plus loin sur l'étude concernant l'influence de la membrane plasmique et du contenu intracellulaire, nous allons procéder à une analyse paramétrique du facteur de Clausius-Mossotti dans un premier temps en fonction des paramètres de la membrane plasmique (sa permittivité relative, sa conductivité et son épaisseur), puis en fonction des paramètres du contenu cellulaire (sa permittivité relative et sa conductivité). La taille de la cellule ainsi que les propriétés du milieu de suspension seront fixes.

La Figure I.22 décrit l'évolution du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence du signal lorsque les paramètres diélectriques (permittivité relative et conductivité) et l'épaisseur de la membrane plasmique varient. Dans un premier temps, nous faisons varier la valeur de la permittivité relative de la membrane cellulaire ϵ_{cm} entre $90\epsilon_0$ et $120\epsilon_0$ F.m⁻¹. On peut observer de fortes variations de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti vers les plus basses fréquences. Lorsque la permittivité relative diminue, on constate une augmentation de la fréquence de transition f_{x01} . On peut donc en déduire que la première fréquence de transition est inversement proportionnelle à la permittivité de la membrane. Quant à sa conductivité qui varie entre 1.10^{-4} et 4.10^{-4} S.m⁻¹, les variations de la fréquence de transition f_{x01} sont très faibles. A très basse fréquence (inférieure à 200 kHz), l'onde électromagnétique semble plus sensible aux variations de la conductivité de la membrane cellulaire. Le dernier paramètre concernant la membrane plasmique est son épaisseur qui varie entre 400 et 700 nm. De même que pour les propriétés diélectriques, les variations de th_{cm} impactent plus les basses



fréquences ainsi que la première fréquence de transition. Ce qui avait été observé précédemment avec la Figure I.21B concernant la pénétration du champ électrique dans la cellule, est confirmé par l'étude paramétrique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction des paramètres de la membrane plasmique. Ces derniers : permittivité relative, conductivité et épaisseur, influencent la réponse diélectrique de la cellule biologique dans le régime des basses fréquences.

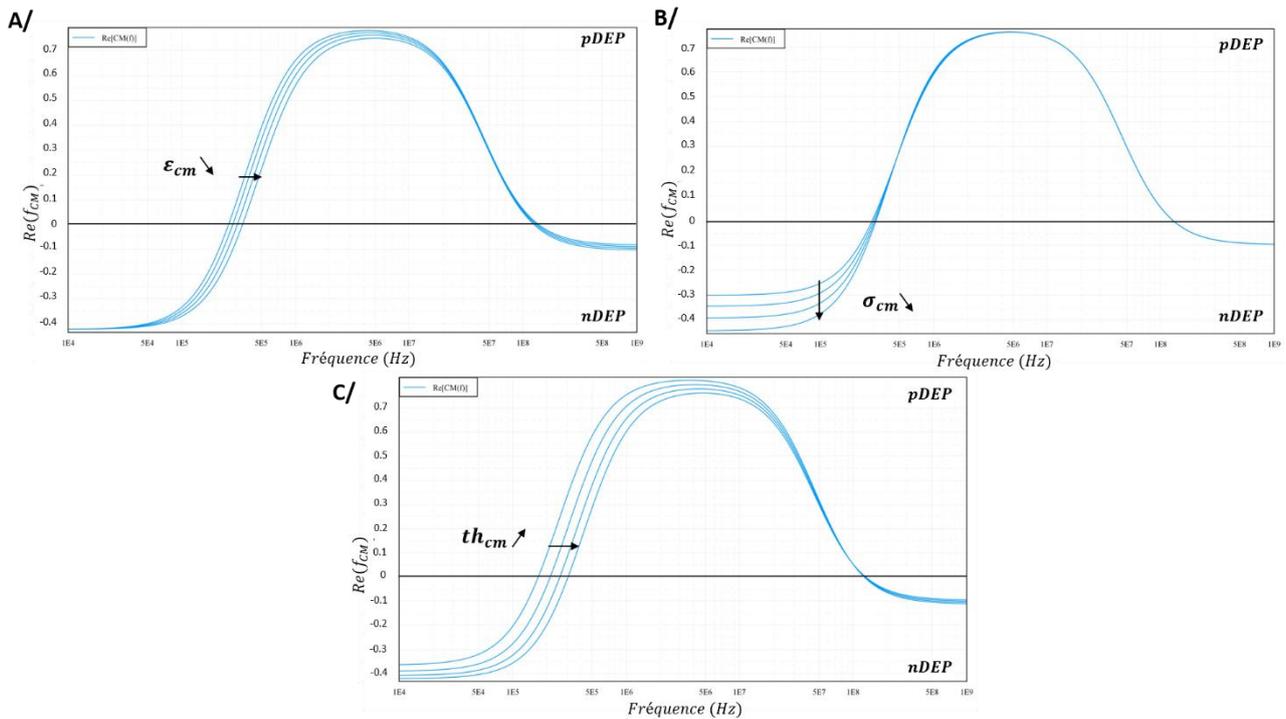


Figure I.22 : Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti avec le logiciel myDEP pour évaluer l'influence des paramètres de la membrane cellulaire. (A) Effet de la variation de la permittivité relative de la membrane plasmique ($\epsilon_{cm} = 90\epsilon_0$; $100\epsilon_0$; $110\epsilon_0$; $120\epsilon_0$ F.m⁻¹) (B) Effet de la variation de la conductivité de la membrane plasmique ($\sigma_{cm} = 1.10^{-4}$; 2.10^{-4} ; 3.10^{-4} ; 4.10^{-4} S.m⁻¹) (C) Effet de la variation de l'épaisseur de la membrane plasmique ($th_{cm} = 400$; 500 ; 600 ; 700 nm)

La Figure I.23 décrit l'évolution du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence du signal lorsque les paramètres diélectriques (permittivité relative et conductivité) du contenu intracellulaire varient. Dans un premier temps, nous faisons varier la valeur de la permittivité relative du contenu interne ϵ_{int} entre $50\epsilon_0$ et $80\epsilon_0$ F.m⁻¹. On peut observer de fortes variations de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti dans la gamme des hautes fréquences, c'est-à-dire à partir de 50 MHz. Lorsque la permittivité relative augmente, on constate une augmentation de la fréquence de transition f_{x02} , cependant, on n'observe aucune variation dans le régime des basses fréquences. On peut remarquer que lorsque $\epsilon_{int} > \epsilon_m$, on n'observe aucune fréquence de transition dans les hautes fréquences. Quant à la conductivité du contenu intracellulaire qui varie entre 0,3 et 0,6 S.m⁻¹, les variations de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti s'opèrent dans le régime des moyennes fréquences, à partir de 600kHz.



Cela impacte la valeur de la fréquence de transition f_{x02} . Dans le régime des hautes fréquences, l'onde électromagnétique est plus sensible aux changements des propriétés diélectriques du contenu intracellulaire. De même, ce qui avait été observé précédemment avec la Figure I.21B, est confirmé par l'étude paramétrique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction des paramètres de du contenu interne de la cellule. Ces derniers influencent la réponse diélectrique de la cellule biologique dans le régime des hautes et moyennes fréquences.

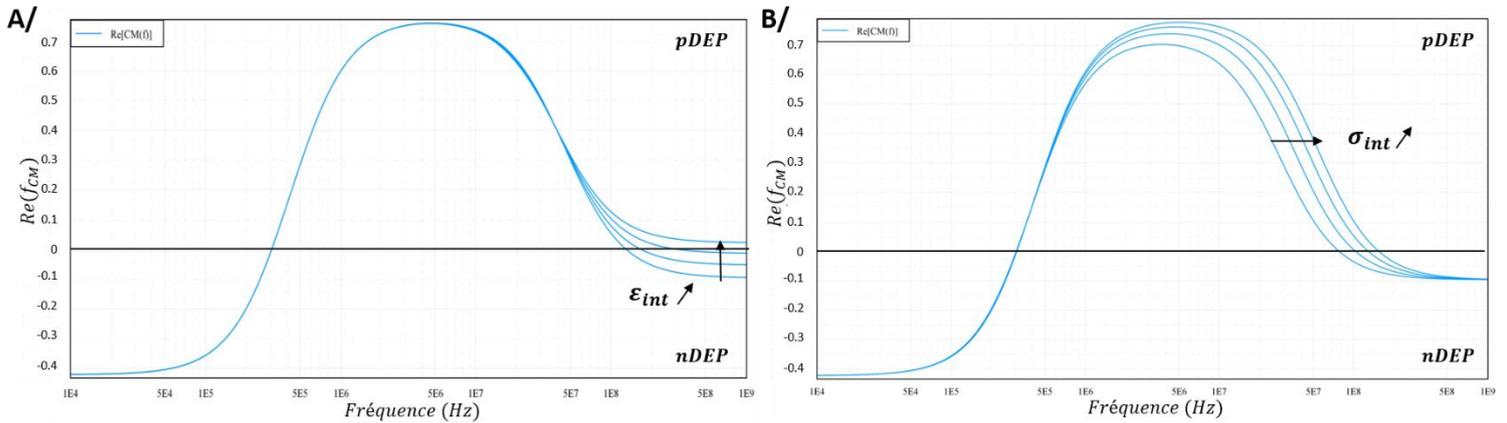


Figure I.23 : Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti avec le logiciel myDEP pour évaluer l'influence des paramètres du contenu intracellulaire. (A) Effet de la variation de la permittivité relative du contenu interne ($\epsilon_{int} = 50\epsilon_0 ; 60\epsilon_0 ; 70\epsilon_0 ; 80\epsilon_0 \text{ F.m}^{-1}$) (B) Effet de la variation de la conductivité du contenu interne ($\sigma_{int} = 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 \text{ S.m}^{-1}$)

Grâce à l'étude paramétrique, une approximation de la première fréquence de transition f_{x01} peut être exprimée telle que [72] :

$$f_{x01} = \sigma_m \frac{th_{cm}}{\sqrt{2} \pi r \epsilon_{cm}} \quad (I.22)$$

La fréquence de transition f_{x01} dépend donc principalement des paramètres diélectriques de la membrane plasmique mais aussi des propriétés géométriques de la cellule. Par conséquent, la fréquence de transition à basse fréquence est plus sensible à la forme de la cellule, à sa morphologie ainsi qu'aux propriétés de la membrane plasmique. La DEP à basse fréquence a été largement et couramment utilisée pour séparer des cellules ou des particules de polystyrène de différentes tailles [89], [90] et pour séparer des cellules viables et non-viables [91]. Des exemples d'applications de la DEP basse fréquence seront explicités par la suite.

La deuxième fréquence de transition f_{x02} peut être approximée de la manière suivante [92] :

$$f_{x02} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\sigma_{int}^2 - \sigma_{int}\sigma_m - 2\sigma_m^2}{2\epsilon_m^2 - \epsilon_{int}\epsilon_m - \epsilon_m^2}} \quad (I.23)$$



Or, avec le postulat que la conductivité du milieu de suspension est nettement plus faible que la conductivité du contenu cellulaire interne ($\sigma_m = 20$ mS/m), l'expression de la fréquence de transition f_{x02} peut être simplifiée :

$$f_{x02} = \frac{\sigma_{int}}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{2\varepsilon_m^2 - \varepsilon_{int}\varepsilon_m - \varepsilon_m^2}} \quad (I.24)$$

La fréquence de transition dépend des paramètres diélectriques du contenu intracellulaire. Ainsi, les cellules peuvent être électro-manipulées individuellement par les forces DEP de déplacement en fonction de leurs propriétés diélectriques internes. Ainsi, si nous considérons deux cellules de la même lignée cellulaire mais possédant des caractéristiques physiologiques différentes (telles que le phénotype souche), elles présenteront des propriétés diélectriques internes différentes et donc, deux fréquences de transition f_{x02} distinctes.

Nous avons précédemment démontré dans [93] que la gamme des basses fréquences peut ne pas être assez sélective lorsque les cellules expriment principalement des changements du contenu cytoplasmique. Cela a été étudié dans le cas particulier du glioblastome où l'on veut distinguer les cellules indifférenciées des cellules différenciées. La DEP haute fréquence apparaît alors comme une approche pertinente pour discriminer les cellules souches des cellules différenciées grâce à sa capacité à sonder le contenu intracellulaire. Dans le cadre de mes travaux de thèse, l'enjeu est d'exploiter les différences biologiques internes des cellules grâce à la DEP haute fréquence afin d'identifier et d'isoler les cellules présentant un phénotype souche. Le chapitre II de ce manuscrit présentera le dispositif microfluidique permettant d'identifier la signature DEP des cellules d'une même population tandis que le chapitre III exploitera cette signature grâce à un cytomètre DEP permettant d'isoler les cellules selon leurs caractéristiques internes.

IV.2.3. Exemples d'applications de la diélectrophorèse en basse fréquence

A basse fréquence, l'onde électromagnétique est sensible à la forme, à la morphologie de la cellule et à sa taille ainsi qu'aux propriétés de la membrane plasmique. C'est pourquoi la DEP basse fréquence est largement utilisée pour manipuler les cellules biologiques le plus souvent pour les séparer selon leur taille [89], [94]–[96] ou pour trier des cellules selon leur viabilité [90], [97]. Dans ce paragraphe, nous prendrons l'exemple d'un microsystème microfluidique qui permet d'isoler des cellules tumorales circulantes dans un échantillon sanguin [89].



Dans le domaine des basses fréquences, l'isolement des cellules tumorales circulantes dans le sang fait l'objet de recherches intensives. En effet, les chercheurs tirent profit de la différence de tailles entre les cellules cancéreuses et les cellules qui composent le sang. D'après le tableau de la Figure I.24A, on constate que les cellules du cancer du sein MDA 231 se démarquent par un rayon de plus grande taille comparé aux rayons des érythrocytes, des lymphocytes, des granulocytes et des monocytes. Cela résulte en une fréquence de transition f_{x01} beaucoup plus faible avoisinant les 14 kHz, alors que celle des cellules sanguines est au-dessus de 41 kHz.

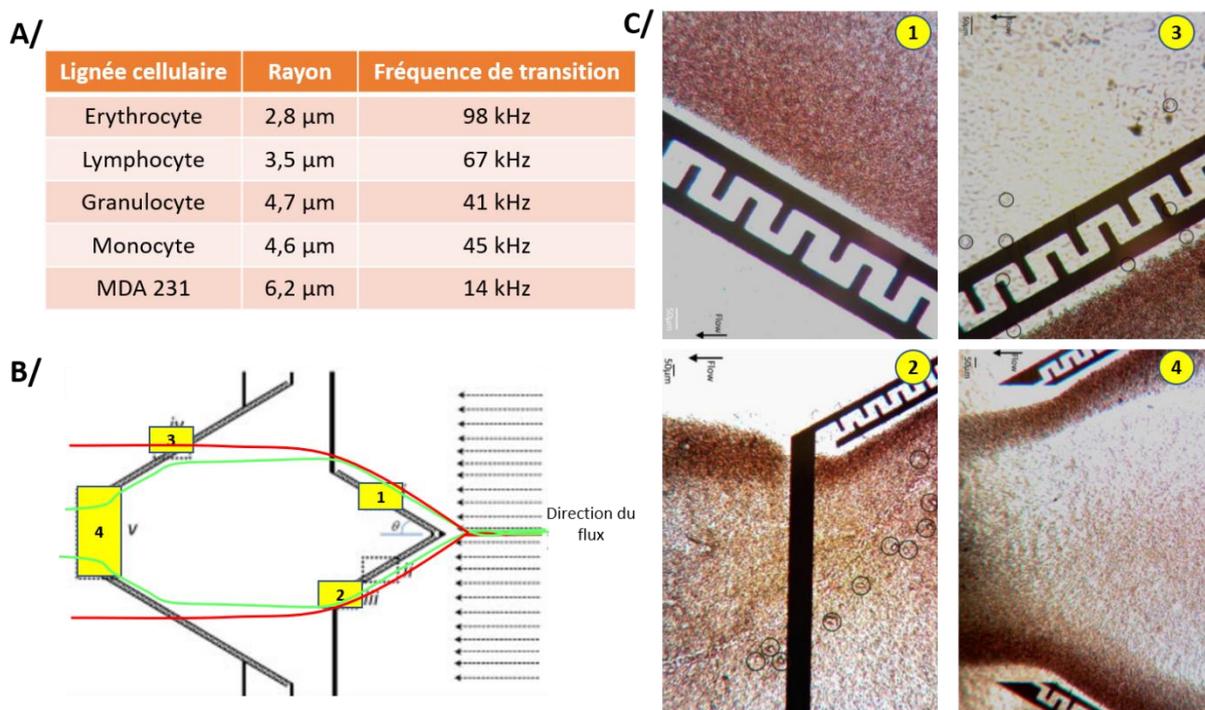


Figure I.24 : (A) Dimensions et propriétés des cellules sélectionnées ; (B) Schéma du microsysteme DEP composé de deux paires d'électrodes. La ligne rouge représente la trajectoire des cellules tumorales circulantes, ici les MDA 231 et la ligne verte représente la trajectoire des cellules composant le sang (érythrocytes, lymphocytes, granulocytes et monocytes). Les rectangles jaunes numérotés représentent les emplacements des images microscopiques ; (C) Images microscopiques du microsysteme DEP. Les cellules entourées sont les cellules tumorales circulantes [89].

Le système de tri basé sur la DEP basse fréquence décrit sur la Figure I.24B est composé de deux paires d'électrodes permettant dans un premier temps de séparer la suspension de cellules en deux et de les déplacer vers les parois du canal microfluidique ; et dans un deuxième temps, d'effectuer le tri cellulaire. En effet, la première paire d'électrodes est polarisée par un signal AC de fréquence 10 kHz, ce qui place les cellules sanguines ainsi que les cellules tumorales MDA 231 dans un comportement nDEP. L'ensemble des cellules sera donc repoussé par les électrodes comme on peut l'observer sur les images n°1 et n°2 de la Figure I.24C. En revanche, la deuxième paire d'électrodes est polarisée par un signal AC de fréquence 35 kHz, de sorte que les cellules sanguines réagissent fortement en nDEP mais



que les cellules cancéreuses réagissent faiblement en pDEP. Tandis que les cellules du sang seront repoussées vers le centre du canal (image n°4), les MDA 231 seront faiblement attirées par les électrodes. Or, comme le système de tri s'effectue à flux constant, la force de traînée entrainera les cellules cancéreuses à traverser les électrodes (image n°3). De ce fait, on peut isoler les cellules tumorales circulantes. Le débit du flux de cellules est réglé à 0,1 mL/h au maximum et plusieurs tests avec des concentrations de MDA 231 dans le sang sont expérimentés : une cellule cancéreuse pour 10^4 ou 10^5 ou 10^6 cellules sanguines. L'efficacité de ce système de tri cellulaire se situe entre 95% et 98%.

La DEP basse fréquence, du fait de sa sensibilité, est largement utilisée lorsque les cellules cibles montrent des rayons de tailles différentes et suffisamment significatives pour être séparées ou isolées. Peu d'études ont été menées sur la caractérisation diélectrique des cellules souches qui se sont notamment axées autour de l'obtention de la fréquence de transition f_{x01} [98]–[100]. Cependant, il semblerait que la gamme des ultra hautes fréquences concernant l'identification des cellules souches par rapport à leurs progéniteurs apparaisse plus pertinente de par sa sensibilité au contenu interne (présence de certaines protéines, rapport nucléo-cytoplasmique, organites...) de la cellule biologique. Nous avons pu exploiter la fréquence de transition f_{x02} afin de discriminer les cellules cancéreuses souches des cellules différenciées du médulloblastome (tumeur du cerveau infantile) [101], [102] et ainsi de faire de la signature DEP-UHF un facteur approprié pour la distinction des CSCs. C'est pourquoi durant les travaux de thèse, nous utiliserons cette gamme de fréquence pour identifier et isoler les cellules cancéreuses présentant un phénotype souche.

IV.3. Influence des cellules biologiques comme objets diélectriques sur le champ électrique

L'objet de cette partie est l'étude de la déformation des lignes de champ électrique lorsque l'on place une cellule biologique dans un champ électrique alternatif. En effet, la Figure I.13 montre la distorsion du champ électrique suivant l'état de polarisation d'une particule sphérique immergée dans un milieu de suspension. Or, le facteur de Clausius-Mossotti décrit cet état de polarisation. Le logiciel COMSOL Multiphysics est un outil performant pour prédire en fonction de la fréquence les déformations induites sur ces lignes par la présence d'une cellule (Figure I.21B). Nous observerons les perturbations du champ électrique localisées à l'interface entre une particule sphérique et le milieu de suspension. Dans un deuxième temps, nous proposerons une nouvelle perspective d'interprétation du facteur de Clausius-Mossotti.



IV.3.1. Etude de la réflexion du champ électrique à la surface d'un dioptré aux propriétés différentes : application à une sphère homogène

Comme l'illustre la Figure I.13, en présence d'une particule diélectrique, les lignes de champ électrique sont soit attirées dans la particule lorsque celle-ci réagit en pDEP, soit repoussées et contournent la particule lorsque celle-ci a un comportement nDEP. Il serait intéressant de constater la déformation du champ électrique à la fréquence de transition, c'est-à-dire lorsque la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est nulle. Cette fréquence de transition correspond à la fréquence où la force DEP s'annule ainsi que le moment dipolaire induit. Pour cela, nous prendrons le cas d'une particule sphérique homogène de rayon $11,5 \mu\text{m}$, de conductivité $0,5 \text{ S/m}$ et de permittivité relative 50 . Quant au milieu de suspension, sa conductivité est de 20 mS/m et sa permittivité relative est de 78 . La tension aux bornes des électrodes est de 1 Vpp . L'évolution de la partie réelle de son facteur de Clausius-Mossotti est représentée Figure I.25A grâce au logiciel myDEP. Lorsqu'on considère une particule homogène, il n'y a qu'une seule fréquence de transition lorsque celle-ci existe : dans notre cas $f_x = 120 \text{ MHz}$. Plusieurs fréquences ont été sélectionnées pour être simulées avec COMSOL Multiphysics (1 MHz , 120 MHz , 150 MHz et 1 GHz) en présence de la particule et en absence de particule (Figure I.25B). Notons qu'en absence de particule, le champ électrique reste le même quelle que soit la fréquence de celui-ci.

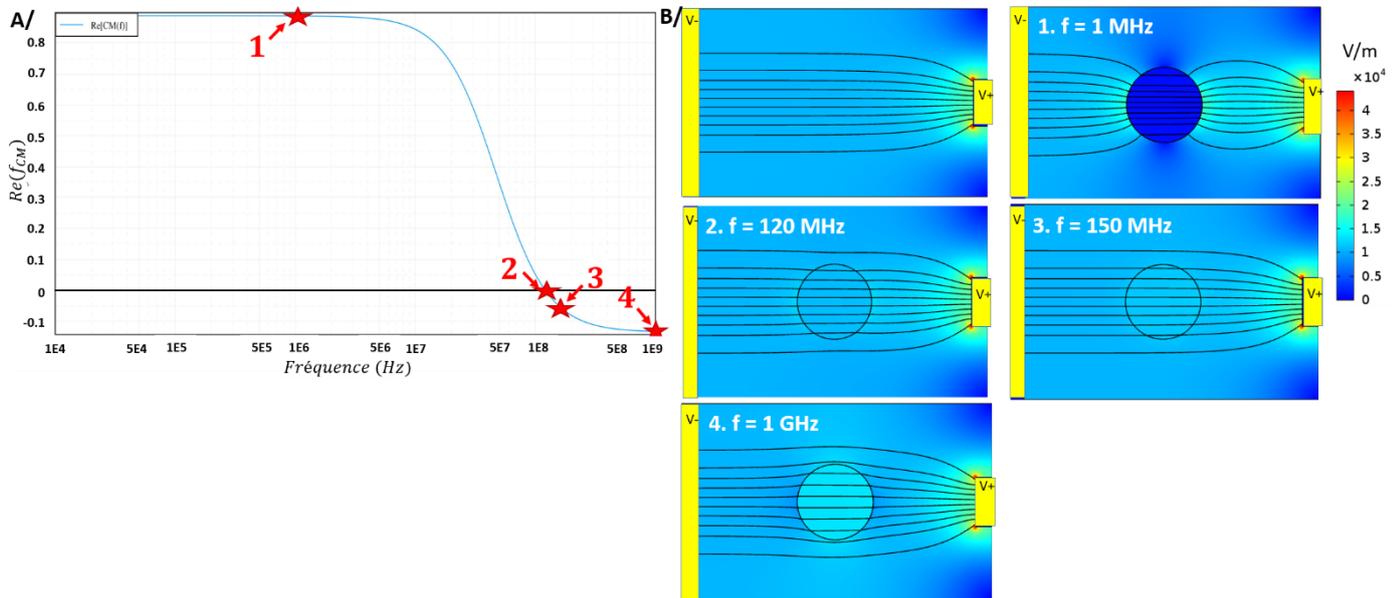


Figure I.25 : Simulation numérique de l'influence d'une particule sphérique homogène sur le champ électrique. (A) Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Les étoiles rouges correspondent aux fréquences choisies pour la simulation COMSOL. (B) Simulation COMSOL en l'absence de particule (en haut à gauche) et en présence de particule à différentes fréquences (1 MHz ; 120 MHz ; 150 MHz ; 1 GHz). L'échelle de couleur correspond à l'intensité du champ électrique (V/m) et les lignes noires sont les lignes du champ électrique.



On peut remarquer que la présence de la particule perturbe les lignes de champ électrique. Lorsque la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est positive (cas pour $f = 1\text{MHz}$), les lignes de champ sont attirées dans la particule car elle est plus polarisée que le milieu de suspension. Au contraire, lorsque la partie réelle est négative (cas pour $f = 1\text{GHz}$), les lignes de champ contournent la particule car elle est moins polarisée que le milieu de suspension. Étonnamment, à la fréquence de transition ($f = 120\text{MHz}$), les lignes de champ restent déformées et sont sensiblement attirées par la particule. Cependant, il est possible d'obtenir une fréquence à laquelle la particule devient transparente devant le champ électrique. En effet, la forme des lignes de champ semble être la même en présence de la particule à une fréquence de 150MHz et en absence de particule. Comme dit précédemment, cette fréquence de 150MHz ne correspond pas à la fréquence de transition de la particule. Nous allons donc déterminer à quoi cette fréquence peut correspondre.

Nous allons analyser principalement la norme du champ électrique à l'interface entre la particule et le milieu de suspension. Pour cela, nous nous appuyerons sur les simulations COMSOL afin d'étudier les perturbations du champ électrique. Les données concernant la norme du champ électrique sont extraites sur la ligne rouge dans la Figure I.26. Notons qu'il est possible de faire la même chose sur différentes hauteurs de la particule et que le champ électrique présentera la même forme. Cependant, son intensité sera plus faible.

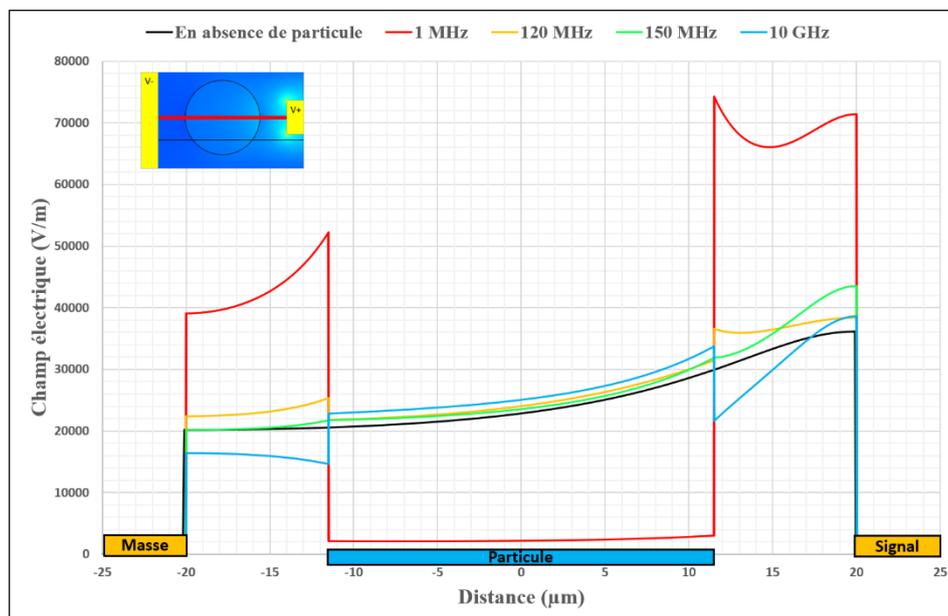


Figure I.26 : Perturbation du champ électrique en présence d'une particule pour différentes valeurs de la fréquence du signal



Sur la Figure I.26 qui présente la variation d'intensité du champ électrique en fonction de la fréquence du signal, les différentes situations introduites à la Figure I.25 sont représentées. On remarque qu'en plus de la forme des lignes de champ, c'est son intensité qui est modifiée lorsqu'un objet diélectrique est soumis au champ électrique. De plus, le champ électrique est discontinu, présentant des sauts d'intensité, lorsqu'il se propage dans le milieu de suspension et dans la particule. Il semblerait qu'en pDEP, le champ électrique soit plus fort à l'extérieur de la particule qu'à l'intérieur. En revanche, en nDEP, le champ électrique est moins fort à l'extérieur qu'à l'intérieur de la particule. On peut aussi observer qu'à la fréquence de transition, le champ est discontinu à l'interface milieu/particule. A la fréquence de 150MHz, le champ électrique est au contraire continu et retrouve une intensité proche de celle en l'absence de particule.

Dans la littérature, il est souvent fait mention que le moment dipolaire modifie les lignes de champ, mais peu d'études s'intéressent à la perturbation de l'intensité du champ électrique en présence de particule diélectrique. Cependant, dans [72] R. Pethig fait le constat que ces changements sont dus à la polarisation de la particule et aux charges de surface induites. Sur la Figure I.27A, le comportement du champ électrique en fonction de l'état de polarisation de la particule dans son milieu de suspension est prédit théoriquement. On y voit que le champ externe est plus important en pDEP ; alors qu'en nDEP c'est le champ interne qui est plus important.

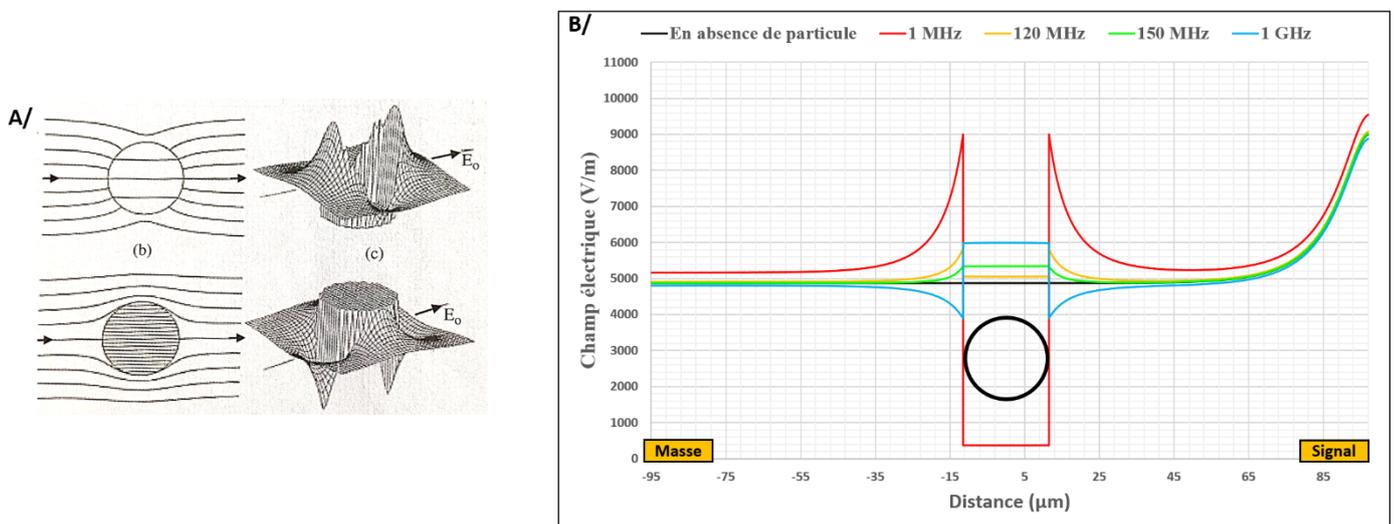


Figure I.27 : (A) Les modèles de champ montrent comment le champ externe est déformé à la surface d'une particule qui est plus polarisable que le milieu (figure du haut), pour donner un champ interne inférieur au champ externe. Pour une particule moins polarisable que le milieu (figure du bas), le champ externe est déformé autour de la particule et le champ interne est plus grand que le champ externe [72]. (B) Perturbation du champ électrique en présence d'une particule pour différentes valeurs de la fréquence du signal, lorsque les électrodes sont à une distance $x \gg$ rayon de la particule.



Le graphique de la Figure I.27B semble corroborer les modèles schématisques du comportement du champ externe et interne de la particule. On peut noter que les perturbations électriques dues à la présence de la particule dans le milieu de suspension sont locales à la particule (environ jusqu'à 20µm de part et d'autre). Cependant, il y a peu d'explications concernant l'influence d'une particule diélectrique sur le champ électrique à la fréquence de transition et à la fréquence de continuité. Par la suite, nous allons donc nous focaliser sur la discontinuité du champ électrique à l'interface entre la particule et le milieu de suspension.

Lorsqu'une onde plane progressive harmonique se propage dans des milieux inhomogènes, on observe alors une discontinuité de la norme du champ électrique et magnétique. La Figure I.28 montre le schéma du plan d'incidence de l'onde électromagnétique incidente sur la surface du dioptré. Les conditions aux limites imposent que la composante tangentielle du champ électrique et la composante normale du champ magnétique soient continues. Le milieu 1 est le milieu de suspension avec ses propriétés diélectriques ϵ_m et σ_m et d'indice de réfraction n_m . Le milieu 2 est la particule avec ses propriétés diélectriques ϵ_p et σ_p et d'indice de réfraction n_p . Deux phénomènes se produisent à l'interface des deux milieux : après la traversée du dioptré, l'onde transmise \vec{E}_t dans le milieu 2 est déviée par le principe de réfraction ; une partie de l'onde incidente \vec{E}_i est renvoyée dans le milieu 1 par réflexion.

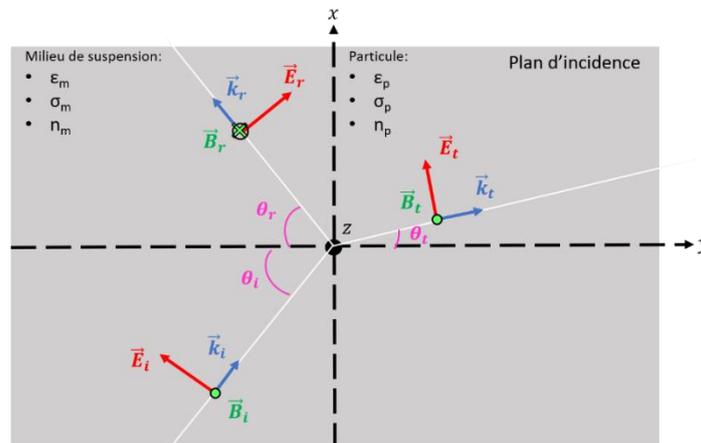


Figure I.28 : Réflexion et transmission d'une onde électromagnétique par un dioptré séparant le milieu de suspension et une particule, dans le cas où le champ électrique est dans le plan d'incidence.

Dans la situation de la Figure I.28, en projetant sur l'axe O_x , on obtient les relations suivantes :

$$E_{ix} = E_i \cos \theta_i ; E_{rx} = -E_r \cos \theta_r ; E_{tx} = E_t \cos \theta_t \quad (I.25)$$

Avec $E_{i,r,t}$ l'amplitude du champ électrique respectivement incident, réfléchi et transmis et $\theta_{i,r,t}$ l'angle non orienté que fait le vecteur d'onde avec le plan d'incidence. Les relations de continuité sont donc les suivantes :



$$E_i \cos \theta_i - E_r \cos \theta_r = E_t \cos \theta_t ; B_i + B_r = B_t \quad (I.26)$$

Avec $B_{i,r,t}$ l'amplitude du champ magnétique respectivement incident, réfléchi et transmis. Les lois de Snell-Descartes concernant la réfraction et la réflexion sont respectées :

$$n_m \sin \theta_i = n_p \sin \theta_t ; \theta_i = \theta_r \quad (I.27)$$

Afin d'exploiter les relations de continuité (I.26), le champ magnétique peut s'exprimer en fonction du champ électrique grâce à la relation de structure :

$$\vec{B} = \frac{\vec{k} \wedge \vec{E}}{\omega} \quad (I.28)$$

Avec ω la pulsation et k le vecteur d'onde qui peut s'exprimer en fonction de l'indice de réfraction tel que : $k = \frac{\omega * n}{c}$, avec c la vitesse de la lumière.

On peut donc réinjecter dans (I.26) et on obtient :

$$\cos \theta_i (1 - E_r) = E_t \cos \theta_t ; n_m (E_i + E_r) = n_p E_t \quad (I.29)$$

On peut alors définir les coefficients de réflexion r et de transmission t comme étant les rapports entre les amplitudes réfléchies et incidentes et entre les amplitudes transmises et incidentes respectivement.

A partir de (I.29), on obtient :

$$r = \frac{n_p \cos \theta_i - n_m \cos \theta_t}{n_m \cos \theta_t + n_p \cos \theta_i} ; t = \frac{2n_m \cos \theta_i}{n_m \cos \theta_t + n_p \cos \theta_i} \quad (I.30)$$

Dans le cas d'une incidence normale, les coefficients de réflexion et de transmission sont les suivants :

$$r = \frac{n_p - n_m}{n_p + n_m} ; t = \frac{2n_m}{n_p + n_m} \quad (I.31)$$

D'après les équations de Maxwell, l'indice de réfraction est donné par :

$$n^2 = \epsilon_r - j \frac{\sigma}{\omega * \epsilon_0} \quad (I.32)$$

L'indice de réfraction d'un milieu est donc un nombre complexe qui dépend des propriétés diélectriques du milieu et de la fréquence de l'onde électromagnétique. Les coefficients de réflexion et de transmission d'une onde peuvent donc être exprimés en fonction des paramètres diélectriques de la particule et du milieu de suspension et de la fréquence du signal appliqué. Nous nous intéresserons par la suite uniquement au coefficient de réflexion, sachant que le coefficient de transmission peut être facilement retrouvé par la relation $r + t = 1$.



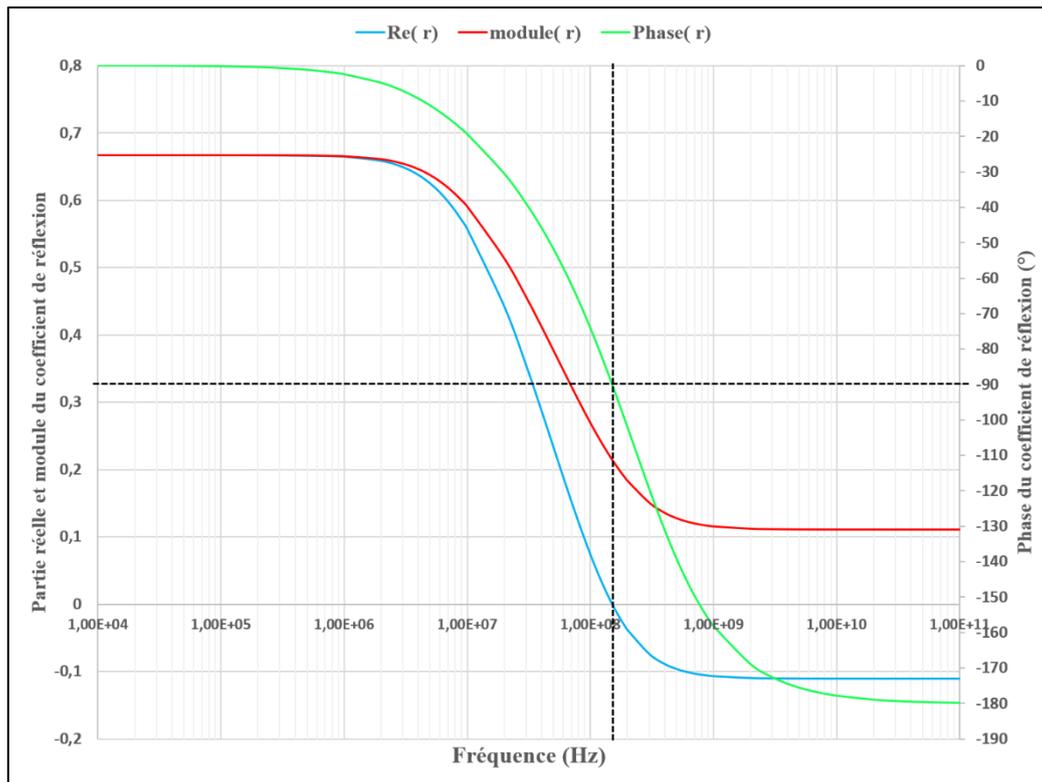


Figure I.29 : Graphique de la partie réelle, du module et de la phase du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du champ électrique.

Le coefficient de réflexion étant un nombre complexe, on peut donc l'écrire sous forme algébrique ($r = Re(r) + j * Im(r)$) ou polaire ($r = |r|e^{j\varphi(r)}$). La phase du coefficient de réflexion correspond physiquement au déphasage du champ réfléchi par rapport au champ incident. Si $|\varphi(r)| = 180^\circ$, le champ réfléchi est en opposition de phase alors que si $\varphi(r) = 0^\circ$, le champ réfléchi est en phase par rapport au champ incident. Le module du coefficient est le rapport des amplitudes des champs réfléchi et incident. Il est compris entre 0 et 1. Quant à la partie réelle et à la partie imaginaire du coefficient de réflexion, il est difficile de donner une interprétation physique. Le graphique de la Figure I.29 a été tracé avec les mêmes paramètres diélectriques que pour la Figure I.25. Lorsque la partie réelle du coefficient est négative, $|\varphi(r)| > 90^\circ$ et lorsque la partie réelle du coefficient est positive, $|\varphi(r)| < 90^\circ$. Il semblerait que le signe de la partie réelle du coefficient de réflexion nous renseigne sur sa phase. On peut remarquer que $Re(r) = 0$ à la fréquence $f = 150\text{MHz}$, ce qui correspond à la fréquence de continuité identifiée précédemment. A cette même fréquence, la phase du coefficient de réflexion est de 90° . A la fréquence de continuité, la partie réelle du coefficient de réflexion est nulle et donc le champ électrique incident qui arrive à l'interface milieu/particule est totalement transmis dans la particule. C'est pourquoi, la norme du champ électrique est continue à cette interface et la particule apparaît donc « transparente » au champ et limite les perturbations de ce dernier dues à sa présence dans le milieu de suspension.



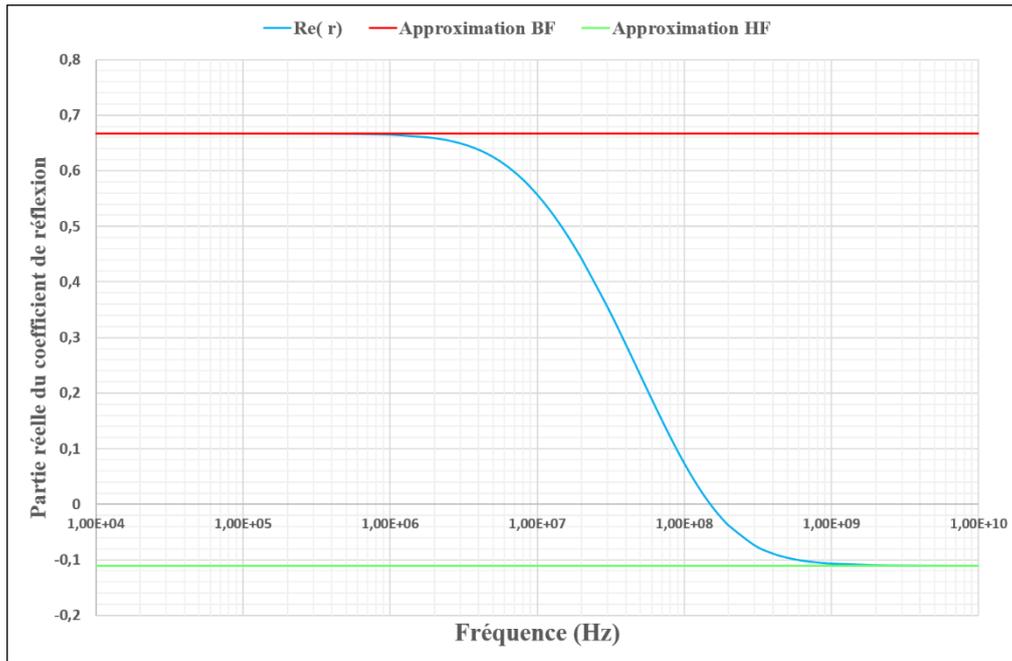


Figure I.30 : Partie réelle du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence et des approximations basse et haute fréquence.

Par la suite, nous allons nous focaliser sur la partie réelle du coefficient de réflexion. On peut approximer la valeur de $Re(r)$ aux basses et hautes fréquences :

$$Re(r)_{BF} = \frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + \sigma_m} ; Re(r)_{HF} = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + \epsilon_m} \quad (I.33)$$

Ces approximations sont confirmées avec la Figure I.30. Aux très basses fréquences (inférieures à 1MHz), la partie réelle du coefficient de réflexion ne dépend uniquement que des conductivités de la particule et du milieu de suspension. Tandis qu'aux hautes fréquences (supérieures à 1GHz), l'expression de $Re(r)$ dépend des permittivités relatives de la particule et du milieu. Aux fréquences intermédiaires, ces simplifications ne sont plus valables et il faut extraire la partie réelle de la formule (I.31).

On peut donc étudier les variations de la partie réelle du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du signal pour différentes valeurs des propriétés diélectriques du milieu de suspension et de la particule. Les valeurs pour les paramètres utilisés sont les suivantes : conductivité et permittivité du milieu de suspension $\sigma_m = 20\text{mS/m}$ & $\epsilon_m = 78\epsilon_0$ F/m ; conductivité et permittivité de la particule $\sigma_p = 0.5$ S/m & $\epsilon_p = 50\epsilon_0$ F/m ; la fréquence du signal est de 50MHz. En premier lieu, nous faisons varier la conductivité et la permittivité du milieu.



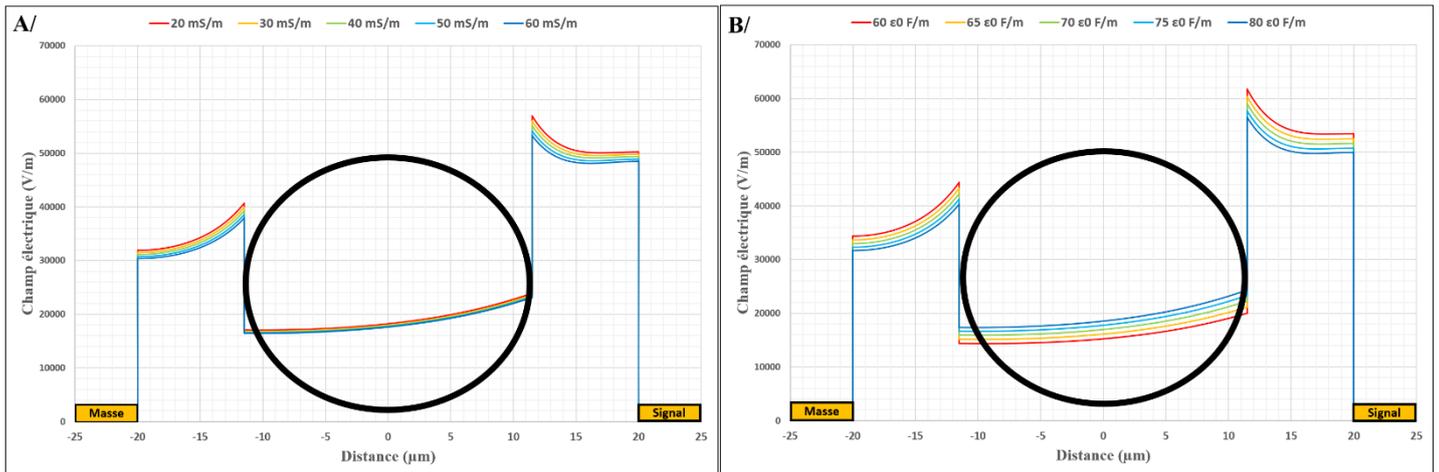


Figure I.31 : Perturbations de la norme du champ électrique pour différentes valeurs (A) de la conductivité du milieu $\sigma_m = 20, 30, 40, 50, 60 \text{ mS/m}$; (B) de la permittivité du milieu $\epsilon_m = 60, 65, 70, 75, 80\epsilon_0 \text{ F/m}$. Rappelons les paramètres diélectriques de la particule : $\sigma_p = 0.5 \text{ S/m}$, $\epsilon_p = 50\epsilon_0 \text{ F/m}$.

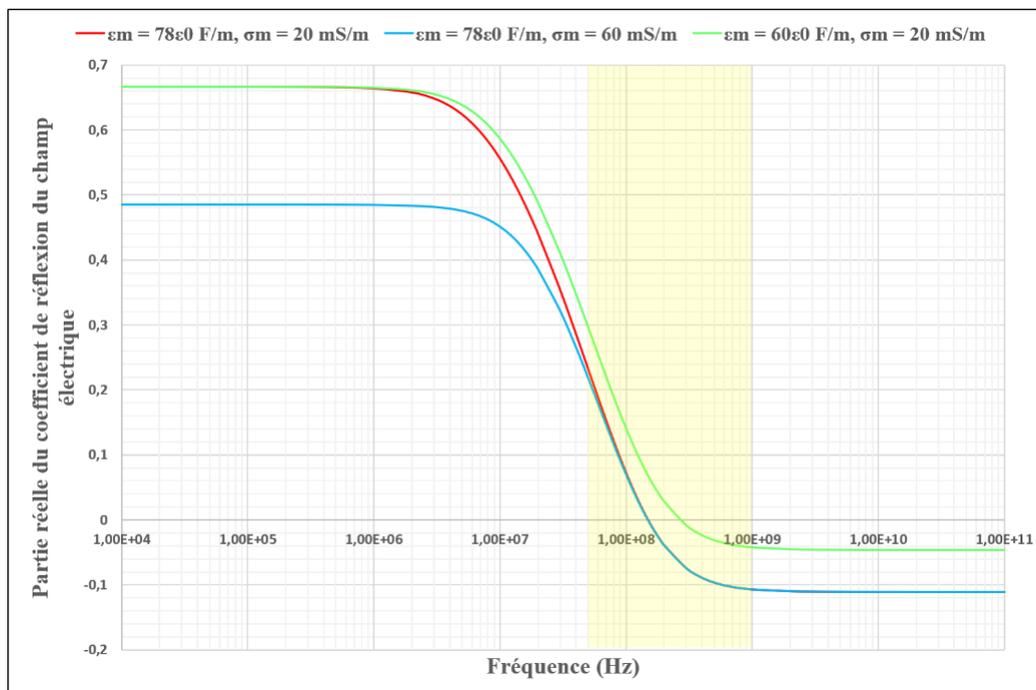


Figure I.32 : Evolution de la partie réelle du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du signal pour trois différentes configurations des paramètres diélectriques du milieu de suspension. La bande jaune désigne la gamme de fréquence exploitée dans ces travaux de thèse.

La Figure I.31 montre les perturbations de la norme du champ électrique dues à la présence de la particule dans le milieu de suspension pour différentes valeurs de conductivité et permittivité du milieu. On peut remarquer que le champ électrique externe est plus intense que le champ interne dans la particule à une fréquence $f = 50\text{MHz}$. Plus la conductivité du milieu augmente, plus les champs interne et externe diminuent. De même, plus la permittivité du milieu de suspension augmente, plus le champ interne diminue et au contraire, le champ interne augmente. La Figure I.32 décrit l'évolution du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du signal pour trois cas : $\sigma_m = 20\text{mS/}$ & $\epsilon_m = 78\epsilon_0$



F/m, $\sigma_m = 60\text{mS/m}$ & $\epsilon_m = 78\epsilon_0$ F/m, $\sigma_m = 20\text{mS/m}$ & $\epsilon_m = 60\epsilon_0$ F/m. A la fréquence $f = 50\text{MHz}$, la partie réelle du coefficient est positive. Concernant la dépendance fréquentielle, on peut remarquer que la conductivité du milieu a une influence qui prédomine en basse fréquence (environ inférieure à 100MHz) tandis que la permittivité du milieu a plus une influence en plus haute fréquence (environ supérieure à 1MHz). Dans la gamme de fréquence d'intérêt, c'est-à-dire de 50MHz à 1GHz , la partie réelle du coefficient est fortement modifiée lorsque la permittivité du milieu varie.

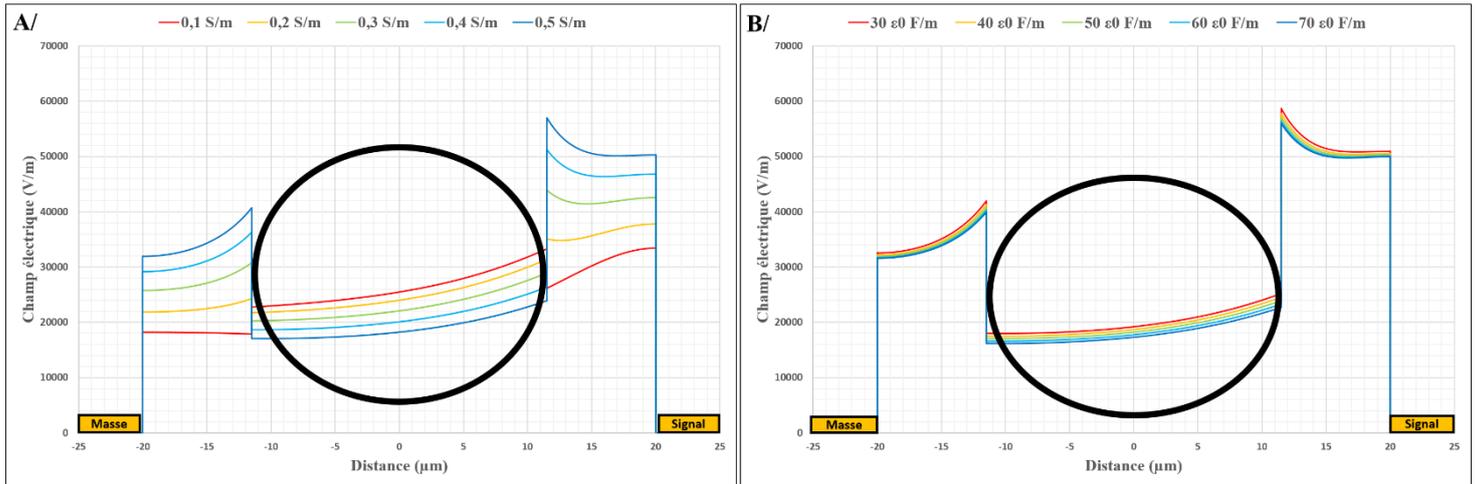


Figure I.33 : Perturbations de la norme du champ électrique pour différentes valeurs (A) de la conductivité de la particule $\sigma_p = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5$ S/m ; (B) de la permittivité de la particule $\epsilon_p = 30, 40, 50, 60, 70\epsilon_0$ F/m. Rappelons les paramètres diélectriques du milieu de suspension : $\sigma_m = 20\text{mS/m}$, $\epsilon_m = 78\epsilon_0$ F/m.

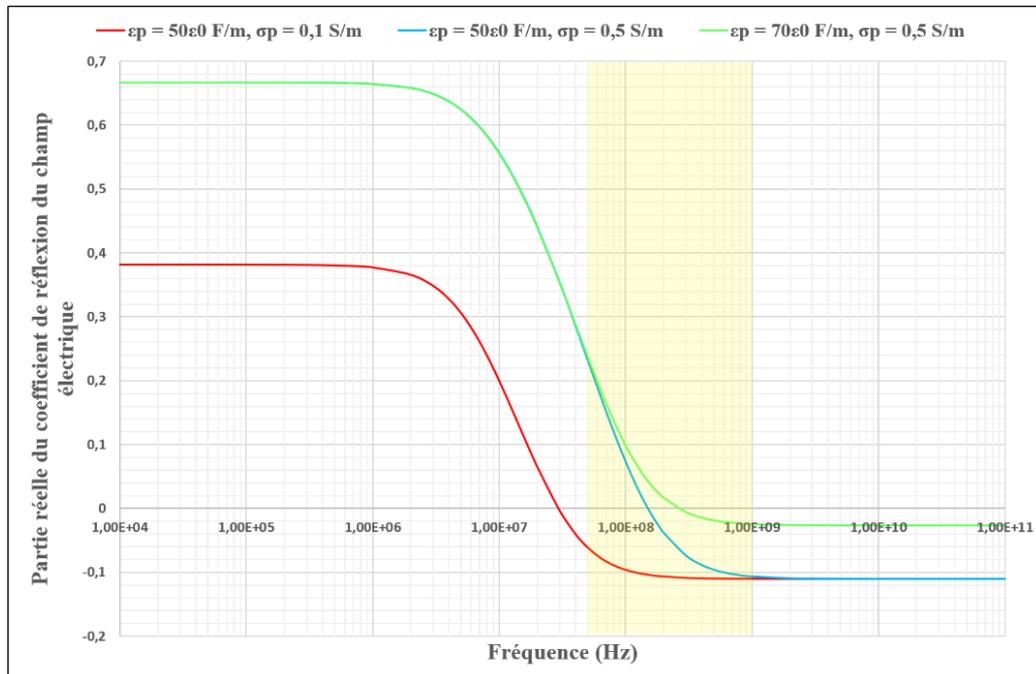


Figure I.34 : Evolution de la partie réelle du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du signal pour trois différentes configurations des paramètres diélectriques de la particule. La bande jaune désigne la gamme de fréquence exploitée dans ces travaux de thèse.



Dans un deuxième temps, nous allons étudier l'impact des paramètres diélectriques de la particule sur les variations de la partie réelle du coefficient de réflexion du champ électrique. La Figure I.33 montre les perturbations de la norme du champ électrique dues à la présence de la particule dans le milieu de suspension pour différentes valeurs de conductivité et permittivité de la particule. On peut remarquer que le champ électrique externe est plus intense que le champ interne à $f = 50\text{MHz}$, sauf dans le cas où la conductivité de la particule est de 0.1 S/m . Dans cette situation, la norme du champ électrique est plus faible à l'extérieur qu'à l'intérieur de la particule. Plus la conductivité de la particule augmente, plus le champ externe augmente et le champ interne diminue. De plus, plus la permittivité de la particule augmente, plus les champs interne et externe diminuent. La Figure I.34 décrit l'évolution du coefficient de réflexion en fonction de la fréquence du signal pour trois cas : $\sigma_p = 0.1\text{ S/m}$ & $\epsilon_p = 50\epsilon_0\text{ F/m}$, $\sigma_p = 0.5\text{ S/m}$ & $\epsilon_p = 50\epsilon_0\text{ F/m}$, $\sigma_p = 0.5\text{ S/m}$ & $\epsilon_p = 60\epsilon_0\text{ F/m}$. A la fréquence $f = 50\text{MHz}$, la partie réelle du coefficient est positive sauf dans le cas où la conductivité de la particule est de 0.1 S/m et de permittivité $50\epsilon_0\text{ F/m}$, $\text{Re}(r)$ est négatif. Le signe de la partie réelle du coefficient de réflexion nous renseigne sur la norme du champ externe et interne : si $\text{Re}(r)$ est positif, le champ est plus fort à l'extérieur qu'à l'intérieur de la particule ; si $\text{Re}(r)$ est négatif, le champ est plus faible à l'extérieur qu'à l'intérieur de la particule. Il est important de rappeler que les perturbations du champ électrique sont très localisées au niveau de la particule. Concernant la dépendance fréquentielle, on peut remarquer que la conductivité de la particule a une influence qui prédomine en basse et moyenne fréquence (environ inférieure à 1GHz) tandis que la permittivité du milieu a plus une influence à plus haute fréquence (environ supérieure à 50MHz). Dans la gamme de fréquences d'intérêt, c'est-à-dire de 50MHz à 1GHz , la partie réelle du coefficient est fortement modifiée lorsque les deux paramètres diélectriques varient.

Lorsque le champ électrique se propage dans le milieu de suspension et rencontre une particule en suspension, une partie du champ incident est réfléchi et une autre partie est transmise. Ces perturbations s'opèrent localement autour de la particule. On peut alors définir un coefficient de réflexion dans le cas d'une incidence normale, qui est le rapport des amplitudes incidente et réfléchi. Ce coefficient dépend des propriétés diélectriques du milieu et de la particule et est donc complexe. Il est possible d'étudier les variations de sa partie réelle en fonction de la fréquence du signal et des paramètres diélectriques. Le signe de $\text{Re}(r)$ est corrélé à la phase du coefficient de réflexion : si $\text{Re}(r)$ est positif, le déphasage est inférieur à 90° , l'onde réfléchi est constructive, ce qui résulte en un champ électrique externe plus important. Si $\text{Re}(r)$ est négatif, le déphasage est supérieur à 90° , l'onde réfléchi est destructive, ce qui résulte en un champ électrique interne plus important. Lorsque la partie réelle du coefficient de réflexion est nulle, la norme du champ électrique est continue à l'interface entre le milieu et la particule. A la fréquence de continuité, la particule devient transparente au champ électrique et les perturbations liées à la présence de la particule sont atténuées. Le champ électrique extérieur est sensible aux changements de milieu aux propriétés diélectriques différentes et induit un réarrangement des



charges surfaciques, c'est-à-dire, induit une polarisation en fonction de la fréquence. Or, comme le facteur de Clausius-Mossotti décrit l'état de polarisation de la particule dans un milieu, il serait intéressant d'étudier le lien entre le coefficient de réflexion du champ électrique à l'interface milieu/particule et le facteur de Clausius-Mossotti.

IV.3.2. Lien entre le coefficient de réflexion du champ électrique et le facteur de Clausius-Mossotti

Le facteur de Clausius-Mossotti est souvent rencontré dans la littérature pour décrire la polarisabilité des objets biologiques. Ces deux physiciens qui ont donné leurs noms à la formulation (I.9), ont mis en avant leur vision concernant le comportement diélectrique : chaque molécule diélectrique contient des éléments/charges positifs et négatifs mais est globalement neutre. Sous l'action d'un champ électrique, les charges sont réarrangées de sorte que la molécule devienne un dipôle [72]. En 1869 et en 1878 respectivement, les deux physiciens Lorenz et Lorentz ont établi indépendamment la relation (I.32) qui lie l'indice de réfraction et la permittivité d'un milieu. Le facteur de Clausius-Mossotti (CM) peut alors s'écrire sous la forme :

$$f_{cm} = \frac{n_p^2 - n_m^2}{n_p^2 + 2n_m^2} \quad (\text{I.33})$$

Cette dernière formulation est alors appelée la relation Lorenz-Lorentz. Dès lors, nous pouvons noter qu'il existe un lien entre l'équation (I.33) et le coefficient de réflexion (I.31). En effet, alors que le facteur CM transcrit le réarrangement des charges à l'interface particule/milieu sous l'action d'un champ électrique externe, le coefficient de réflexion décrit les perturbations de ce champ à cette interface lorsque le champ se propage dans deux milieux diélectriques différents. Il est alors possible d'exprimer le facteur CM en fonction du coefficient de réflexion :

$$f_{cm} = \frac{4r}{3r^2 - 2r + 3} \quad (\text{I.34})$$

Ainsi, le facteur de Clausius-Mossotti est proportionnel au coefficient de réflexion du champ électrique sur un dioptre. Il dépend de la manière dont se propage le champ électrique dans deux milieux diélectriques différents.



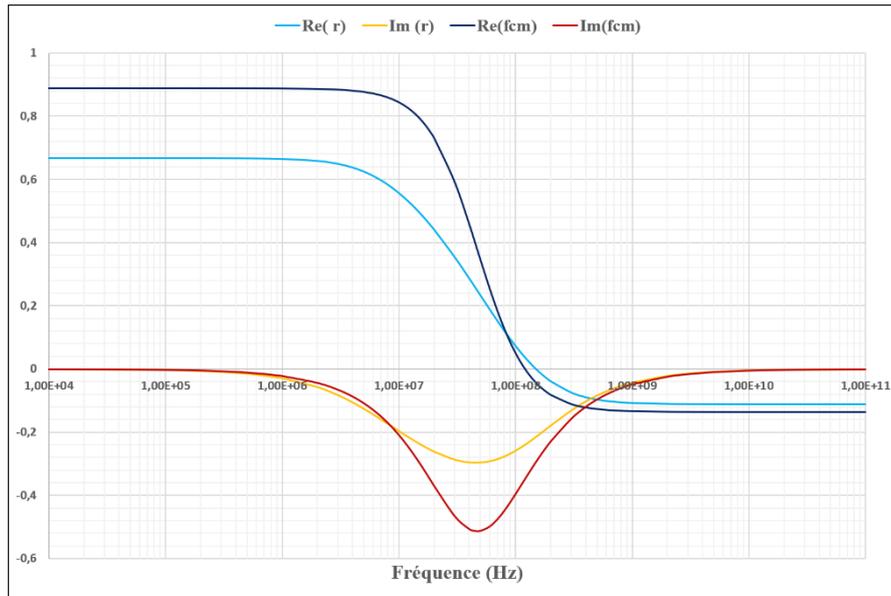


Figure I.35 : Evolution de la partie réelle et imaginaire du coefficient de réflexion et du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence du signal. Les propriétés de la particule sont $\sigma_p = 0.5S/m$ & $\epsilon_p = 50\epsilon_0$ F/m et celles du milieu sont $\sigma_m = 20mS/m$ & $\epsilon_m = 78\epsilon_0$ F/m.

La Figure I.35 montre l'évolution fréquentielle de la partie réelle et imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti et du coefficient de réflexion du champ électrique. On peut noter que les deux propriétés physiques présentent les mêmes formes de courbes que ce soit la partie réelle ou imaginaire. Cependant, on peut remarquer que la fréquence de transition où $Re(f_{cm})$ s'annule et la fréquence de continuité où $Re(r)$ est nulle ne sont pas égales.

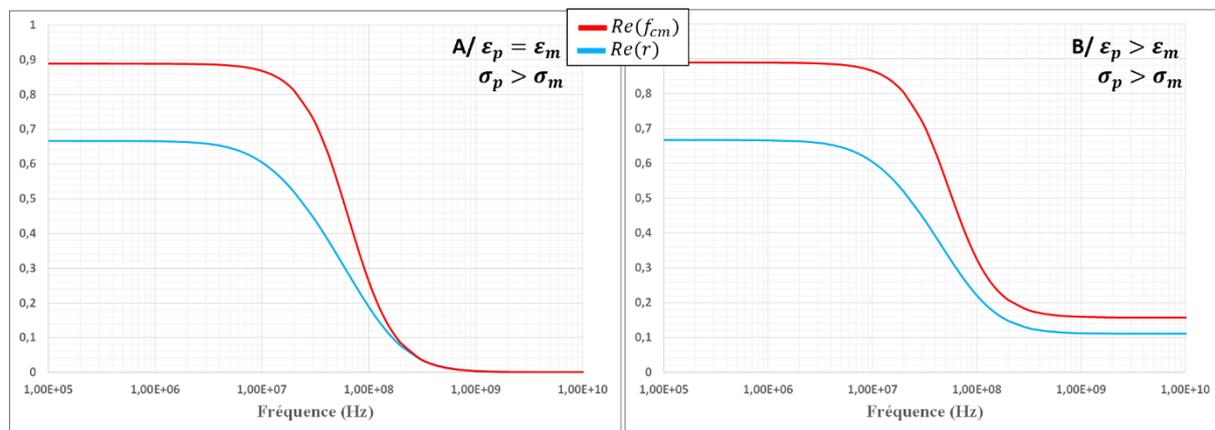


Figure I.36 : Evolution fréquentielle de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (rouge) et du coefficient de réflexion (bleu) lorsque les propriétés diélectriques de la particule et du milieu externe ne permettent pas de mettre en évidence une fréquence de transition. (A) Cas où les permittivités relatives sont égales ; (B) cas où la permittivité relative de la particule est supérieure à celle du milieu.



Cependant, il est important de noter que dans certaines conditions, la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti ne coupe pas l'axe des abscisses et donc ne présente pas de fréquence de transition (Figure I.36). Lorsque la permittivité relative de la particule est supérieure ou égale à celle du milieu, comme nous l'avons vu précédemment sur la Figure I.23, il n'y a pas de fréquence de transition dans la gamme des hautes fréquences. On peut également remarquer que lorsque f_{cm} ne présente pas de fréquence de transition, la partie réelle du coefficient de réflexion ne coupe pas l'axe des abscisses. Ces deux facteurs sont liés par les propriétés diélectriques de la particule et du milieu et de la fréquence du signal. En effet, lors de l'inversion du moment dipolaire dans le système particule/milieu de suspension, c'est-à-dire lorsque l'on passe d'un état nDEP à pDEP ou inversement, les charges induites ne se réarrangent pas instantanément, mais ces changements s'opèrent avec un temps de réponse caractéristique appelé temps de relaxation [72].

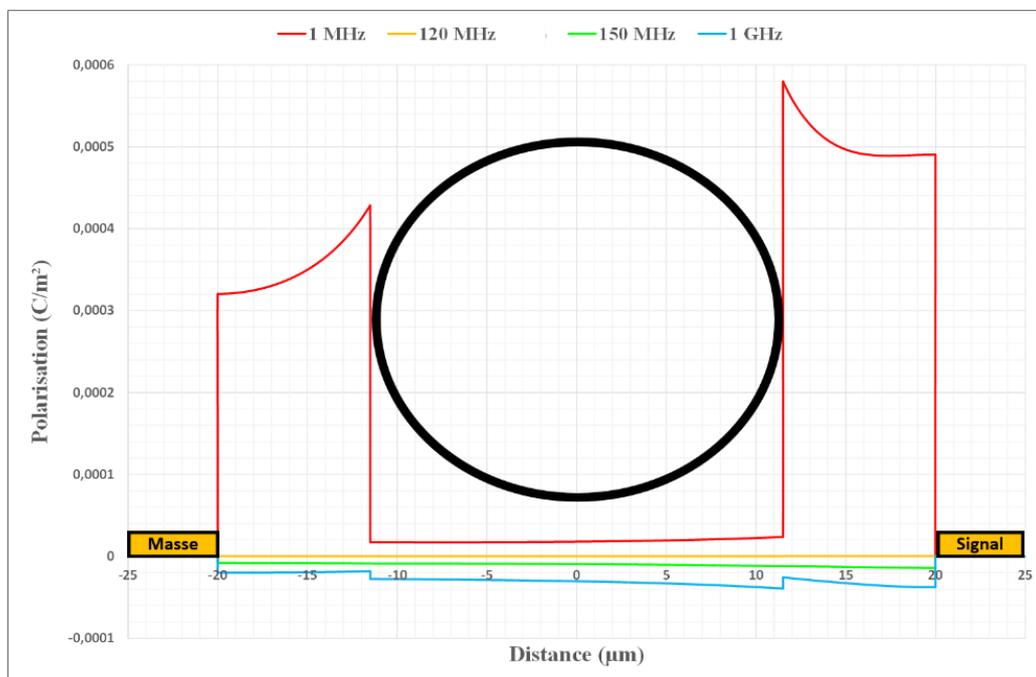


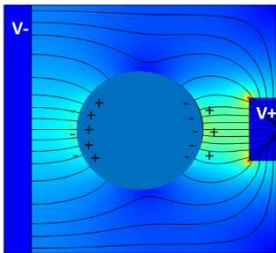
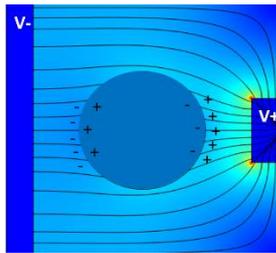
Figure I.37 : Perturbation de la norme de polarisation en présence d'une particule pour différentes fréquences du signal

En effet, la polarisation se définit comme étant la densité volumique du moment dipolaire, ce qui revient à diviser l'équation (8) par le volume de la particule. La Figure I.37 représente la norme de polarisation en présence d'une particule soumise à un champ électrique à différentes fréquences du signal dont 120MHz qui est la fréquence de transition et 150MHz qui est la fréquence à laquelle le champ électrique est continu à l'interface milieu/particule. On peut remarquer que la norme de la polarisation est nulle à la fréquence de transition et est positive pour des fréquences inférieures et négatives pour des fréquences supérieures. L'inversion de la polarisation se fait à la fréquence de



transition. On peut clairement se rendre compte que le facteur de Clausius-Mossotti permet de définir l'état de polarisation de la particule dans un milieu de suspension aux propriétés diélectriques différentes. Par ailleurs, comme la polarisation dépend du champ électrique, la norme n'est pas continue à l'interface entre la particule et le milieu. Cependant, elle est continue entre la fréquence de transition et la fréquence de continuité du champ électrique, bien qu'à cette dernière, la norme soit négative témoignant du comportement nDEP annoncé par la partie réelle du facteur CM. Le facteur CM traduit la réorganisation des charges surfaciques par l'inversion de la polarisation et la fréquence de transition. Quant au coefficient de réflexion du champ électrique, il reflète les perturbations de la norme de ce dernier par la présence d'une particule et on peut en déduire la différence de niveau de champ à l'intérieur et à l'extérieur de la particule par la fréquence de continuité. L'écart entre ces fréquences est dû au fait que lors de l'inversion de la polarisation, la réorganisation des charges surfaciques ne se fait pas instantanément mais avec un temps caractéristique à déterminer.

Tableau I.2 : Tableau de synthèse sur l'étude de l'influence d'une particule homogène diélectrique sur le champ électrique

| | Partie réelle positive | Partie réelle négative |
|--------------------------------|---|--|
| Re(f_{cm}) | <ul style="list-style-type: none"> ● Comportement diélectrique : pDEP, la particule est attirée par les champs forts. ● Polarisation : la particule est plus polarisée que le milieu de suspension, le moment dipolaire est dirigé dans le même sens que le champ électrique. | <ul style="list-style-type: none"> ● Comportement diélectrique : nDEP, la particule est repoussée vers les champs faibles. ● Polarisation : la particule est moins polarisée que le milieu de suspension, le moment dipolaire est dirigé dans le sens opposé au champ électrique. |
| Re(r) | <ul style="list-style-type: none"> ● Lignes de champ : elles sont attirées dans la particule.  <p>Le diagramme illustre une particule circulaire placée entre deux électrodes planes, une négative (V-) à gauche et une positive (V+) à droite. Les lignes de champ électrique, représentées par des courbes bleues, sont fortement attirées et se concentrent à l'intérieur de la particule, indiquant une polarisation positive.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Déphasage de l'onde incidente : $\varphi(r) < 90^\circ$, l'onde réfléchie est constructive. Le champ électrique est plus fort à l'extérieur de la particule. | <ul style="list-style-type: none"> ● Lignes de champ : elles contournent la particule.  <p>Le diagramme illustre une particule circulaire placée entre deux électrodes planes, une négative (V-) à gauche et une positive (V+) à droite. Les lignes de champ électrique, représentées par des courbes bleues, contournent la particule sans pénétrer à l'intérieur, indiquant une polarisation négative.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Déphasage de l'onde incidente : $\varphi(r) > 90^\circ$, l'onde réfléchie est destructive. Le champ électrique est plus faible à l'extérieur de la particule. |



V. Conclusion du Chapitre I

Dans ce premier chapitre, nous avons mis en contexte les travaux de cette thèse en présentant les besoins actuels des biologistes en termes d'outils de diagnostic rapides et performants. La problématique principale est d'évaluer la capacité de nano-vésicules appelées oncosomes à induire les cellules cancéreuses différenciées à développer des caractéristiques de résistance thérapeutique, possédées par les cellules souches cancéreuses. Quel est le rôle et l'impact des oncosomes dans le degré d'agressivité de la tumeur et de sa résistance aux actuels traitements thérapeutiques ? En raison de la limitation des outils existants pour caractériser les cellules, nous avons vu différentes techniques de caractérisation et de tri cellulaire basées soit sur l'immunomarquage soit sur l'interaction entre les cellules et un champ extérieur couplé à la microfluidique. Notre choix s'est porté sur la diélectrophorèse car cette méthode est label-free et permet donc de résoudre le problème lié au manque d'immunomarqueurs spécifiques aux CSCs. La DEP ne requière pas de contact mécanique avec les cellules, prévenant ainsi leur endommagement, et il est inutile de lyser les cellules pour avoir accès à leur contenu interne pour l'analyser : il est donc possible de les remettre en culture une fois caractérisées par DEP. Ce phénomène physique permet d'induire le mouvement d'une cellule biologique soumise à un champ électrique non-uniforme dû à l'interaction entre le dipôle induit de la cellule et le gradient d'intensité du champ électrique. La force de déplacement DEP est influencée par la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti qui dépend des paramètres diélectriques de la cellule, du milieu de suspension et de la fréquence du signal appliqué. Par la suite, nous avons établi un modèle diélectrique d'une cellule biologique grâce à une modélisation mono-enveloppe et ainsi nous avons pu établir deux fréquences caractéristiques à basse et à haute fréquence dites de transition, où la force DEP s'annule. Les simulations numériques montrent que f_{x01} dépend de la taille et de la morphologie de la cellule et des propriétés de la membrane plasmique tandis qu'en hautes fréquences, f_{x02} dépend du contenu interne et du rapport volumique nucléo-cytoplasmique. La mesure des fréquences de transition peut être utilisée comme biomarqueurs électromagnétiques afin de différencier des populations cellulaires variées. Nous présenterons dans le chapitre II de ce manuscrit le laboratoire sur puce utilisé pour la caractérisation DEP des cellules et nous montrerons la pertinence d'exploiter la signature DEP en UHF afin de discriminer les cellules cancéreuses souches et différenciées en identifiant les spécificités de leurs propriétés diélectriques intracellulaires. Par la suite dans le chapitre III, nous tirerons profit de cette signature DEP afin de trier les cellules cancéreuses selon leur degré de différenciation grâce à un laboratoire sur puce basé sur la répulsion diélectrophorétique.

En outre, à la fin de ce chapitre, nous avons montré que la présence d'une particule diélectrique dans un milieu de suspension perturbe localement la propagation du champ électrique. Le coefficient de réflexion du champ électrique permet de définir une fréquence de continuité lorsque la particule devient transparente devant le champ électrique. Nous avons identifié un lien entre ce facteur et celui de



Clauius-Mossotti. La fréquence de transition liée à l'inversion de la polarisation et la fréquence de continuité sont associées par un temps de réponse caractéristique du moment dipolaire.

VI. Référence bibliographique du Chapitre I

- [1] F. Hjeij *et al.*, « UHF dielectrophoretic handling of individual biological cells using BiCMOS microfluidic RF-sensors », in *2016 46th European Microwave Conference (EuMC)*, oct. 2016, p. 265-268. doi: 10.1109/EuMC.2016.7824329.
- [2] T. Provent *et al.*, « Ultra-High Frequencies continuous biological cell sorting based on repulsive and low dielectrophoresis forces », in *2019 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, juin 2019, p. 224-227. doi: 10.1109/MWSYM.2019.8701063.
- [3] S. Pinet *et al.*, « TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells », *Oncotarget*, vol. 7, n° 31, p. 50349-50364, juill. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10387.
- [4] C. de la Torre Gomez, R. V. Goreham, J. J. Bech Serra, T. Nann, et M. Kussmann, « “Exosomics”—A Review of Biophysics, Biology and Biochemistry of Exosomes With a Focus on Human Breast Milk », *Front. Genet.*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fgene.2018.00092.
- [5] B. T. Pan et R. M. Johnstone, « Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor », *Cell*, vol. 33, n° 3, p. 967-978, juill. 1983, doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
- [6] J. Lotvall et H. Valadi, « Cell to Cell Signalling via Exosomes Through esRNA », *Cell Adhes. Migr.*, vol. 1, n° 3, p. 156-158, juill. 2007, doi: 10.4161/cam.1.3.5114.
- [7] E. R. Abels et X. O. Breakefield, « Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake », *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 36, n° 3, p. 301-312, avr. 2016, doi: 10.1007/s10571-016-0366-z.
- [8] K. J. McKelvey, K. L. Powell, A. W. Ashton, J. M. Morris, et S. A. McCracken, « Exosomes: Mechanisms of Uptake », *J. Circ. Biomark.*, vol. 4, p. 7, janv. 2015, doi: 10.5772/61186.
- [9] N. Chaput et C. Théry, « Exosomes: immune properties and potential clinical implementations », *Semin. Immunopathol.*, vol. 33, n° 5, p. 419-440, sept. 2011, doi: 10.1007/s00281-010-0233-9.
- [10] J. M. Aliotta *et al.*, « Alteration of Marrow Cell Gene Expression, Protein Production, and Engraftment into Lung by Lung-Derived Microvesicles: A Novel Mechanism for Phenotype Modulation », *STEM CELLS*, vol. 25, n° 9, p. 2245-2256, 2007, doi: 10.1634/stemcells.2007-0128.
- [11] M. Chivet, F. Hemming, K. Pernet-Gallay, S. Fraboulet, et R. Sadoul, « Emerging Role of Neuronal Exosomes in the Central Nervous System », *Front. Physiol.*, vol. 3, 2012, doi: 10.3389/fphys.2012.00145.
- [12] R. C. Lai, T. S. Chen, et S. K. Lim, « Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease », *Regen. Med.*, vol. 6, n° 4, p. 481-492, juill. 2011, doi: 10.2217/rme.11.35.
- [13] F. T. Borges *et al.*, « TGF- β 1-Containing Exosomes from Injured Epithelial Cells Activate Fibroblasts to Initiate Tissue Regenerative Responses and Fibrosis », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 24, n° 3, p. 385-392, mars 2013, doi: 10.1681/ASN.2012101031.
- [14] J. R. Edgar, « Q&A: What are exosomes, exactly? », *BMC Biol.*, vol. 14, n° 1, p. 46, juin 2016, doi: 10.1186/s12915-016-0268-z.
- [15] D. D. Taylor et C. Gercel-Taylor, « MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer », *Gynecol. Oncol.*, vol. 110, n° 1, p. 13-21, juill. 2008, doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033.
- [16] J. Tickner, A. Urquhart, S.-A. Stephenson, D. Richard, et K. Byrne, « Functions and Therapeutic Roles of Exosomes in Cancer », *Front. Oncol.*, vol. 4, p. 127, mai 2014, doi: 10.3389/fonc.2014.00127.



- [17] I. Parolini *et al.*, « Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 49, p. 34211-34222, avr. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.041152.
- [18] J. Folkman, « Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications », <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>, 14 janvier 2010. <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM197111182852108> (consulté le 2 juin 2020).
- [19] T. Boon, « Toward a Genetic Analysis of Tumor Rejection Antigens », in *Advances in Cancer Research*, vol. 58, G. F. Vande Woude et G. Klein, Éd. Academic Press, 1992, p. 177-210. doi: 10.1016/S0065-230X(08)60295-X.
- [20] C. Liu *et al.*, « Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function », *J. Immunol.*, vol. 176, n° 3, p. 1375-1385, févr. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1375.
- [21] J. Cong *et al.*, « Dysfunction of natural killer cells by FBP1-induced inhibition of glycolysis during lung cancer progression », *Cell Metab.*, vol. 28, n° 2, p. 243-255, 2018.
- [22] E. U. Wiekowski, C. Visus, M. Szajnik, M. J. Szczepanski, W. J. Storkus, et T. L. Whiteside, « Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes », *J. Immunol.*, vol. 183, n° 6, p. 3720-3730, 2009.
- [23] A. Clayton, J. P. Mitchell, J. Court, S. Linnane, M. D. Mason, et Z. Tabi, « Human Tumor-Derived Exosomes Down-Modulate NKG2D Expression », *J. Immunol.*, vol. 180, n° 11, p. 7249-7258, juin 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7249.
- [24] D. A. Leberman et J. S. Edmiston, « The role of TGF- β in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes », *Microbes Infect.*, vol. 1, n° 15, p. 1297-1304, déc. 1999, doi: 10.1016/S1286-4579(99)00254-3.
- [25] S. Paget, « THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. », *The Lancet*, vol. 133, n° 3421, p. 571-573, mars 1889, doi: 10.1016/S0140-6736(00)49915-0.
- [26] H. Peinado *et al.*, « Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET », *Nat. Med.*, vol. 18, n° 6, p. 883-891, juin 2012, doi: 10.1038/nm.2753.
- [27] B. Psaila et D. Lyden, « The Metastatic Niche: Adapting the Foreign Soil », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, n° 4, p. 285-293, avr. 2009, doi: 10.1038/nrc2621.
- [28] J. Webber, R. Steadman, M. D. Mason, Z. Tabi, et A. Clayton, « Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation », *Cancer Res.*, vol. 70, n° 23, p. 9621-9630, déc. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1722.
- [29] G. Tabatabai et M. Weller, « Glioblastoma stem cells », *Cell Tissue Res.*, vol. 343, n° 3, p. 459-465, mars 2011, doi: 10.1007/s00441-010-1123-0.
- [30] M. Cheray *et al.*, « Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma », *Exon Publ.*, p. 59-71, sept. 2017, doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch4.
- [31] « Cellules souches cancéreuses », *Wikipédia*. 2 août 2020. Consulté le: 4 octobre 2020. [En ligne]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Cellules_souches_canc%C3%A9reuses&oldid=173489535
- [32] C. Hadjimichael, K. Chanoumidou, N. Papadopoulou, P. Arampatzi, J. Papamatheakis, et A. Kretsovali, « Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells », *World J. Stem Cells*, vol. 7, n° 9, p. 1150-1184, oct. 2015, doi: 10.4252/wjsc.v7.i9.1150.
- [33] A. Bradshaw, A. Wickremsekera, S. T. Tan, L. Peng, P. F. Davis, et T. Itinteang, « Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme », *Front. Surg.*, vol. 3, p. 21, 2016, doi: 10.3389/fsurg.2016.00021.
- [34] C. A. Gilbert et A. H. Ross, « Cancer stem cells: Cell culture, markers, and targets for new therapies », *J. Cell. Biochem.*, vol. 108, n° 5, p. 1031-1038, 2009, doi: 10.1002/jcb.22350.
- [35] D. Beier *et al.*, « CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 9, p. 4010-4015, mai 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4180.
- [36] S. Chen *et al.*, « CD133 Expression and the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis », *PLOS ONE*, vol. 8, n° 2, p. e56380, févr. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0056380.



- [37] C. R. Jeter, T. Yang, J. Wang, H.-P. Chao, et D. G. Tang, « Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions », *STEM CELLS*, vol. 33, n° 8, p. 2381-2390, 2015, doi: 10.1002/stem.2007.
- [38] M. J. Munro, S. K. Wickremesekera, L. Peng, S. T. Tan, et T. Itinteang, « Cancer stem cells in colorectal cancer: a review », *J. Clin. Pathol.*, vol. 71, n° 2, p. 110-116, févr. 2018, doi: 10.1136/jclinpath-2017-204739.
- [39] S. Liu *et al.*, « Hedgehog Signaling and Bmi-1 Regulate Self-renewal of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 12, p. 6063-6071, juin 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0054.
- [40] A. W. Hamburger, « The Human Tumor Clonogenic Assay as a Model System in Cell Biology », *Int. J. Cell Cloning*, vol. 5, n° 2, p. 89-107, 1987, doi: 10.1002/stem.5530050202.
- [41] M. E. Piyasena et S. W. Graves, « The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication », *Lab. Chip*, vol. 14, n° 6, p. 1044-1059, févr. 2014, doi: 10.1039/C3LC51152A.
- [42] L. A. Herzenberg, R. G. Sweet, et L. A. Herzenberg, « Fluorescence-activated cell sorting », *Sci. Am.*, vol. 234, n° 3, p. 108-117, mars 1976, doi: 10.1038/scientificamerican0376-108.
- [43] C. W. S. Iv, C. D. Reyes, et G. P. López, « Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation », *Lab. Chip*, vol. 15, n° 5, p. 1230-1249, févr. 2015, doi: 10.1039/C4LC01246A.
- [44] S. Basu, H. M. Campbell, B. N. Dittel, et A. Ray, « Purification of Specific Cell Population by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) », *JoVE J. Vis. Exp.*, n° 41, p. e1546, juill. 2010, doi: 10.3791/1546.
- [45] M. Geens, H. Van de Velde, G. De Block, E. Goossens, A. Van Steirteghem, et H. Tournaye, « The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients », *Hum. Reprod.*, vol. 22, n° 3, p. 733-742, mars 2007, doi: 10.1093/humrep/del418.
- [46] C. H. Hsu, C. C. Chen, D. Irimia, et M. Toner, « ISOLATING CELLS FROM BLOOD USING BUOYANCY ACTIVATED CELL SORTING (BACS) WITH GLASS MICROBUBBLES », p. 3.
- [47] Y.-R. Liou, Y.-H. Wang, C.-Y. Lee, et P.-C. Li, « Buoyancy-Activated Cell Sorting Using Targeted Biotinylated Albumin Microbubbles », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 5, p. e0125036, mai 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0125036.
- [48] E. A. Bayer, E. Skutelsky, et M. Wilchek, « [55] The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry », in *Methods in Enzymology*, vol. 62, Academic Press, 1979, p. 308-315. doi: 10.1016/0076-6879(79)62235-8.
- [49] D. R. Gossett *et al.*, « Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, n° 8, p. 3249-3267, août 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3721-9.
- [50] J. McGrath, M. Jimenez, et H. Bridle, « Deterministic lateral displacement for particle separation: a review », *Lab. Chip*, vol. 14, n° 21, p. 4139-4158, 2014, doi: 10.1039/C4LC00939H.
- [51] M. Balvin, E. Sohn, T. Iracki, G. Drazer, et J. Frechette, « Directional Locking and the Role of Irreversible Interactions in Deterministic Hydrodynamics Separations in Microfluidic Devices », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 103, n° 7, p. 078301, août 2009, doi: 10.1103/PhysRevLett.103.078301.
- [52] J. Beech, P. Jönsson, et J. O. Tegenfeldt, « Tipping the balance of deterministic lateral displacement devices using dielectrophoresis », *Lab. Chip*, vol. 9, n° 18, p. 2698-2706, 2009, doi: 10.1039/B823275J.
- [53] T. Zhang *et al.*, « Focusing of sub-micrometer particles in microfluidic devices », *Lab. Chip*, vol. 20, n° 1, p. 35-53, 2020, doi: 10.1039/C9LC00785G.
- [54] J. A. Davis *et al.*, « Deterministic hydrodynamics: Taking blood apart », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, n° 40, p. 14779-14784, oct. 2006, doi: 10.1073/pnas.0605967103.
- [55] G. Segré et A. Silberberg, « Radial Particle Displacements in Poiseuille Flow of Suspensions », *Nature*, vol. 189, n° 4760, p. 209-210, janv. 1961, doi: 10.1038/189209a0.
- [56] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, et M. Toner, « Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, n° 48, p. 18892-18897, nov. 2007, doi: 10.1073/pnas.0704958104.



- [57] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, et I. Papautsky, « Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration », *Lab. Chip*, vol. 8, n° 11, p. 1906-1914, 2008, doi: 10.1039/B807107A.
- [58] S. S. Kuntaegowdanahalli, A. A. S. Bhagat, G. Kumar, et I. Papautsky, « Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels », *Lab. Chip*, vol. 9, n° 20, p. 2973-2980, 2009, doi: 10.1039/B908271A.
- [59] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, et S. Chu, « Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles », *Opt. Lett.*, vol. 11, n° 5, p. 288-290, mai 1986, doi: 10.1364/OL.11.000288.
- [60] E. Townes-Anderson, R. S. St Jules, D. M. Sherry, J. Lichtenberger, et M. Hassanain, « Micromanipulation of retinal neurons by optical tweezers », *Mol. Vis.*, vol. 4, p. 12, juill. 1998.
- [61] M. Lahmani et P. Houdy, *Les nanosciences (Tome 3) - Nanobiotechnologies et nanobiologie: Nanobiotechnologies et nanobiologie*. Humensis, 2015.
- [62] H. Zhang et K.-K. Liu, « Optical tweezers for single cells », *J R Soc Interface*, p. 20, 2008.
- [63] R. Huang *et al.*, « A microfluidics approach for the isolation of nucleated red blood cells (NRBCs) from the peripheral blood of pregnant women », *Prenat. Diagn.*, vol. 28, n° 10, p. 892-899, oct. 2008, doi: 10.1002/pd.2079.
- [64] P. Sajeesh et A. K. Sen, « Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, n° 1, p. 1-52, juill. 2014, doi: 10.1007/s10404-013-1291-9.
- [65] H. A. Pohl, « The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields », *J. Appl. Phys.*, vol. 22, n° 7, p. 869-871, juill. 1951, doi: 10.1063/1.1700065.
- [66] H. A. Pohl et J. P. Schwar, « Particle Separations by Nonuniform Electric Fields in Liquid Dielectrics, Batch Methods », *J. Electrochem. Soc.*, vol. 107, n° 5, p. 383, mai 1960, doi: 10.1149/1.2427704.
- [67] H. Andersson et A. van den Berg, « Microfluidic devices for cellomics: a review », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 92, n° 3, p. 315-325, juill. 2003, doi: 10.1016/S0925-4005(03)00266-1.
- [68] B. Çetin et D. Li, « Dielectrophoresis in microfluidics technology », *ELECTROPHORESIS*, vol. 32, n° 18, p. 2410-2427, 2011, doi: 10.1002/elps.201100167.
- [69] I.-F. Cheng, H.-C. Chang, D. Hou, et H.-C. Chang, « An integrated dielectrophoretic chip for continuous bioparticle filtering, focusing, sorting, trapping, and detecting », *Biomicrofluidics*, vol. 1, n° 2, mai 2007, doi: 10.1063/1.2723669.
- [70] K. H. Kang, Y. Kang, X. Xuan, et D. Li, « Continuous separation of microparticles by size with Direct current-dielectrophoresis », *ELECTROPHORESIS*, vol. 27, n° 3, p. 694-702, 2006, doi: <https://doi.org/10.1002/elps.200500558>.
- [71] J. Voldman, « ELECTRICAL FORCES FOR MICROSCALE CELL MANIPULATION », *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 8, n° 1, p. 425-454, août 2006, doi: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095739.
- [72] R. R. Pethig, *Dielectrophoresis: Theory, Methodology and Biological Applications*. John Wiley & Sons, 2017.
- [73] R. Plonsey, *Bioelectric Phenomena*. McGraw-Hill, 1969.
- [74] M. Li, W. Li, J. Zhang, G. Alici, et W. Wen, « A review of microfabrication techniques and dielectrophoretic microdevices for particle manipulation and separation », *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 47, janv. 2014, doi: 10.1088/0022-3727/47/6/063001.
- [75] J. Fathy, A. Pourmand, et H. Badri Ghavifekr, « Utilizing electric field to separate cells with travelling-wave dielectrophoresis force in a droplet », in *2017 Iranian Conference on Electrical Engineering (ICEE)*, mai 2017, p. 435-439. doi: 10.1109/IranianCEE.2017.7985489.
- [76] Y. Huang, R. Holzel, R. Pethig, et X.-B. Wang, « Differences in the AC electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies », *Phys. Med. Biol.*, vol. 37, n° 7, p. 1499-1517, juill. 1992, doi: 10.1088/0031-9155/37/7/003.
- [77] K. Khoshmanesh, S. Nahavandi, S. Baratchi, A. Mitchell, et K. Kalantar-zadeh, « Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, n° 5, p. 1800-1814, janv. 2011, doi: 10.1016/j.bios.2010.09.022.



- [78] V. Nerguizian, I. Stiharu, N. Al-Azzam, B. Yassine-Diab, et A. Alazzam, « The effect of dielectrophoresis on living cells: crossover frequencies and deregulation in gene expression », *Analyst*, vol. 144, n° 12, p. 3853-3860, juin 2019, doi: 10.1039/C9AN00320G.
- [79] « Symbiose et évolution : à l'origine de la cellule eucaryote », *Encyclopédie de l'environnement*, 23 juin 2016. <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/symbiose-evolution-lorigine-de-cellule-eucaryote/> (consulté le 9 septembre 2021).
- [80] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, et P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th éd. Garland Science, 2002.
- [81] P. Ellappan et R. Sundararajan, « A simulation study of the electrical model of a biological cell », *J. Electrostat.*, vol. 63, n° 3, p. 297-307, mars 2005, doi: 10.1016/j.elstat.2004.11.007.
- [82] C. Hyun, H. Kaur, D. S. McNabb, et J. Li, « Dielectrophoretic stretching of DNA tethered to a fiber tip », *Nanotechnology*, vol. 26, n° 12, p. 125501, mars 2015, doi: 10.1088/0957-4484/26/12/125501.
- [83] A. Sonnenberg *et al.*, « Dielectrophoretic isolation and detection of cancer-related circulating cell-free DNA biomarkers from blood and plasma », *ELECTROPHORESIS*, vol. 35, n° 12-13, p. 1828-1836, 2014, doi: 10.1002/elps.201400016.
- [84] A. Nakano et A. Ros, « Protein dielectrophoresis: Advances, challenges, and applications », *ELECTROPHORESIS*, vol. 34, n° 7, p. 1085-1096, 2013, doi: 10.1002/elps.201200482.
- [85] J. Cottet, O. Fabregue, C. Berger, F. Buret, P. Renaud, et M. Frénéa-Robin, « MyDEP: A New Computational Tool for Dielectric Modeling of Particles and Cells », *Biophys. J.*, vol. 116, n° 1, p. 12-18, janv. 2019, doi: 10.1016/j.bpj.2018.11.021.
- [86] R. Pethig, « Dielectrophoresis: An assessment of its potential to aid the research and practice of drug discovery and delivery », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, n° 11, p. 1589-1599, nov. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.09.003.
- [87] Z. R. Gagnon, « Cellular dielectrophoresis: Applications to the characterization, manipulation, separation and patterning of cells », *ELECTROPHORESIS*, vol. 32, n° 18, p. 2466-2487, 2011, doi: 10.1002/elps.201100060.
- [88] J. Cottet, O. Fabregue, C. Berger, F. Buret, P. Renaud, et M. Frénéa-Robin, *MyDEP: a new computational tool for dielectric modeling of particles and cells*. Zenodo, 2019. doi: 10.5281/zenodo.2537957.
- [89] A. Alazzam, I. Stiharu, R. Bhat, et A.-N. Meguerditchian, « Interdigitated comb-like electrodes for continuous separation of malignant cells from blood using dielectrophoresis », *ELECTROPHORESIS*, vol. 32, n° 11, p. 1327-1336, 2011, doi: 10.1002/elps.201000625.
- [90] S. Choi et J.-K. Park, « Microfluidic system for dielectrophoretic separation based on a trapezoidal electrode array », *Lab. Chip*, vol. 5, n° 10, p. 1161-1167, 2005, doi: 10.1039/B505088J.
- [91] M. D. Vahey et J. Voldman, « An Equilibrium Method for Continuous-Flow Cell Sorting Using Dielectrophoresis », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 9, p. 3135-3143, mai 2008, doi: 10.1021/ac7020568.
- [92] L. M. Broche, F. H. Labeed, et M. P. Hughes, « Extraction of dielectric properties of multiple populations from dielectrophoretic collection spectrum data », *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, n° 10, p. 2267-2274, avr. 2005, doi: 10.1088/0031-9155/50/10/006.
- [93] E. Lambert *et al.*, « Microfluidic Lab-on-a-Chip Based on UHF-Dielectrophoresis for Stemness Phenotype Characterization and Discrimination among Glioblastoma Cells », *Biosensors*, vol. 11, n° 10, Art. n° 10, oct. 2021, doi: 10.3390/bios11100388.
- [94] S. Tada, Y. Omi, M. Eguchi, N. Nakai, et A. Tsukamoto, « Analysis of Dielectrophoretic Properties of Cells by the use of the Uniform Field Gradient », in *2018 World Automation Congress (WAC)*, juin 2018, p. 1-5. doi: 10.23919/WAC.2018.8430427.
- [95] S. Shim, K. Stemke-Hale, J. Noshari, F. F. Becker, et P. R. C. Gascoyne, « Dielectrophoresis has broad applicability to marker-free isolation of tumor cells from blood by microfluidic systems », *Biomicrofluidics*, vol. 7, n° 1, p. 011808, janv. 2013, doi: 10.1063/1.4774307.
- [96] J. Yang, Y. Huang, X. Wang, X.-B. Wang, F. F. Becker, et P. R. C. Gascoyne, « Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by Electrorotation as a Cell Separation Criterion », *Biophys. J.*, vol. 76, n° 6, p. 3307-3314, juin 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77483-7.



- [97] G. Mernier, N. Piacentini, R. Tornay, N. Buffi, et P. Renaud, « Cell viability assessment by flow cytometry using yeast as cell model », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 154, n° 2, p. 160-163, juin 2011, doi: 10.1016/j.snb.2009.11.066.
- [98] M. S. Talary, K. I. Mills, T. Hoy, A. K. Burnett, et R. Pethig, « Dielectrophoretic separation and enrichment of CD34+ cell subpopulation from bone marrow and peripheral blood stem cells », *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 33, n° 2, p. 235-237, mars 1995, doi: 10.1007/BF02523050.
- [99] M. Stephens, M. S. Talary, R. Pethig, A. K. Burnett, et K. I. Mills, « The dielectrophoresis enrichment of CD34+ cells from peripheral blood stem cell harvests », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 18, n° 4, p. 777-782, oct. 1996.
- [100] L. A. Flanagan *et al.*, « Unique Dielectric Properties Distinguish Stem Cells and Their Differentiated Progeny », *STEM CELLS*, vol. 26, n° 3, p. 656-665, 2008, doi: 10.1634/stemcells.2007-0810.
- [101] A. Casciati *et al.*, « Human medulloblastoma cell lines: Investigating on cancer stem cell-like phenotype », *Cancers*, vol. 12, n° 1, p. 226, 2020.
- [102] R. Manczak *et al.*, « High-Frequency Dielectrophoresis Characterization of Differentiated vs Undifferentiated Medulloblastoma Cells », *2018 EMF-Med 1st World Conf. Biomed. Appl. Electromagn. Fields EMF-Med*, p. 1-2, 2018, doi: 10.23919/emf-med.2018.8526006.



Chapitre II. Caractérisation de cellules individuelles par diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence dans le but d'une discrimination phénotypique



I. Introduction

Au cours du chapitre I, nous avons pu comprendre les enjeux de la détection des cellules souches cancéreuses. En effet, en raison de leur résistance thérapeutique, l'identification des CSCs pourrait avoir une valeur pronostique pour évaluer l'agressivité de la tumeur et prévenir le risque de récurrence. Cependant, les CSCs constituent une sous-population cellulaire rare et sont difficiles à caractériser avec des biomarqueurs génériques, car aucun marqueur spécifique des CSCs n'est disponible à ce jour pour identifier formellement ces cellules « cachées » dans la tumeur. C'est pourquoi la détection des CSCs représente actuellement un défi pour améliorer la prise en charge et le traitement de certains cancers solides. Pour ce faire, nous avons précédemment identifié la technique de la diélectrophorèse comme une méthode adéquate pour la caractérisation cellulaire sans immuno-marqueur. Dans la gamme des Ultra-Hautes Fréquences (UHF c'est-à-dire supérieures à 20MHz), l'influence de la membrane plasmique de la cellule diminue et l'onde électromagnétique a la capacité de pénétrer à l'intérieur de celle-ci pour interagir avec le contenu cytoplasmique. Le champ électrique peut alors sonder le contenu intracellulaire dont les propriétés diélectriques (conductivité et permittivité relative) sont susceptibles d'affecter la valeur de la seconde fréquence de transition f_{x02} . D'après les études bibliographiques et théoriques (par simulation notamment) du chapitre précédent, cette dernière pourrait être considérée comme un biomarqueur électromagnétique pour identifier le phénotype indifférencié que présentent ou non les cellules.

Un des objectifs de ces travaux étant d'évaluer le pouvoir de transformation oncogénique des oncosomes, il est nécessaire d'identifier le caractère souche des cellules cancéreuses capables de produire des exosomes particulièrement néfastes.

Afin de mesurer la fréquence de transition UHF (f_{x02}), nous allons utiliser un microsystème basé sur l'UHF-DEP dont les travaux de développement ont fait l'objet d'une thèse précédente [1]. Ce laboratoire-sur-puce applique un champ électrique non-uniforme générant une force diélectrophorétique sur les cellules biologiques. L'électro-manipulation des cellules de manière individuelle nous permet d'extraire la fréquence de transition et d'ainsi corréler le phénotype d'une population cellulaire connue à sa signature électromagnétique. Dans ce chapitre II, nous montrerons brièvement le design de l'outil de caractérisation, puis nous nous intéresserons à son principe de fonctionnement et à la méthode de mesure des deux fréquences de transition (f_{x01}, f_{x02}). Par la suite, nous présenterons les différents modèles cellulaires utilisés lors de nos études et justifierons ces choix.

Dans un premier temps, le capteur électromagnétique sera éprouvé avec une lignée cellulaire du cancer colorectal cultivée dans deux conditions différentes : induisant (i) un phénotype différencié et (ii) un enrichissement de la culture en cellules souches cancéreuses. Les deux fréquences de transitions



f_{x01} à basse fréquence et f_{x02} à haute fréquence seront mesurées afin de démontrer expérimentalement la pertinence de l'exploitation de la gamme des ultra hautes fréquences pour la détection des CSCs. Ensuite, nous ferons des études de suivi cinétique de l'acquisition du phénotype indifférencié dans un milieu d'enrichissement en CSCs sur trois lignées différentes : une de glioblastome et deux de cancers colorectaux. Une fois les signatures électromagnétiques collectées pour les différents phénotypes, les vésicules extracellulaires (EVs) seront extraites des cellules cancéreuses considérées comme ayant un potentiel d'agressivité élevé et mises en contact avec des cellules différenciées. Cette expérience permettra de répondre à un des objectifs du projet Oncosome Track qui est de vérifier si les EVs interviennent dans le transfert d'agressivité. Différentes conditions d'exposition seront appliquées : deux phases d'incubation pendant 24h et 72h et avec une ou deux doses d'oncosomes. Tout d'abord, les cellules cancéreuses provenant de lignées commerciales seront exposées à des oncosomes provenant eux aussi de lignées cellulaires, puis à des EVs de cultures primaires (cellules non immortalisées) permettant de poser les bases d'une étude pré-clinique.

A l'issue de ce chapitre II, nous aurons alors caractérisé l'ensemble des signatures électromagnétiques UHF-DEP des populations d'intérêt suivant leur phénotype. Nous serons alors à même de les exploiter à des fins de tri cellulaire pour répondre au deuxième objectif de ces travaux de doctorat. Ceci sera abordé dans le chapitre III.



II. Fonctionnalités du système de caractérisation microfluidique

Comme évoqué précédemment, le système de caractérisation UHF-DEP a été développé dans les travaux de la thèse de Fatima Hjeij [1]. Implémenté sur un laboratoire sur puce, le système permet de faire circuler une suspension cellulaire et de les caractériser à basse fréquence et aux fréquences UHF. Au cours des travaux de la thèse, nous avons fait évoluer le banc expérimental afin de mesurer les fréquences de transition f_{x01} et f_{x02} de cellules individuelles au sein d'une population, pour souligner expérimentalement la plus-value de la UHF-DEP. Dans cette partie, nous évoquerons brièvement la conception de l'outil de caractérisation ainsi que son principe de fonctionnement.

II.1. Design et banc expérimental du système de caractérisation cellulaire

Afin d'identifier la signature diélectrophorétique des cellules, c'est-à-dire les fréquences de transition BF f_{x01} et UHF f_{x02} , la stratégie mise en place est de capturer individuellement une cellule dans une cage électrique puis d'étudier ses mouvements en réaction à la modification de la fréquence du signal appliqué, et ainsi de pouvoir en particulier mesurer ses fréquences de transition.

II.1.1. Design du système de caractérisation cellulaire

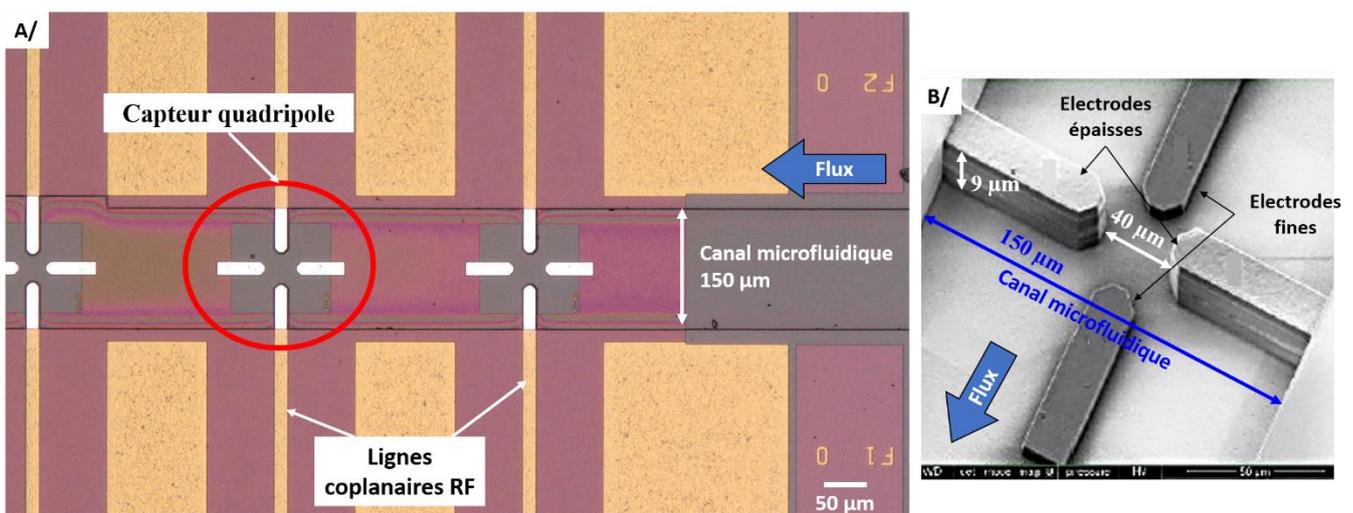


Figure II.1 : (A) Photo du capteur quadripôle implémenté sur une puce BiCMOS avec un canal microfluidique ; (B) Image en microscopie électronique à balayage (MEB) du capteur.



On utilise un laboratoire sur puce en technologie BiCMOS⁶ avec un capteur passif implémenté au sein d'un réseau microfluidique comme présenté sur la Figure II.1A. Ce laboratoire sur puce permet donc l'électro-manipulation d'une cellule individuelle. Pour ce faire, une structure composée de quatre électrodes placées à 90° les unes par rapport aux autres est utilisée pour générer un champ électrique non-uniforme en amplitude. Ce quadripôle est placé au fond d'un canal microfluidique qui permet de faire circuler la suspension cellulaire au-dessus du capteur. Afin de ne pas perturber l'écoulement du fluide et de ne pas obstruer le canal lors du passage de la suspension cellulaire, les deux électrodes parallèles au sens de circulation du flux (en gris foncé sur la Figure II.1B) sont très fines. Leur épaisseur est de 0,45µm. Ces électrodes sont reliées à la masse. L'autre paire d'électrodes perpendiculaires au canal est plus épaisse avec 9µm d'épaisseur afin de garantir un champ suffisamment intense et homogène sur la hauteur du canal microfluidique. Ces électrodes sont simultanément polarisées avec le même signal radiofréquence (RF) monofréquence à ondes continues (CW) afin de générer le gradient de champ désiré comme nous le verrons au paragraphe suivant.

L'espace entre les électrodes est choisi de façon à atteindre un compromis entre la possibilité de générer une force DEP suffisante pour piéger efficacement les cellules biologiques avec une faible tension appliquée aux bornes des électrodes et celle d'observer le déplacement de la cellule dans la cage électrique. Sachant que le diamètre moyen des cellules eucaryotes humaines est de 20µm, un bon compromis est d'utiliser un gap inter-électrodes de 40µm. La tension appliquée est choisie pour éviter les phénomènes d'électro-perméabilisation. A partir d'un certain seuil d'intensité du champ électrique, la cellule peut être perméabilisée, ce qui signifie que des pores apparaissent dans sa membrane et ce phénomène peut être irréversible et entraîner la mort cellulaire. De plus, cela peut entraîner des échanges entre le milieu extérieur et le contenu cellulaire interne qui aurait un impact sur la mesure des fréquences de transition. Pour des cellules eucaryotes, ce seuil de perméabilisation est d'environ 1kV_{RMS}/cm [2]. La norme du champ électrique simulée dans chaque compartiment de la cellule (cf Chapitre I pour les paramètres diélectriques) en fonction de la tension appliquée aux bornes des électrodes du quadripôle est présentée Figure II.2. A basse fréquence, on peut constater qu'à partir de 2,2 V_{RMS}, le seuil de perméabilisation de la membrane plasmique est franchi, cela risque d'endommager les cellules en créant des pores dans la membrane cellulaire. Cela favoriserait ainsi les échanges de liquide entre le milieu externe et le cytoplasme, modifiant la signature électromagnétique des cellules. Cependant à haute fréquence, cette problématique intervient à plus haute tension à environ 12 V_{RMS}.

⁶ Ce laboratoire-sur-puce est réalisé par IHP Microelectronics (<https://www.ihp-microelectronics.com/>)



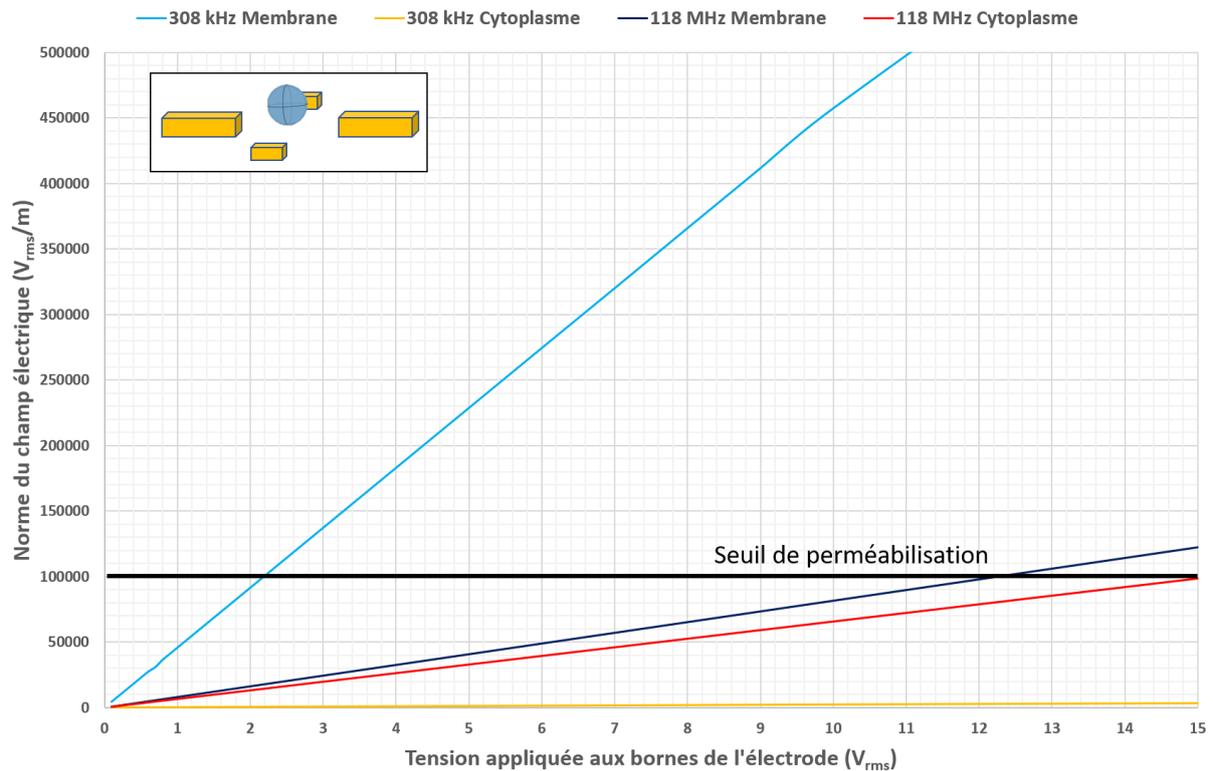


Figure II.2 : Influence de la tension RMS appliquée aux bornes des électrodes (encadré) sur l'intensité du champ électrique dans la membrane plasmique et dans le cytoplasme aux deux fréquences de transition ($f_{x01} = 308\text{kHz}$; $f_{x02} = 118\text{MHz}$) pour un gap inter-électrode de $40\mu\text{m}$

La puce BICMOS réalisée par IHP, est fabriquée sur un substrat en silicium avec une couche fine de SiO_2 . Le plan de masse ainsi que les électrodes sont en aluminium et ces dernières sont faites par une succession d'empilement de couches pour une structure épaisse. Le process de fabrication du microsystème est détaillé dans [3].

Le canal microfluidique qui permet de faire circuler la suspension cellulaire a une largeur de $150\mu\text{m}$ et une hauteur de $50\mu\text{m}$. Il est moulé dans du polydiméthylsiloxane (PDMS), polymère largement utilisé dans des applications allant de la recherche pharmaceutique et cosmétique à l'industrie alimentaire en passant par les applications biomédicales et électroniques pour l'encapsulation. De plus, c'est un matériau bon marché, biocompatible, transparent et sa fabrication est facile et rapide. La pièce de PDMS sert également de capot sur la puce afin de rendre l'ensemble du microsystème étanche. Le process de moulage sera décrit dans le chapitre III.



II.1.2. Banc expérimental du système de caractérisation cellulaire

Afin de mesurer les fréquences de transition BF et UHF, respectivement f_{x01} et f_{x02} , un banc expérimental dédié est utilisé et présenté dans la Figure II.3. Les cellules à caractériser sont tout d'abord suspendues dans un milieu adapté à la caractérisation DEP puis mises dans un Eppendorf relié à la puce microfluidique grâce à des capillaires de diamètre interne 250 μ m. La suspension cellulaire est injectée dans le microsystème par des contrôleurs de flux externes fonctionnant en pression afin de réguler la vitesse et de contrôler le mouvement des cellules dans le canal microfluidique.

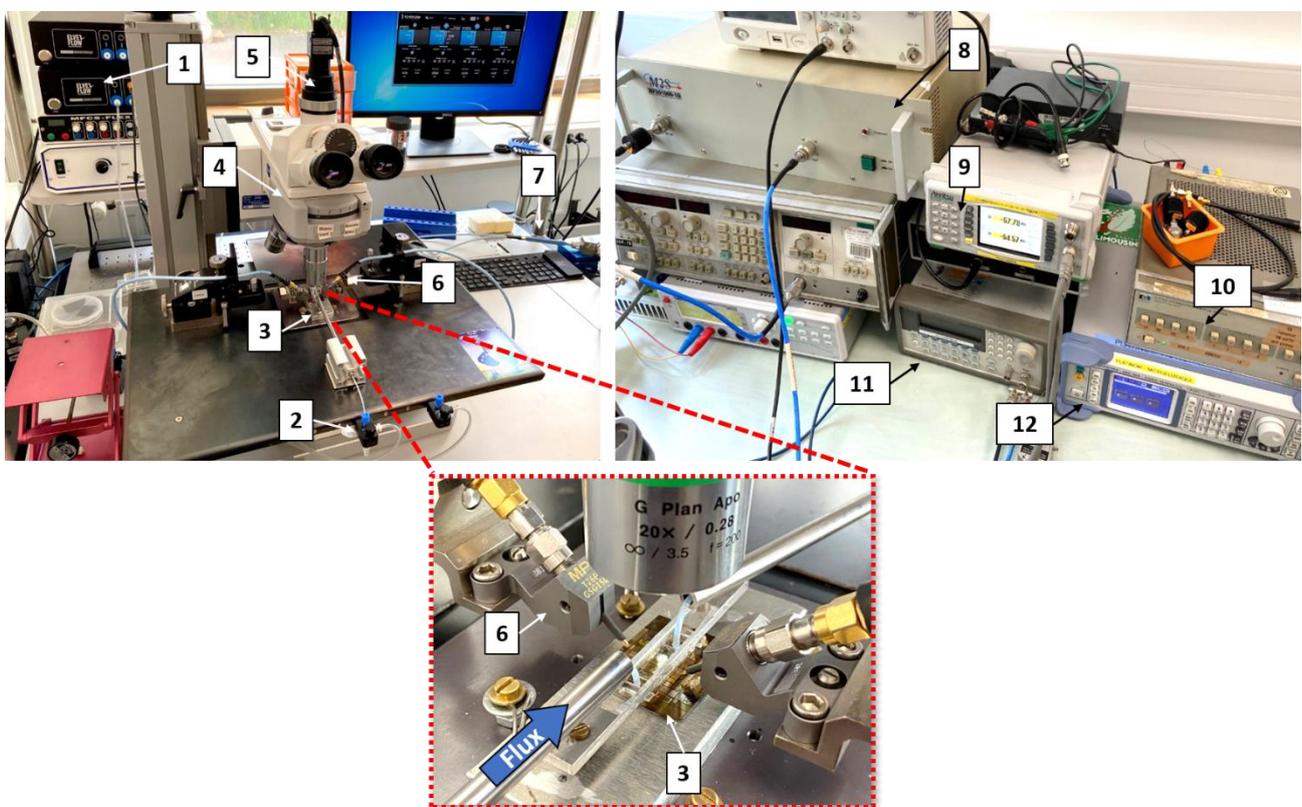


Figure II.3 : Banc expérimental utilisé pour les mesures des fréquences de transition BF et UHF. (1) contrôleur de flux externe Elveflow OB1 ; (2) suspension cellulaire ; (3) microsystème de caractérisation DEP, une image zoomée est présentée dans l'encadré rouge ; (4) microscope Scope.A1 Zeiss ; (5) Caméra AxioCam 105 color Zeiss ; (6) Sondes radiofréquences MPI TITAN T26P-GSG-150 ; (7) diviseur de puissance ; (8) amplificateur de puissance Bonn Elektrik BLWA 100-5M ; (9) puissance-mètre Anritsu ML2496A ; (10) commutateur 11713A HP ; (11) générateur basse fréquence Agilent 33150A ; (12) générateur radiofréquence SMB 100A Rhode & Schwarz



Pour mesurer la première fréquence de transition f_{x01} , un signal basse fréquence est généré par le générateur Agilent (n°11) dont la gamme de fréquence est comprise entre 1 μ Hz et 80MHz. Ensuite, de façon à pouvoir mesurer les fréquences de transition BF et UHF avec le même banc expérimental, un commutateur est inséré dans le montage (n°10).

Afin de mesurer la fréquence de transition f_{x02} , un signal haute fréquence est produit grâce au générateur radiofréquence Rhode & Schwarz (n°12) dont la gamme de fréquence est de 9 kHz à 1,1 GHz, qui est ensuite amplifié avec un amplificateur de gain 40 dBm (n°8).

Le signal appliqué est ensuite guidé vers un diviseur de puissance (n°7) afin de polariser simultanément avec le même signal la paire d'électrodes épaisses. Rappelons que les électrodes fines sont connectées à la masse. Le signal est amené jusqu'au capteur quadripolaire grâce à des lignes coplanaires dont la géométrie est choisie pour maintenir une adaptation d'impédance de 50 Ω . Ces lignes permettent d'injecter le signal grâce à des pointes RF (n°6).

II.2. Détermination des fréquences de transition f_{x01} et f_{x02} à l'aide du capteur électromagnétique

Comme expliqué dans le chapitre précédent, sous l'effet d'un champ électrique, les cellules biologiques deviennent polarisables et se voient soumises à des forces diélectrophorétiques suffisamment intenses pour provoquer un déplacement. Le phénomène de diélectrophorèse est lié aux propriétés diélectriques (conductivité et permittivité) de la cellule, du milieu de suspension, de la taille de la cellule et de l'amplitude et de la fréquence du signal appliqué. Tous ces paramètres sont compris dans le facteur de Clausius-Mossotti dont la partie réelle détermine l'orientation de la force DEP et donc détermine l'orientation du déplacement de la cellule (Figure II.4A).

Sur la Figure II.4B, la simulation Comsol Multiphysics montre la distribution de l'intensité du champ électrique lorsque le capteur est polarisé à 1Vpp. Le résultat de la figure est le même quel que soit la fréquence appliquée car la simulation numérique est réalisée en régime statique. On peut voir qu'au centre du quadripôle, l'intensité du champ électrique est plus faible, créant ainsi une cage électrique où la cellule peut être piégée en nDEP. En effet, si la cellule exhibe un comportement nDEP ($\text{Re}(f_{cm}) < 0$), la force DEP est répulsive. Alors la cellule sera repoussée vers des zones de champ faible (en bleu), c'est-à-dire au centre du quadripôle. Si, en revanche, la cellule présente un comportement pDEP ($\text{Re}(f_{cm}) > 0$), la force DEP est alors attractive. Il en résulte que la cellule sera donc attirée vers les zones de champ fort (en rouge sur la Figure II.4B), c'est-à-dire vers l'un des bords des électrodes.



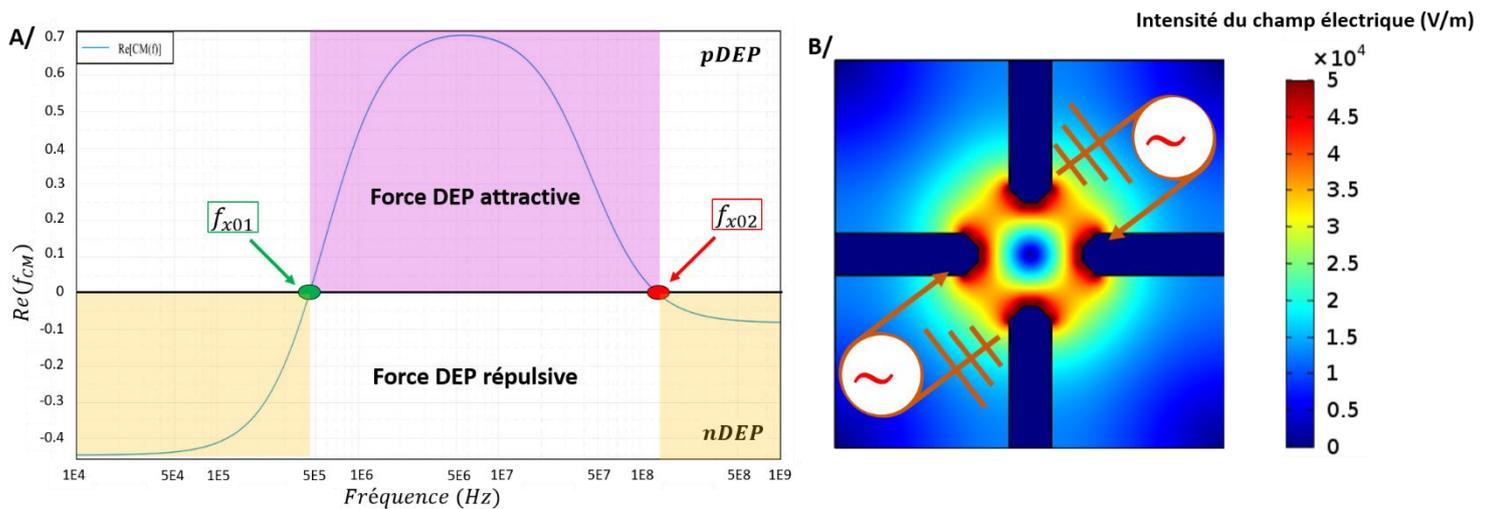


Figure II.4 : Principe de la mesure de la fréquence de transition. (A) Graphique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti ; (B) Simulation numérique du capteur-quadripôle polarisé. L'échelle des couleurs représente l'intensité du champ électrique.

Ainsi, en changeant la fréquence du signal appliqué, il est possible de modifier le comportement de la cellule et donc de provoquer son déplacement dans la zone du gradient de champ électrique élevé, permettant ainsi de mesurer les deux fréquences de transition afin d'obtenir la signature DEP des cellules biologiques d'intérêt.

Nous allons à présent détailler la méthodologie mise au point pour faire cette mesure.

Tout d'abord, les cellules sont amenées vers la zone de caractérisation, c'est à dire au plus près du capteur-quadripôle, grâce aux contrôleurs de flux externes. Lorsqu'une cellule se présente naturellement au centre du quadripôle comme sur la première photo de la Figure II.5, le flux est temporairement stoppé et stabilisé afin de procéder à la mesure de la fréquence de transition sans que celui-ci ne vienne perturber le déplacement de la cellule. En effet, il faut éviter la compétition entre les différentes forces de déplacement (force DEP et la force de traînée imposée par le flux), afin que la cellule ne soit soumise uniquement à la force diélectrophorétique et la gravité naturelle.

Ensuite, le champ électrique est donc généré par l'application de la tension aux électrodes du capteur qui sont tout d'abord polarisées avec un signal haute fréquence généré à environ 500 MHz. Dans cette gamme de fréquence, on s'attend à : (i) ce que la cellule présente un comportement nDEP et (ii) que son facteur de Clausius-Mossotti soit suffisamment loin de la fréquence de transition afin de générer un piégeage efficace (Figure II.4A). La force DEP est alors répulsive et la cellule se retrouve piégée dans la cage électrique au centre du quadripôle, comme le montre la première photo de la Figure II.5. Ensuite, la fréquence du signal appliquée est diminuée. La valeur du facteur de Clausius-Mossotti se



rapproche alors de la fréquence de transition UHF (f_{x02} : passage à 0 sur l'axe des abscisses). La force DEP, toujours répulsive, diminue donc progressivement pour s'annuler complètement à f_{x02} puis commence à devenir attractive, on peut alors observer un premier mouvement de la cellule (deuxième photo de la Figure II.5). Finalement, la cellule est attirée complètement vers l'un des bords des électrodes latérales (dernière photo de la Figure II.5). Ainsi, on peut faire varier la fréquence du signal d'un état répulsif au centre du capteur DEP à un état attractif. La fréquence de transition f_{x02} peut être déterminée visuellement avec un microscope à partir du mouvement de la cellule qui passe d'un comportement nDEP à un comportement pDEP.

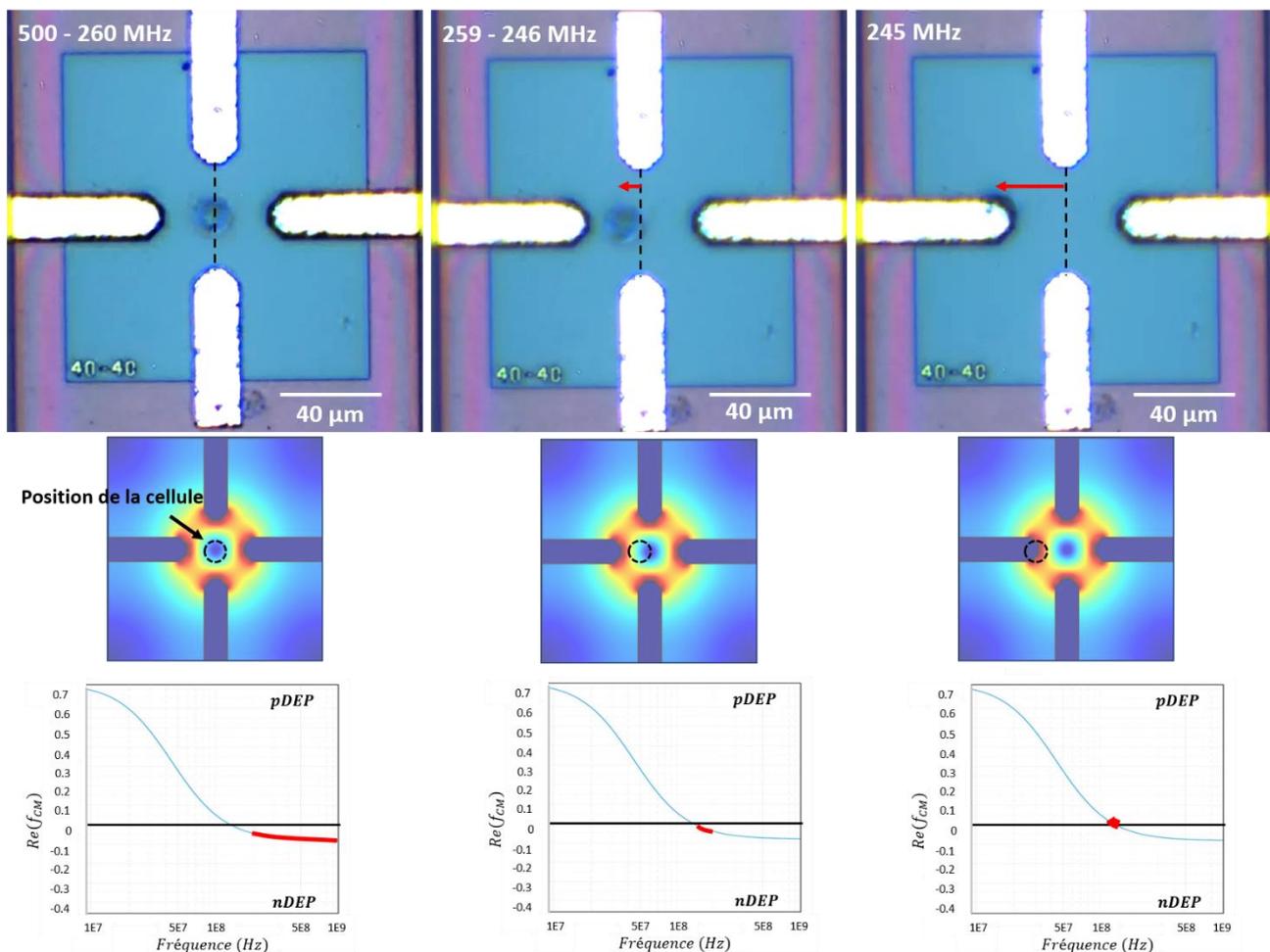


Figure II.5 : Caractérisation DEP-UHF d'une cellule de lignée SW480 grâce au capteur-quadripôle polarisé avec un signal haute fréquence CW. La seconde fréquence de transition f_{x02} est mesurée à 245MHz.

Afin d'identifier précisément f_{x02} , la fréquence du signal est d'abord diminuée par pas de 10MHz afin d'approcher la valeur de la fréquence de transition. Ensuite, la fréquence du signal est balayée lentement par pas de 1MHz pour observer le mouvement de la cellule. Cette étape est répétée une fois de plus afin de déterminer avec précision f_{x02} . Par la suite, la cellule est repoussée au centre du



quadripôle en augmentant la fréquence du signal. Le générateur de signal haute fréquence est éteint et grâce au commutateur, un signal basse fréquence est injecté dans le microsystème pour déterminer la première fréquence de transition f_{x01} de la même cellule capturée. La même démarche pour la caractérisation de f_{x02} est utilisée pour la mesure de f_{x01} . Le signal basse fréquence est appliqué à 20kHz afin d'observer le comportement nDEP de la cellule. Puis, la fréquence est augmentée par pas de 10kHz jusqu'à observer le mouvement d'attraction de la cellule vers l'un des bords des électrodes avant de balayer lentement la fréquence par pas de 1kHz pour avoir une valeur précise de la fréquence de transition BF. Par la suite, le champ électrique est éteint et la pression d'écoulement de l'entrée de la puce est augmentée pour libérer la cellule qui vient d'être caractérisée et pour renouveler la suspension cellulaire dans le canal microfluidique. Une nouvelle cellule est piégée et caractérisée en suivant la même méthode que décrite précédemment.

La précision de mesure des deux fréquences de transition f_{x01} et f_{x02} est respectivement de 1kHz et de 1MHz. Cependant, en raison de l'hétérogénéité biologique au sein d'une même population de cellules, les fréquences de transition peuvent présenter une gamme de variation plus ou moins large. Plusieurs paramètres biologiques peuvent expliquer l'hétérogénéité biologique d'une lignée cellulaire. Dans le cas de nos mesures, deux semblent prédominants. La variabilité de taille des cellules au sein d'une lignée est une première explication, qui en particulier à basse fréquence, impacte nécessairement la mesure des fréquences de transition [4]. En hautes fréquences, la mesure devient particulièrement sensible au contenu intracellulaire et donc au rapport nucléo-cytoplasmique des cellules. Or, pendant la culture cellulaire, le cycle de division cellulaire n'est pas synchronisé entre chaque cellule, ce qui engendre des rapports nucléo-cytoplasmiques pouvant varier au sein de la lignée cellulaire [5]. Il est donc nécessaire, afin de consolider les données et de prendre en compte cette hétérogénéité naturelle qui existe en biologie, de faire un traitement statistique des données et ce en intégrant plusieurs échantillons. Ainsi, la signature électromagnétique d'une population cellulaire sera mesurée en triplicata. En effet, cela permettra d'éprouver la robustesse de notre outil de caractérisation DEP quant à l'hétérogénéité naturelle présente dans une population cellulaire. Les résultats concernant la répétabilité des campagnes de mesures sont présentés en Annexe.

III. Conditions expérimentales

Après la description de la méthode de caractérisation DEP, nous allons détailler les conditions expérimentales. En effet, le microsystème mesure les signatures électrométriques de cellules biologiques dont les lignées ont été sélectionnées par rapport aux objectifs scientifiques du projet. Elles doivent également être préparées dans un milieu de suspension adapté à la caractérisation diélectrique puisque,



comme nous l'avons vu, les propriétés du milieu de suspension jouent un rôle dans la valeur du facteur de Clausius-Mossoti. La culture des différents types cellulaires et les protocoles biologiques ont été réalisés par Elodie Barthout, doctorante au laboratoire UMR 1308 INSERM - CAPTuR Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique de l'Université de Limoges. Nous travaillons en binôme dans le cadre du projet Oncosome Track.

III.1. Préparation du milieu de suspension cellulaire pour la caractérisation par UHF-DEP

Le facteur de Clausius-Mossotti dépend des propriétés diélectriques de la cellule biologique et du milieu de suspension. Dans le Chapitre 1, nous avons étudié l'influence des conductivités et des permittivités de la membrane et du contenu interne de la cellule ainsi que l'épaisseur de la membrane plasmique afin d'identifier les différentes fréquences de transition f_{x01} et f_{x02} . Or, comme nous l'avons vu, le facteur CM dépend aussi de la conductivité et de la permittivité du milieu de suspension. Par la suite, nous étudierons donc l'influence de ces paramètres afin d'obtenir un milieu de suspension optimal et adapté à la caractérisation DEP.

La Figure II.6 montre l'évolution du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence du signal lorsque la conductivité et la permittivité du milieu de suspension varient. Le modèle cellulaire utilisé dans le calcul du facteur CM est le même que pour le Chapitre 1, et les paramètres utilisés pour modéliser la cellule biologique sont résumés dans le Tableau I.1. Dans un premier temps, nous faisons varier la valeur de la permittivité relative du milieu ϵ_m entre 40 et $90\epsilon_0$ F.m⁻¹. On peut observer de fortes variations de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti vers les hautes fréquences. Lorsque la permittivité relative diminue, on constate une augmentation de la fréquence de transition f_{x02} . On peut remarquer que lorsque la valeur de la permittivité relative du milieu se rapproche de la valeur de la permittivité relative du contenu interne, aucune fréquence de transition n'apparaît. Il est donc important que le milieu de suspension ait une permittivité élevée afin d'obtenir une plus faible valeur du facteur CM en nDEP. En effet, il sera plus facile d'observer la répulsion de la cellule au centre du quadripôle si la force DEP repousse plus fortement la cellule. Le constituant de base du milieu de suspension est l'eau déionisée. Sa permittivité dans les gammes de fréquences d'intérêt et à une température ambiante de 25°C est de $78\epsilon_0$ F.m⁻¹ [6].

Concernant la conductivité du milieu de suspension, nous la faisons varier entre 20 et 500 mS.m⁻¹, les variations de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti s'opèrent dans le régime des basses et moyennes fréquences et affecte donc la valeur de la fréquence de transition f_{x01} . De plus, lorsque la conductivité du milieu externe est élevée et proche de la valeur de la conductivité du contenu



intracellulaire, la cellule ne présente pas de comportement pDEP et donc elle n'a pas de fréquences de transition à basse et à haute fréquence. Il est important pour la caractérisation DEP que la cellule biologique puisse réagir en pDEP et en nDEP. Nous avons donc fait le choix de fixer une valeur faible pour la conductivité du milieu qui devra se situer autour de 20 mS.m⁻¹.

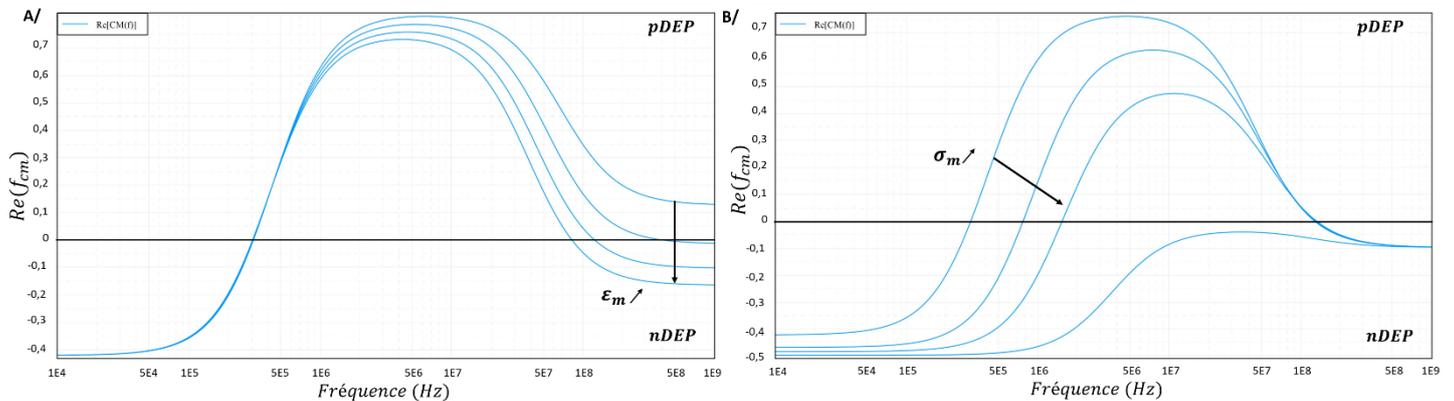


Figure II.6 : Simulation numérique de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti avec le logiciel myDEP pour évaluer l'influence des paramètres diélectriques du milieu de suspension. (A) Effet de la variation de la permittivité relative du milieu ($\epsilon_m = 40 ; 60 ; 80 ; 90 \epsilon_0 \text{ F.m}^{-1}$). (B) Effet de la conductivité du milieu de suspension ($\sigma_m = 20 ; 50 ; 100 ; 500 \text{ mS.m}^{-1}$)

Le milieu de suspension adapté à la caractérisation DEP est donc de faible conductivité mais doit permettre la survie des cellules dans ce milieu pendant au moins quelques heures. Pour cela, il est nécessaire de contrôler le phénomène d'osmose qui est responsable de la diffusion des molécules, solvants et ions entre le milieu extérieur et le cytoplasme de la cellule. Lorsque le milieu de suspension est dit hypotonique, la concentration en solutés est inférieure à celle du cytoplasme, et par osmose, l'eau pénètre dans la cellule. Cela a pour conséquence le gonflement puis l'éclatement de la cellule entraînant sa mort. En revanche, lorsque le milieu de suspension est dit hypertonique, la concentration en solutés est supérieure à celle du cytoplasme, et par osmose, la cellule perd de l'eau. Par conséquent, la cellule biologique rétrécit et se rétracte sur elle-même, entraînant des dysfonctionnements puis la mort cellulaire. Il est important alors de favoriser un milieu osmotique équilibré pour s'assurer de la viabilité des cellules biologiques. Dans le corps humain, l'osmolarité est comprise entre 280 et 300 mOsM [7].

Pour fabriquer le milieu de suspension adapté à la caractérisation DEP, nous utilisons donc de l'eau déionisée suppléée par du sucre pour rendre le milieu osmotique. Le pH de la solution est mesuré avec un pH-mètre étalonné (Mettler Toledo) et ajusté avec de l'acide chloridrique autour de 7,4 pour respecter les conditions physiologiques. Puis la conductivité du milieu est mesurée avec un conductimètre (VWE pHenomenal CO 3100L), elle devra être comprise entre 20 et 30 mS.m⁻¹. Ainsi, avec ce milieu que nous appellerons par la suite « milieu DEP », la viabilité des cellules biologiques est bonne et maintenue à minima pendant 4 heures, ce qui permet de mesurer les fréquences de transition



f_{x01} et f_{x02} d'une même cellule dans des conditions optimales garantissant qu'au cours d'une campagne d'expériences, les mesures des fréquences de transition ne sont pas perturbées (cf Annexe).

III.2. Choix des lignées cellulaires étudiées

On désigne généralement le cancer comme étant la maladie résultante d'un dysfonctionnement cellulaire entraînant leur prolifération anarchique. Cependant, il serait plus judicieux de parler « des » cancers dans la mesure où différents organes peuvent être touchés. De plus, le cancer ne sera pas le même suivant le type cellulaire dysfonctionnant dans l'organe. C'est pourquoi il est nécessaire de choisir des lignées cellulaires cancéreuses représentatives de la cible à traiter. Concernant le projet Oncosome Track, deux cancers sont principalement étudiés : le glioblastome et le cancer colorectal.

III.2.1. Lignée cellulaire du glioblastome

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale la plus agressive et est souvent associée à un mauvais pronostic avec une survie moyenne d'environ 15 mois après le diagnostic. Chaque année, 240 000 tumeurs du cerveau sont diagnostiquées dans le monde entier [8]. Une lignée cellulaire très souvent associée à cette pathologie est la lignée U87-MG, dérivée d'un glioblastome adulte de grade IV. Cette lignée avait été notamment utilisée dans le cadre du projet européen SUMCASTEC à des fins de caractérisation [9], [10] et de tri cellulaire [11]. Cette lignée cellulaire servira donc de lignée de référence lors de la prise en main et de l'optimisation des mesures de fréquences de transition avec le microsystème de caractérisation DEP présenté dans la partie précédente.

La lignée U87-MG provient de la source American Type Culture Collection (ATCC), qui commercialise des lignées cellulaires immortalisées issues de patients.

III.2.2. Lignées cellulaires du cancer colorectal

Le type de cancer autour duquel le projet Oncosome Track est centré est le cancer colorectal (CCR). Selon Santé Publique France⁷, le cancer colorectal est fréquent et représente la deuxième cause de décès par cancer autant chez l'homme que chez la femme.

⁷ <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-colon-rectum>



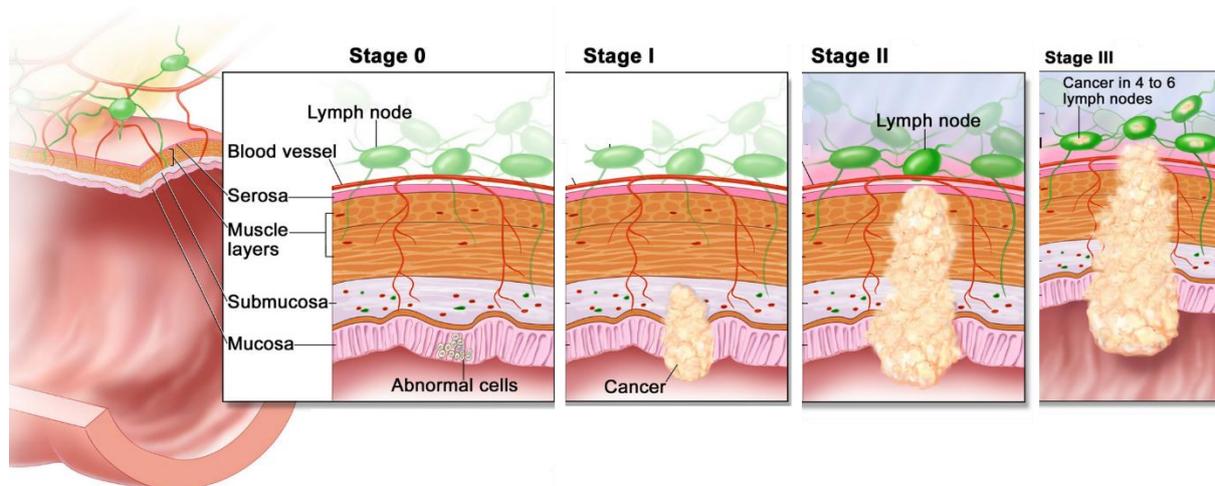


Figure II.7 : Illustration de l'invasion tumorale de la muqueuse du côlon à différents stades du cancer [12]

Les cellules de deux lignées cellulaires sont étudiées et caractérisées dans le cadre de ces travaux de thèse. Les SW480 sont issues d'une lignée cellulaire du cancer colorectal dérivée d'un adénocarcinome primaire adulte. Cette lignée provient d'un cancer de stade II qui représente un certain envahissement de la muqueuse de la paroi du côlon sur la Figure II.7. Les SW620 sont issues d'une lignée cellulaire isolée d'un ganglion lymphatique d'origine métastatique. Cette lignée représente un cancer de stade III, donc considérée comme plus agressive que les SW480. L'intérêt d'avoir choisi ces deux lignées est qu'elles sont dérivées d'une tumeur provenant du même patient mais prélevées avec un an d'écart. On émet donc l'hypothèse que les deux lignées représentent la continuité de la progression tumorale, il apparaît donc pertinent de comparer leurs signatures électromagnétiques. Les lignées SW480 et SW620 proviennent également de la source American Type Culture Collection (ATCC).

De plus, dans la perspective d'une première étape vers des expériences cliniques, des cellules de CCR ont été isolées et cultivées à partir de tumeurs de patients, c'est ce que l'on appelle des cultures primaires. Contrairement aux lignées commerciales, ces cellules ne sont pas immortalisées, ce qui les rend plus sensibles au milieu de culture. En effet, les cellules des cultures primaires ont un nombre de divisions cellulaires limité et sont soumises au phénomène de sénescence, c'est-à-dire le vieillissement cellulaire en raison de la lente dégradation des fonctions spécifiques. La classification de ces cellules se fait selon le référentiel TNM (Tumeur primaire, Ganglions lymphatiques régionaux, Métastases) [13] qui permet d'établir un diagnostic du stade de la tumeur. Les cultures sélectionnées issues de l'essai clinique [14] sont les tumeurs primaires suivantes :

- CPP14 : T2N0M0 cela signifie que la tumeur primaire a envahi la muscularis propria (muscle layer sur la Figure II.7), une couche musculaire épaisse et plus profonde qui se contracte pour faire avancer le contenu des intestins. La tumeur n'a pas atteint les



ganglions lymphatiques proches du côlon ni d'autres organes pour développer des métastases. La culture primaire CPP14 correspond à un stade I.

- CPP35 : T4aN0M0 cela signifie que la tumeur primaire a envahi le péritoine viscéral (serosa sur la Figure II.7). C'est une couche mince de cellules qui maintient les organes en place et sert de structure de support pour les vaisseaux sanguins, lymphatiques et les nerfs des organes. De plus, il n'y a pas de métastases régionales dans les ganglions lymphatiques et aucun signe de tumeur dans des sites ou organes distants. La culture primaire CPP35 correspond à un stade II.
- CPP6 : T4N2M1 cela signifie que la tumeur primaire a envahi directement d'autres organes ou structures. Le nombre de métastases ganglionnaires régionales est supérieur ou égal à 4 et il existe des métastases ganglionnaires à distance. La culture primaire CPP6 correspond à un stade IV

Le Tableau II.1 résume les différentes lignées cellulaires et cultures primaires utilisées lors de nos travaux ainsi que leurs caractéristiques.

Tableau II.1 : Tableau des caractéristiques des modèles cellulaires caractérisés dans ces travaux de thèse

| | U87-MG | SW480 | SW620 | CPP14 | CPP35 | CPP6 |
|---------------------------|---------|-------|----------------------|--------|---------|---|
| <i>Tissu d'origine</i> | Cerveau | Côlon | Ganglion lymphatique | Côlon | Côlon | Côlon |
| <i>Métastase associée</i> | / | SW620 | / | / | / | Ganglions lymphatiques régionaux et distant |
| <i>Stade</i> | IV | II | III | I | II | IV |
| <i>Culture primaire</i> | / | / | / | T2N0M0 | T4aN0M0 | T4N2M1 |

III.3. Préparation cellulaire et extraction des oncosomes

Comme pour les tumeurs, les lignées cancéreuses sont hétérogènes et contiennent en très petite proportion des CSCs [15]. Cependant afin d'analyser les cellules souches, il est nécessaire d'en enrichir la population afin d'établir leur signature électromagnétique. Pour ce faire, la population cellulaire est cultivée dans un milieu adapté pour favoriser la survie et la multiplication des CSCs au détriment des autres cellules différenciées amenées à mourir ou à s'indifférencier. Dans un deuxième temps, nous



évoquerons les protocoles d'extraction des oncosomes et leur incubation avec des cellules afin d'observer un potentiel transfert d'agressivité et une transformation oncogénique des cellules cancéreuses différenciées.

III.3.1. Enrichissement de la population en cellules souches cancéreuses

III.3.1.a. Par des milieux induisant différents phénotypes

Afin d'encourager la prolifération des CSCs, il est nécessaire de cultiver les cellules cancéreuses avec des conditions plus contraignantes. Ce milieu, appelé milieu défini (DM), favorise l'enrichissement de la population en CSCs, soit en induisant une indifférenciation des cellules cancéreuses soit en sélectionnant seulement les cellules capables de survivre dans de telles conditions, c'est-à-dire les cellules indifférenciées.

Dans le cas du GBM, les U87-MG sont cultivées dans le milieu DMEM/F12 suppléé de 0,6% de glucose, 1% de bicarbonate de sodium, de 1% d'acides-aminés non essentiels MEM, 5mM de HEPES, 9,6 µg/mL de putrescine, 10 µg/mL de ITSS, 0,063 µg/mL de progestérone, 60 µg/mL de N-acétyl-L-cystéine, 2 µg/mL d'héparine, 0,1 mg/mL de pénicilline/streptomycine, 50X B-27 suppléé sans vitamine A, 20 ng/mL d'EGF (Epidermal Growth Factor) et 20 ng/mL bFGF (basic Fibroblast Growth Factor).

Le milieu n'induisant pas d'indifférenciation est appelé milieu normal (NM) et est composé de DMEM suppléé par 10% de sérum fœtal de veau (SVF), 2mM de glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine.

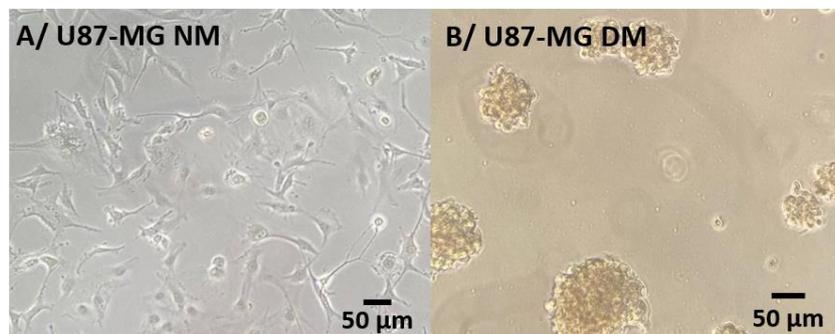


Figure II.8 : Photos de cultures dans des boîtes de pétri de la lignée du glioblastome U87-MG cultivées dans deux conditions : (A) milieu normal (NM) et (B) milieu défini (DM).



Dans le cas du CCR, les SW480 et les SW620 sont cultivées dans le milieu DMEM/F12 suppléé de 20 ng/mL d'EGF, 20 ng/mL de bFGF, 5 µL/mL d'insuline, 1X N-2 de supplément, 100U de pénicilline et 0,1 mg/mL de streptomycine. Le milieu n'induisant pas d'indifférenciation est appelé milieu normal (NM) et est composé de RPMI 160 suppléé par 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de pyruvate de sodium.

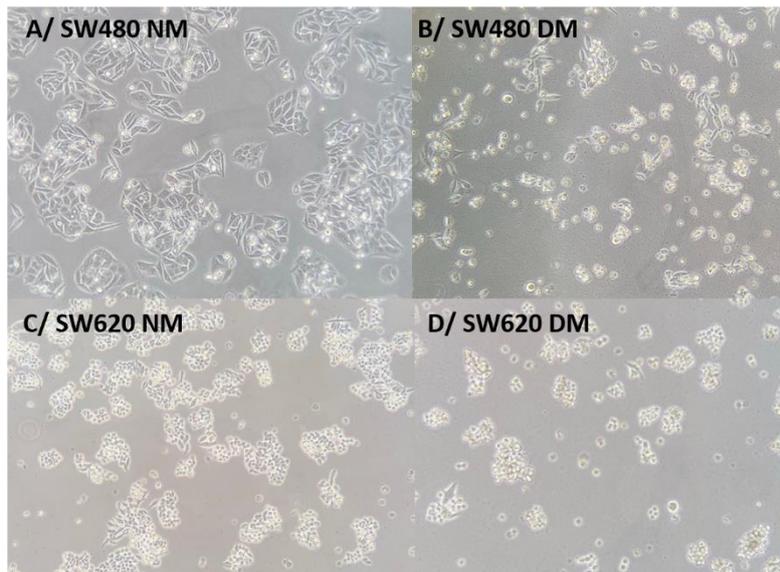


Figure II.9 : Photos de cultures dans des boîtes de pétri des lignées du cancer colorectal SW480 et SW620 cultivées dans deux conditions : (A)&(C) milieu normal (NM) et (B)&(D) milieu défini (DM).

Les Figures II.8 et II.9 montrent l'aspect des lignées du glioblastome et du cancer colorectal respectivement, cultivées dans une boîte de pétri dans le milieu normal et le milieu défini. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C avec une atmosphère humide enrichie avec 5% de dioxyde de carbone. Des changements morphologiques peuvent être observés au microscope entre les deux conditions de culture. La morphologie des cellules cultivées en milieu DM est complètement différente des cellules du milieu NM. Dans le milieu normal, les cellules sont étalées dans la boîte de pétri, alors que dans le milieu défini, les cellules développent la capacité de former des sphères en raison de la présence de facteurs de croissance spécifiques (EGF et bFGF-2). Ces facteurs de croissance sont nécessaires pour l'expansion clonale et la formation de sphères [15]. Il est connu que les cellules souches neurales cultivées *in vitro* ont la capacité de générer des structures clonales appelées « neurosphères » [16]. Il en va de même pour les cultures des lignées SW480 et SW620 qui sont capables de former ce qu'on appelle des « colonosphères » [17]. Les sphères sont composées d'une profusion de cellules agrégées, dont le cœur est nécrotique due à la densité des cellules, qui empêche la diffusion des facteurs de croissance vers les cellules les plus internes [15]. Même si morphologiquement dans le milieu de culture, les cellules présentent un aspect différent suivant leur caractéristique souche ou non (DM vs



NM), il est nécessaire de casser les sphères pour caractériser individuellement les cellules avec l'outil quadripôle UHF-DEP. De ce fait, une fois re-suspendues dans le milieu adapté pour la caractérisation, toutes les cellules apparaissent rondes comme sur la photo de la Figure II.5, et ne possèdent pas de différences significatives en termes de morphologie. La distinction entre une cellule différenciée et une cellule cancéreuse souche ne peut pas être directement observée à l'aide d'un microscope. L'idée de sonder le milieu intracellulaire par la diélectrophorèse apparaît alors plus pertinent.

On s'attend à ce que le milieu défini induise un phénotype indifférencié et sélectionne les cellules souches cancéreuses alors que pour le milieu normal, on suppose que la grande majorité des cellules cancéreuses sont différenciées et qu'il y aura très peu de CSCs. Afin de confirmer l'enrichissement des cellules indifférenciées dans le milieu DM, une analyse transcriptomique comparative du phénotype souche a été réalisée.

III.3.1.b. Analyse transcriptomique comparative

Afin d'attester de la présence majoritaire de cellules souches cancéreuses, toute une batterie de tests biologiques fonctionnels est réalisée en parallèle de l'étude de l'expression des marqueurs souches immuno-fluorescents par Elodie Barthout. En effet, avant leur caractérisation DEP, il est essentiel de connaître l'état phénotypique des cellules afin de le corrélérer à la signature DEP. Les tests fonctionnels pouvant durer plusieurs semaines portent sur :

- la prolifération cellulaire : comptage de cellules à T0, puis à 24h dans le milieu de culture adapté. On s'attend à ce que les CSCs soient moins proliférantes que les cellules différenciées.
- les phases du cycle cellulaire : détermination de l'état de la population (phase G0/G1 : phase d'attente/quiescence ; phase S : réplication du matériel génétique ; phase M : mitose/division cellulaire). Les résultats attendus dépendent du type de CSCs.
- la clonogénicité : capacité d'auto-renouvellement/à former des sphères. On compte le nombre de sphères, leur taille et le pourcentage de cellules formant des sphères. Les CSCs devraient former plus de sphères et de plus grosse taille.
- la résistance thérapeutique : une chimiothérapie (le 5-FU) est appliquée sur les cellules avec différentes concentrations et la toxicité est analysée en relevant la mort cellulaire. Les CSCs devraient montrer une résistance plus importante, c'est-à-dire à 50% de perte, la dose de médicament est plus élevée que pour des cellules différenciées.



- la migration cellulaire : en créant une « blessure » (zone sans cellule), on surveille la recolonisation de l'espace.
- l'invasion cellulaire : il s'agit quasiment du même protocole que pour la migration cellulaire sauf qu'après la création de la blessure, les cellules sont recouvertes d'un matrigel.

Seuls les tests concernant les immuno-marqueurs seront présentés dans ce manuscrit de thèse. Les autres tests font l'objet d'une publication en cours de soumission. La révélation des immuno-marqueurs se fait par une analyse transcriptomique afin d'attester de la présence majoritaire de CSCs dans la population cellulaire cultivée en milieu DM.

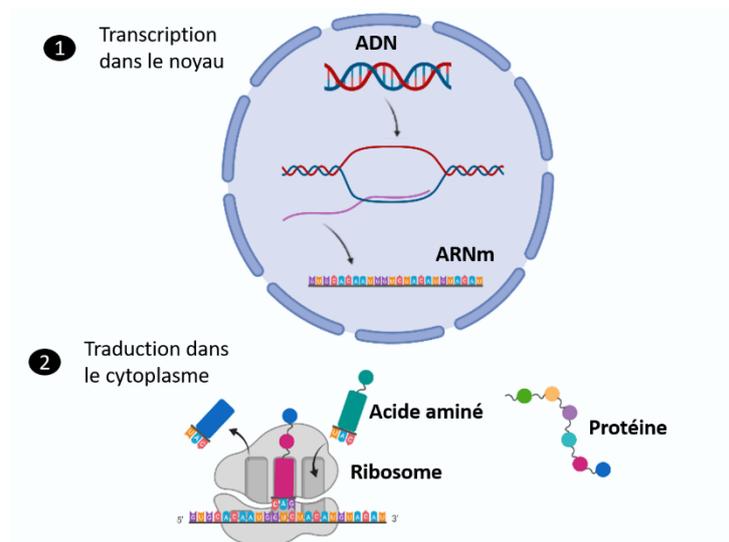


Figure II.10 : Principe de la synthèse de protéine (créé avec Biorender)

Afin de comprendre l'analyse transcriptomique, il est nécessaire de savoir comment sont synthétisées les protéines dans les cellules eucaryotes. Les protéines sont responsables de plusieurs rôles essentiels au bon fonctionnement de la cellule. La synthèse se déroule en deux étapes : la transcription dans le noyau et la traduction dans le cytoplasme. Comme présenté sur la Figure II.10, afin de transcrire l'information codant la protéine, c'est-à-dire le gène codant, la molécule d'ADN se sépare permettant la formation de la molécule d'ARN messager (ARNm) qui peut ainsi s'exporter dans le cytoplasme, lieu de la traduction. Cette étape consiste à fabriquer la protéine à partir de la séquence d'ARNm grâce à une protéine appelée ribosome. Cette dernière fait le lien entre trois nucléotides de l'ARNm et un acide-aminé composant la future protéine et lit la séquence dans l'ordre indiqué en défilant le long du brin d'ARNm. Un ARNm ne code qu'un seul type de protéine.



Le transcriptome est l'ensemble des ARNm présents dans le cytoplasme. Et donc l'analyse transcriptomique mesure la quantité d'ARNm cible dans le cytoplasme, avant que la protéine soit synthétisée. L'analyse du transcriptome étant réalisée par qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), il est nécessaire de lyser les cellules pour extraire leurs ARNm, c'est-à-dire qu'il est nécessaire de détruire la cellule afin d'accéder à son contenu interne. De plus, la technique de qPCR ne permet pas de quantifier le nombre de CSCs mais seulement de détecter leur présence ou non. Les marqueurs utilisés sont *CD133*, *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* and *Lgr5* et leurs expressions relatives sont analysées et présentées avec les signatures DEP dans la suite du chapitre.

III.3.2. Extraction et incubation des oncosomes

Afin d'évaluer le pouvoir de transformation oncogénique des oncosomes, il est nécessaire de les extraire du milieu de culture pour les mettre au contact avec d'autres cellules. Les EVs secrétées se trouvent dans le surnageant du milieu de culture. Ces nano vésicules sont purifiées par le protocole décrit dans [18]. Il a été décidé de récolter les EVs secrétées par 8 fois plus de cellules que la quantité cultivée pour l'exposition afin d'observer des changements représentatifs au niveau des immuno-marqueurs et par conséquent des signatures électromagnétiques.

Les conditions d'incubation des cellules cancéreuses avec des oncosomes ont été déterminées par la doctorante Elodie Barthout et l'équipe du laboratoire CAPTuR. Il a été choisi d'exposer des EVs secrétées par la lignée SW620, lignée métastatique dans le ganglion lymphatique considérée comme étant plus agressive, sur la lignée SW480 moins agressive. En effet, dans les conditions physiologiques, les EVs secrétées par une métastase du ganglion peuvent potentiellement circuler jusqu'à la tumeur primaire dans le côlon grâce au système lymphatique [19]. Les oncosomes secrétés par les cellules cancéreuses différenciées SW620 NM (cultivées en milieu normal) et cellules cancéreuses souches SW620 DM+ (cultivées en milieu défini) vont être exposés sur les cellules SW480 NM dans trois conditions différentes :

- Une dose d'EVs sur les cellules cibles, incubation pendant 24h puis caractérisation
- Une dose d'EVs sur les cellules cibles, incubation pendant 72h puis caractérisation
- Deux doses successives d'EVs sur les cellules cibles espacées de 24h, incubation pendant 72h après la première dose puis caractérisation



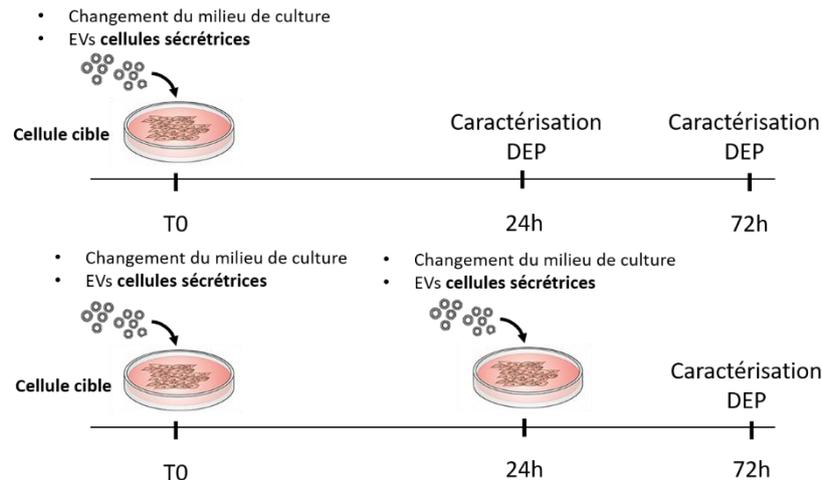


Figure II.11 : Plan des expériences et des conditions d'incubation des lignées cellulaires avec les EVs

IV. Discrimination du phénotype cellulaire grâce au microsysteme de caractérisation cellulaire : mise en avant du potentiel de la UHF-DEP

Dans cette partie seront présentés les résultats des signatures électromagnétiques des différentes lignées cellulaires ainsi qu'une corrélation avec la caractérisation biologique des marqueurs CSCs associés. Dans un premier temps, les lignées sont caractérisées avec l'outil DEP à basse et haute fréquence afin de confirmer la pertinence d'une montée en gamme pour identifier le phénotype indifférencié et souche. Puis après l'acquisition des signatures UHF-DEP des CSCs, nous exposerons les cellules cancéreuses différenciées aux EVs sécrétées par des CSCs puis nous les caractériserons selon le protocole de la Figure II.11.

IV.1. Identification de la signature UHF-DEP comme biomarqueur électromagnétique discriminant pertinent

Dans le Chapitre 1, nous avons démontré théoriquement que la gamme des basses fréquences (inférieure à 1MHz) est largement exploitée dans le tri et l'isolation des cellules en fonction de leurs tailles dû au fait que la signature électromagnétique f_{x01} est dépendante principalement de la dimension des cellules, ainsi que des propriétés membranaires. En montant en fréquence, à partir de 50MHz, l'onde électrique est capable de sonder le contenu intracellulaire, ce qui semblerait pertinent pour extraire des informations sur l'état de différenciation des cellules. Et ainsi, la fréquence de transition f_{x02} pourrait être exploitée en tant qu'indicateur électromagnétique discriminant pour le phénotype souche.



IV.1.1. Enrichissement en cellules cancéreuses souches dans le milieu défini DM

Comme évoqué précédemment, afin d'enrichir la suspension cellulaire en CSCs, les cellules sont soumises à des conditions exigeantes de survie dans le milieu défini (DM). Afin de confirmer le phénotype majoritaire au sein de la population cellulaire, des expériences de contrôle sont réalisées. Les résultats biologiques présentés ont été effectués par Elodie Barthout. Une analyse transcriptomique comparative des niveaux d'expression d'ARNm pour identifier le phénotype souche a été effectuée avec les cellules U87-MG et SW620 cultivées soit dans le milieu normal (NM) soit dans le milieu défini (DM) pendant 5 jours pour la lignée du glioblastome et pour la lignée du cancer colorectal.

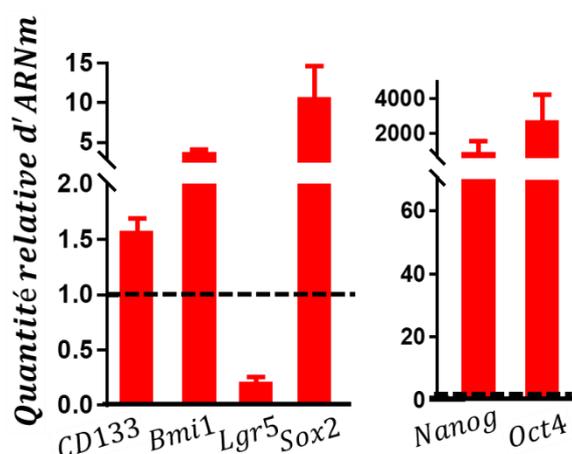


Figure II.12 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules cultivées en milieu normal (ligne pointillée) ou en milieu défini (en rouge) pour la lignée du cancer colorectal SW620

Les marqueurs CSCs utilisés sont *CD133*, *Nanog*, *Sox2*, *Oct4*, *Bmi1* et *Lgr5*, et sont détaillés dans le Chapitre 1. Il est nécessaire de croiser un panel de marqueurs d'indifférenciation pour obtenir une information significative. La Figure II.12 montre les résultats de la quantification relative des ARNm de la lignée SW620 cultivée dans le milieu défini. Les résultats sont normalisés respectivement par rapport à l'expression génique des cellules NM (ligne pointillée). La majorité des marqueurs est surexprimée, ce qui confirme l'enrichissement du phénotype souche dans la population cellulaire en soumettant les cellules à des conditions strictes dans le milieu défini.



IV.1.2. Signatures électromagnétiques f_{x01} et f_{x02}

Les cellules provenant des lignées du glioblastome et du cancer colorectal ont été caractérisées selon la méthode décrite précédemment du principe de notre capteur microfluidique. Nous mesurons sur la même cellule piégée par le quadripôle, sa première fréquence de transition f_{x01} et sa deuxième fréquence de transition f_{x02} .

Les résultats des mesures des fréquences de transition pour les deux conditions de culture NM et DM sont résumés dans le diagramme en boîte de la Figure II.13 pour la lignée SW620. La représentation choisie est celle du box plot permettant de montrer différentes variables statistiques telles que le minimum, le maximum et les quartiles du jeu de données. La moitié de la population cellulaire est concentrée dans le rectangle de couleur bleue pour les cellules NM et rouge pour les cellules DM. Entre les bords du rectangle et les valeurs minimales et maximales du jeu de données, il y a 25% des mesures de fréquences de transition. De plus, la répartition des fréquences de transition mesurées est affichée par les points noirs présents sur les diagrammes en boîtes. De plus, les points permettent d'illustrer la répartition des fréquences de transition mesurées de chaque cellule. Sur la Figure II.13, l'échelle pour les deux fréquences de transition sont les mêmes, à noter que les unités sont en kHz et en MHz pour f_{x01} et f_{x02} respectivement.

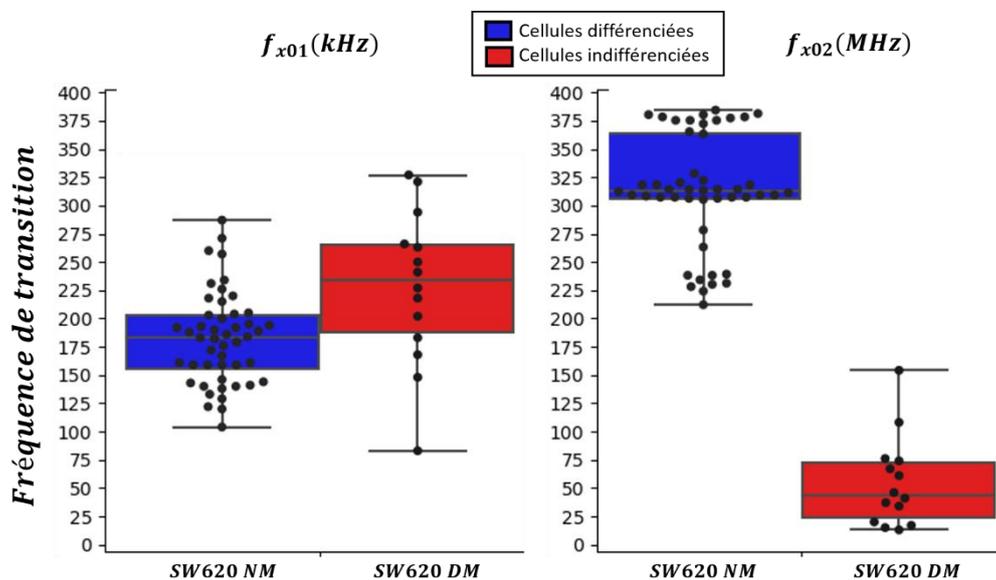


Figure II.13 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition des cellules U87-MG f_{x01} (à gauche) et f_{x02} (à droite), cultivées dans deux conditions différentes : milieu normal (NM) et milieu défini (DM)



Les informations statistiques concernant les données mesurées peuvent être retrouvées dans le Tableau II.2 pour la lignée du cancer colorectal, comprenant le nombre de cellules caractérisées, la médiane et l'écart-type des fréquences de transition pour les deux différentes conditions de culture cellulaire. On peut remarquer que sur la Figure II.13, les fréquences de transition mesurées sont étalées sur une plus ou moins large plage de fréquences. Ce constat est aussi reflété dans les valeurs des écarts-types quel que soit le milieu de suspension et le régime de fréquence. Comme discuté précédemment, cela est attribué au degré élevé d'hétérogénéité naturellement présente et en particulier dans la population cellulaire du CCR [20], [21]. En effet, à basse fréquence, f_{x01} est influencée par les variabilités de la taille et de la morphologie des cellules, tandis qu'à haute fréquence, f_{x02} est affectée par les modifications intracellulaires.

Tableau II.2 : Valeurs des deux fréquences de transition de la lignée SW620

| <i>Condition de culture</i> | Fréquence de transition | Nombre de cellules | Valeur médiane | Ecart-type |
|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>Milieu normal (NM)</i> | f_{x01} | 48 | 184 kHz | 41 kHz |
| <i>Milieu défini (DM)</i> | | 14 | 234 kHz | 68 kHz |
| <i>Milieu normal (NM)</i> | f_{x02} | 48 | 313 MHz | 50 MHz |
| <i>Milieu défini (DM)</i> | | 14 | 44 MHz | 40 MHz |

Un nombre représentatif de cellules a été caractérisé notamment dans le milieu normal afin de consolider les données et rendre significatives les signatures électromagnétiques obtenues. Dans le milieu défini, les cellules sont soumises à des conditions exigeantes de survie où seules les cellules indifférenciées peuvent proliférer en formant des sphères dont le cœur est nécrotique par manque d'oxygène [15], ce qui entraîne une diminution de la viabilité. De plus, afin d'obtenir la signature électromagnétique de cellules individuelles, il est nécessaire de casser mécaniquement les sphères ce qui peut endommager les cellules, et explique le plus faible nombre de cellules caractérisées par notre outil UHF-DEP pendant les campagnes de mesures.

Sur la Figure II.13, on peut déjà remarquer que la distribution des premières fréquences de transition mesurées montre un chevauchement entre les deux conditions de culture. Les valeurs médianes de f_{x01} mesurées sont de 184kHz et de 228kHz respectivement pour les conditions NM et DM. 50% des fréquences de transition mesurées se situent entre 149kHz et 204kHz pour les cellules différenciées et entre 176kHz et 280kHz pour les cellules souches cancéreuses. Le recouvrement entre les deux signatures électromagnétiques basse fréquence est très important. Par conséquent, dans cette



gamme de fréquence, la différence entre les propriétés diélectriques membranaires mesurées pour les deux populations cellulaires n'est pas assez marquée pour être exploitée comme biomarqueur discriminant. En revanche, sur la Figure II.13, on peut noter que la signature électromagnétique haute fréquence des deux populations de cellules ne présente aucun chevauchement. En effet, les cellules indifférenciées montrent une diminution élevée de la f_{x02} avec une valeur médiane de 55MHz par rapport à celle des cellules différenciées qui est de 313MHz. De plus, 50% des fréquences de transition mesurées sont comprises entre 305MHz et 365MHz pour les cellules NM et entre 19MHz et 75MHz pour les cellules DM, exhibant alors des signatures UHF-DEP très distinctes.

Ces résultats démontrent que les populations enrichies en cellules indifférenciées par rapport aux cellules différenciées possèdent des propriétés diélectriques intracellulaires différentes. D'après ces résultats, seule la deuxième fréquence de transition f_{x02} de la gamme UHF apparaît pertinente à exploiter pour identifier les cellules présentant un état indifférencié ou un phénotype souche. Les résultats démontrent une différence très marquée de signatures électromagnétiques pour la gamme des UHF démontrant le haut potentiel de la technique UHF-DEP qui peut être considérée comme un nouveau biomarqueur électromagnétique pour la détection des CSCs. La technique UHF-DEP apparaît donc très prometteuse et stratégique pour la discrimination de sous-populations cellulaires au sein de la tumeur en ciblant les spécificités de leurs propriétés diélectriques intracellulaires. Par la suite, nous nous concentrerons uniquement sur la deuxième fréquence de transition f_{x02} et nous renforcerons la pertinence de l'utilisation de l'UHF-DEP comme paramètre discriminant à travers l'étude cinétique de l'évolution de l'acquisition du phénotype souche, avant d'examiner le potentiel transformant des oncosomes.

IV.2. Suivi cinétique de l'acquisition du phénotype souche des cellules cancéreuses différenciées dans un milieu d'enrichissement en CSCs

Nous avons précédemment démontré la pertinence de l'utilisation de la gamme UHF par la mesure de la seconde fréquence de transition pour la détection de la sous-population de cellules indifférenciées liées aux CSCs. L'enrichissement de cette population cellulaire se fait par ensemencement de cellules cancéreuses différenciées dans le milieu défini possédant des conditions strictes de survie : soit les cellules présentent déjà un profil indifférencié et survivent, soit les cellules doivent développer leur capacité à survivre dans le milieu défini. L'acquisition du phénotype souche est un processus qui nécessite plusieurs cycles de division cellulaire et les cellules cancéreuses peuvent présenter un continuum de différents grades de différenciation [22]. Ainsi, nous nous proposons de suivre la cinétique de ce phénomène en utilisant notre microsystème UHF-DEP.



IV.2.1. Lignée du glioblastome U87-MG

Comme nous l'avons précédemment dit, dans un premier temps c'est la lignée du glioblastome U87-MG, bien connue des équipes XLIM et CAPTuR, qui a été étudiée afin de prendre en main l'outil de caractérisation UHF-DEP et d'optimiser le protocole de mesure. Pour obtenir différents grades de différenciation, les cellules de la lignée U87-MG sont cultivées dans les trois conditions suivantes :

- (i) NM : 6 jours dans le milieu normal. Rappelons qu'on s'attend à ce que très majoritairement, la population cellulaire soit différenciée.
- (ii) DM : 5 jours dans le milieu défini.
- (iii) DM+ : 21 jours dans le milieu défini. On suppose que le fait de maintenir les cellules dans des conditions extrêmes entraîne une meilleure sélection des cellules souches cancéreuses.

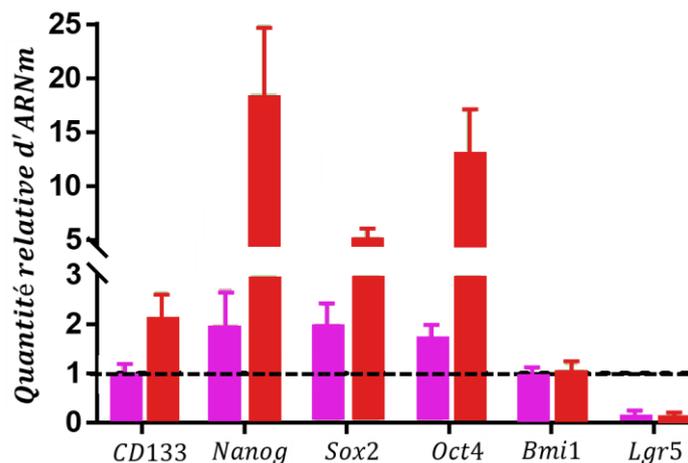


Figure II.14 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules cultivées dans les conditions NM (ligne pointillée), en DM (en rose) et en DM+ (en rouge) pour la lignée du glioblastome U87-MG

Sur la Figure II.14, les niveaux d'expression d'ARNm des cellules U87-MG cultivées dans les conditions DM (en rose) et dans les conditions DM+ (en rouge) ont été normalisés respectivement au niveau d'expression dans les conditions NM (ligne en pointillée). Les immuno-marqueurs analysés montrent une surexpression uniquement lorsque les cellules du GBM sont maintenues dans le milieu restrictif DM+, confirmant ainsi la présence de cellules indifférenciées. On peut remarquer que dans les conditions DM, les transcrits sont moins exprimés que lorsque les cellules sont maintenues en DM+ voire pas exprimé dans le cas du marqueur *CD133*, ce qui peut signifier que la population cellulaire est



composée de cellules différenciées et indifférenciées. Les marqueurs *Bmi1* et *Lgr5* sont des marqueurs souches pour le CCR et leur non-expression est donc attendue.

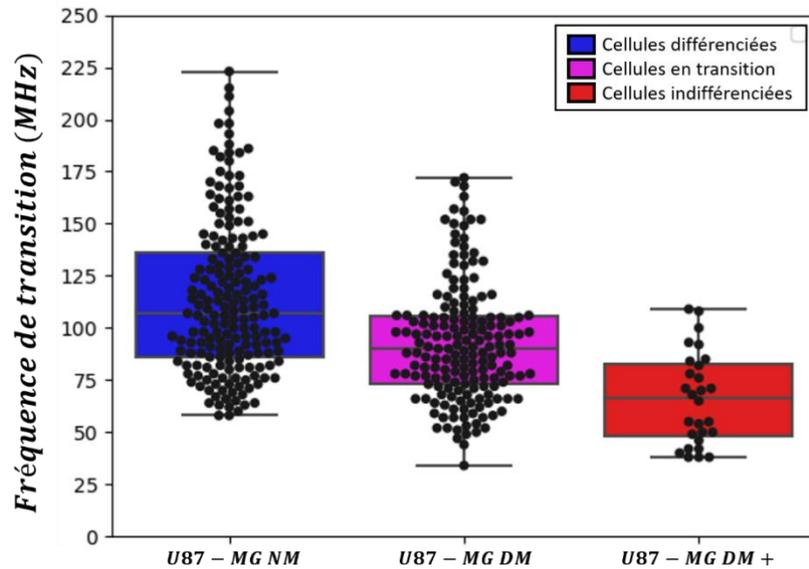


Figure II.15 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules U87-MG cultivées dans trois différentes conditions : (i) 6 jours en milieu normal NM, (ii) 5 jours en milieu défini DM, (iii) 21 jours en milieu défini DM+

Sur la Figure II.15, on peut noter que les conditions DM+, par le faible nombre de points, ne favorisent pas une bonne viabilité des cellules.

On peut remarquer que les fréquences de transition mesurées pour les conditions de culture NM et DM sont dispersées sur une plage de fréquence plus ou moins large. Comme pour les lignées de CCR, cette observation met en évidence l'hétérogénéité biologique naturelle présente au sein de la lignée cellulaire U87-MG [8], [22]. En milieu normal, la valeur médiane de la f_{x02} est de 108MHz, après 5 jours en milieu défini, la signature UHF-DEP diminue à 88MHz. Lorsque les cellules du GBM sont maintenues dans les conditions DM+, la valeur médiane tombe à 67MHz. En corrélation avec les résultats biologiques précédents, une signature électromagnétique plus faible pourrait signifier que la cellule caractérisée présente potentiellement un phénotype indifférencié.



Le Tableau II.3 rapporte la répartition des valeurs mesurées de la f_{x02} observée dans plusieurs gammes de fréquences selon les conditions de culture des cellules.

Tableau II.3 : Répartition des fréquences de transition mesurées en fonction des différentes conditions de culture de la lignée U87-MG

| <i>Gamme de fréquence</i> | Condition NM | Condition DM | Condition DM+ |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| $f < 50\text{MHz}$ | 0% | 3% | 36% |
| $50\text{MHz} < f < 100\text{MHz}$ | 44% | 62% | 57% |
| $100\text{MHz} < f < 150\text{MHz}$ | 38% | 30% | 7% |
| $150\text{MHz} < f < 200\text{MHz}$ | 16% | 5% | 0% |
| $200\text{MHz} < f$ | 2% | 0% | 0% |

Selon les données du Tableau II.3, dans les conditions NM, 56% des cellules caractérisées ont une fréquence de transition supérieure à 100MHz alors que dans les conditions DM+, seulement 7% de la population cellulaire présente ce comportement. De plus, le pool de cellules DM concentre 92% de sa population dans une gamme de fréquences moyennes entre 50MHz et 150MHz. Par conséquent, malgré un chevauchement des fréquences de transition entre chaque condition, cette répartition des f_{x02} mesurées indique que les cellules capables de survivre dans des conditions exigeantes présentent une fréquence de transition plus faible. En effet, si une cellule présente une f_{x02} inférieure à 50MHz, il est très probable qu'elle possède un phénotype indifférencié. Dans des fréquences plus élevées, supérieures à 150MHz, on peut affirmer que la cellule possède un état différencié. Dans la gamme de fréquences intermédiaires, il est plus difficile de tirer des conclusions sur le phénotype cellulaire en raison de la forte hétérogénéité de la lignée du glioblastome. Cependant, on peut noter que notre système microfluidique de caractérisation UHF-DEP est capable de suivre la cinétique d'acquisition du phénotype souche des cellules U87-MG dans un milieu d'enrichissement en CSCs.

IV.2.2. Lignées du cancer colorectal SW480 et SW620

Comme expliqué précédemment, les lignées SW480 et SW620 sont pertinentes à étudier car elles proviennent du même patient mais à deux stades différents : les cellules SW480 représentent un stade II avec un envahissement de la muqueuse du côlon tandis que les SW620 représentent un stade III avec une invasion des ganglions lymphatiques.



De même que pour la lignée du glioblastome pour obtenir différents grades de différenciation, les cellules des lignées SW480 et SW620 sont cultivées dans les trois conditions suivantes : (i) NM : 6 jours dans le milieu normal ; (ii) DM : 3 jours dans le milieu défini et (iii) DM+ : 7 jours dans le milieu défini.

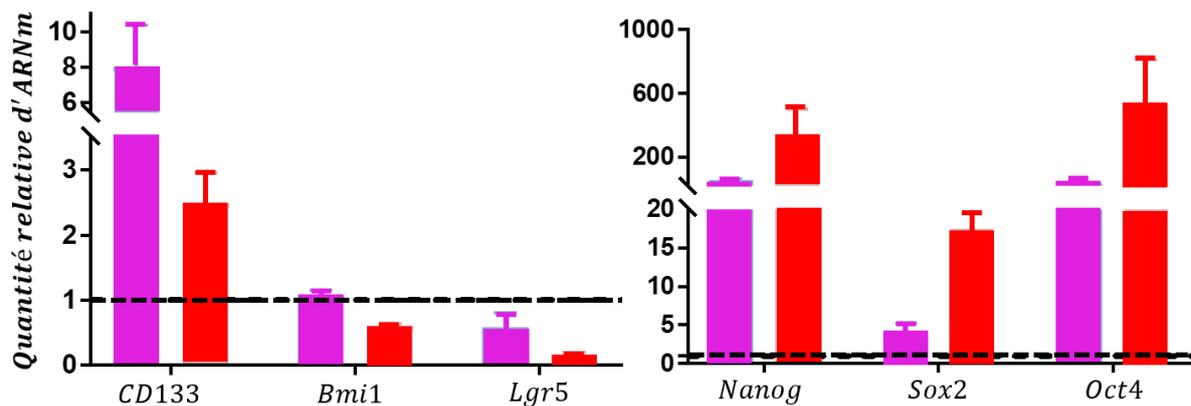


Figure II.16 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules cultivées dans les conditions NM (ligne pointillée), en DM (en rose) et en DM+ (en rouge) pour la lignée du cancer colorectal SW480

Sur la Figure II.16, les immuno-marqueurs analysés montrent une surexpression uniquement lorsque les cellules du CCR sont maintenues dans le milieu restrictif DM+, confirmant ainsi la présence de cellules indifférenciées. On s'attend bien à ce que le marqueur *Lgr5* ne soit pas exprimé, étant un marqueur de prolifération. On peut remarquer que dans les conditions DM, les transcrits sont moins exprimés que lorsque les cellules sont maintenues en DM+ sauf dans le cas du biomarqueurs *CD133*. Ces résultats inattendus pour *CD133* et *Bmi1* sont délicats à interpréter, soulignant la limite d'utilisation d'immuno-marqueurs génériques et le besoin de trouver un marqueur pertinent spécifique aux CSCs.



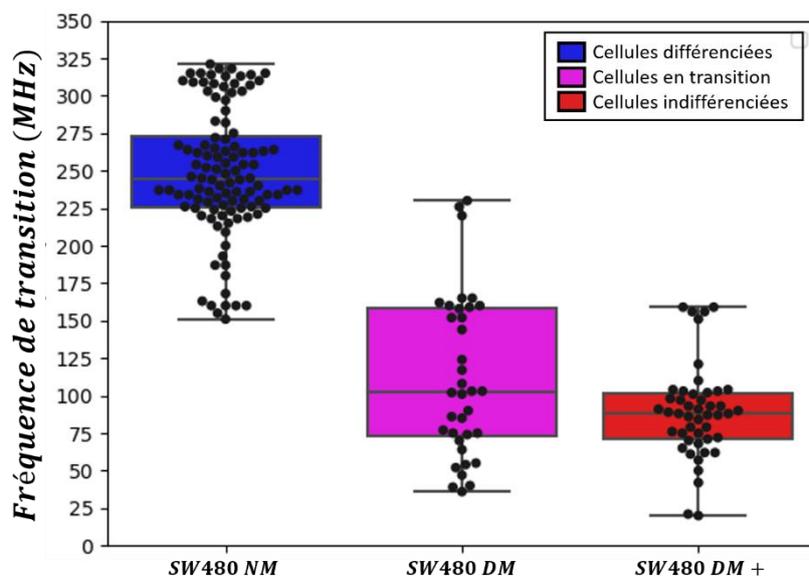


Figure II.17 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules SW480 cultivées dans trois conditions différentes : (i) 6 jours en milieu normal NM, (ii) 3 jours en milieu défini DM, (iii) 7 jours en milieu défini DM+

La Figure II.17 représente la répartition des fréquences de transition mesurées pour chaque cellule. Pour cette lignée aussi, on retrouve bien un étalement fréquentiel plus ou moins important des f_{x02} obtenues. Cependant, contrairement à la lignée du glioblastome, les cellules SW480 NM et SW480 DM+ montrent une plus petite zone de chevauchement des signatures entre 133MHz et 160MHz. Sur cette gamme fréquentielle, on retrouve environ 10% et 11% de la population pour les conditions NM et DM+ respectivement. Cet écart dans les signatures électromagnétiques entre les populations différenciées et indifférenciées d'une même lignée nous permet d'identifier plus facilement la sous-population des cellules cancéreuses souches.

Tableau II.4 : Synthèse des mesures de la fréquence de transition UHF de la lignée SW480

| Condition de culture | Nombre de cellules | Valeur médiane | Ecart-type |
|----------------------|--------------------|----------------|------------|
| Condition NM | 108 | 245 MHz | 43 MHz |
| Condition DM | 36 | 103 MHz | 54 MHz |
| Condition DM+ | 47 | 88 MHz | 31 MHz |

Selon les données du Tableau II.4, dans les conditions NM, la valeur médiane de la f_{x02} est de 245MHz, après 3 jours en milieu défini, la signature UHF-DEP diminue à 103MHz. Lorsque les cellules du CCR sont maintenues dans les conditions DM+, la valeur médiane se réduit à 88MHz. En corrélation



avec les résultats biologiques précédents, une signature électromagnétique plus faible signifie que la cellule caractérisée présente potentiellement un phénotype souche. L'écart-type pour les conditions DM est plus élevé que dans les autres conditions de culture. En effet, en ensemençant les cellules seulement 3 jours dans le milieu défini, la population cellulaire est plus hétérogène. On peut voir que des fréquences de transition plus basses sont apparues, signe de la potentielle présence de CSCs tandis que des fréquences plus hautes, environ supérieures à 250MHz, ne sont pas retrouvées dans l'état de transition. Il se peut que ces cellules avec des fréquences de transition élevées n'ont pas survécu aux conditions strictes du milieu défini ou alors elles se sont adaptées au milieu en s'indifférenciant.

Les conditions de culture pour la lignée SW620 sont les mêmes que pour la lignée SW480. En plus des données déjà recueillies précédemment pour les cellules SW620 NM et DM+ (Figure II.13), nous avons mesuré une cinquantaine de fréquences de transition f_{x02} supplémentaires afin de consolider les signatures UHF-DEP obtenues et d'améliorer la fiabilité de notre analyse statistique.

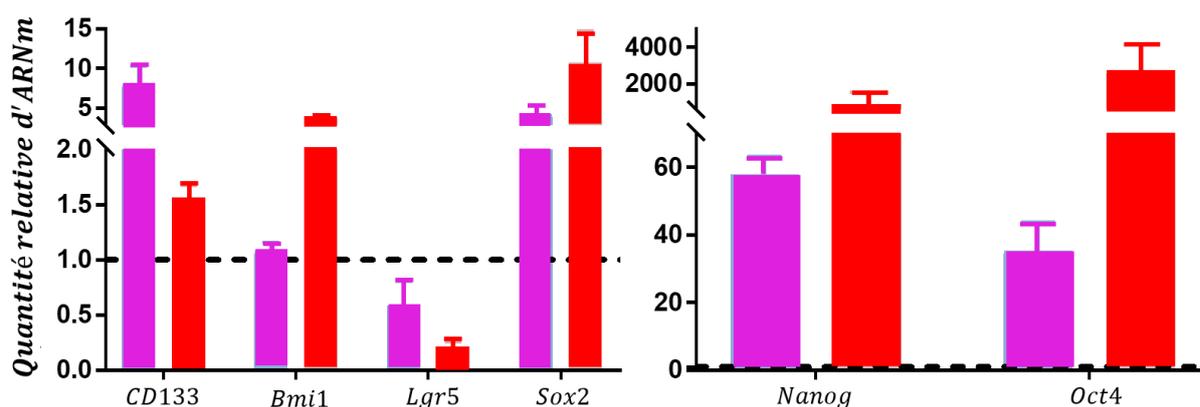


Figure II.18 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules cultivées dans les conditions NM (ligne pointillée), en DM (en rose) et en DM+ (en rouge) pour la lignée du cancer colorectal SW620

De même que pour la lignée précédente, dans les conditions de cultures plus strictes, les cellules cancéreuses présentent un phénotype indifférencié.



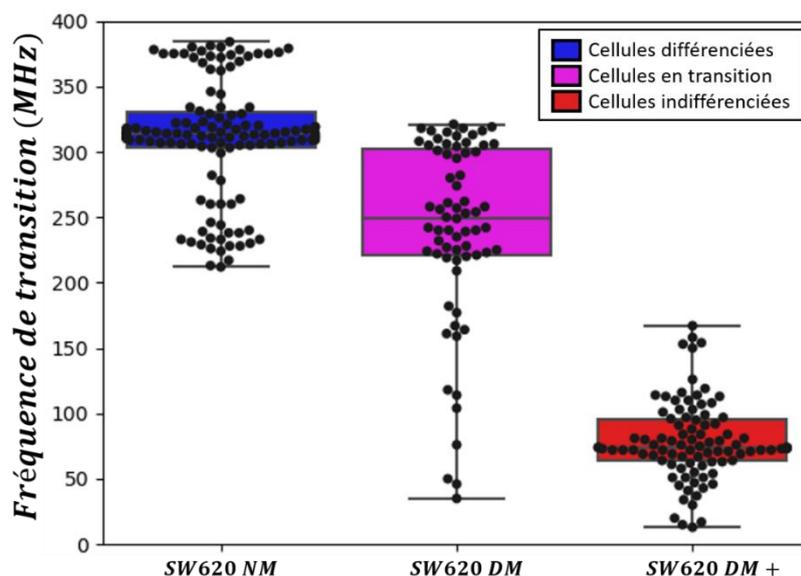


Figure II.19 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules SW620 cultivées dans trois différentes conditions : (i) 6 jours en milieu normal NM, (ii) 3 jours en milieu défini DM, (iii) 7 jours en milieu défini DM+

La Figure II.19 représente la répartition des fréquences de transition mesurées de chaque cellule. Les cellules SW620 NM et SW620 DM+ ne montrent aucune zone de recouvrement des signatures électromagnétiques. Cet écart notable dans les signatures électromagnétiques entre les populations différenciées et indifférenciées d'une même lignée nous permet d'identifier plus facilement la sous-population des cellules cancéreuses souches. Cette lignée cellulaire SW620 serait donc très pertinente à utiliser pour l'étape suivante de ces travaux à savoir le développement d'un cytomètre UHF-DEP pour isoler les CSCs. En effet, le non-chevauchement dans les fréquences de transition devrait permettre une meilleure purification dans le tri cellulaire. Nous aborderons le tri en flux par la technique de la diélectrophorèse dans le Chapitre III.

Tableau II.5 : Bilan des mesures de la fréquence de transition UHF de la lignée SW620

| Condition de culture | Nombre de cellules | Valeur médiane | Ecart-type |
|----------------------|--------------------|----------------|------------|
| Condition NM | 119 | 314 MHz | 46 MHz |
| Condition DM | 68 | 250 MHz | 71 MHz |
| Condition DM+ | 92 | 74 MHz | 30 MHz |

Selon les données du Tableau II.5, dans les conditions NM, la valeur médiane de la f_{x02} est de 314MHz, après 3 jours en milieu défini, la signature UHF-DEP diminue à 250MHz. Lorsque les cellules



du CCR sont maintenues dans les conditions DM+, la valeur médiane se réduit à 74MHz. Bien que plus de cellules aient été caractérisées dans les conditions NM, la valeur médiane de la fréquence de transition reste la même par rapport à la première campagne de mesure (cf Tableau II.2). On retrouve la même tendance dans la décroissance de la signature électromagnétique que pour la lignée cellulaire du CCR SW80 et du glioblastome U87. Ainsi, on peut conclure que le milieu défini opère bien une sélection sur les populations cellulaires et privilégie le phénotype d'indifférenciation et que notre outil de diagnostic est capable d'observer et de suivre le changement de phénotype dans le temps.

Dans la gamme des ultra-hautes fréquences, l'onde électromagnétique est capable d'interroger le contenu interne des cellules duquel découle leurs propriétés biologiques. De par l'exploitation de leurs signatures UHF-DEP, il est possible d'obtenir des informations concernant leur degré d'indifférenciation avec une certaine probabilité. Comme démontré dans les parties IV.1 et IV.2, les cellules présentant un phénotype souche ont une forte chance d'être identifiables par une signature électromagnétique UHF-DEP plus faible. Notre microsystème de caractérisation cellulaire offre ainsi la possibilité de suivre la cinétique du processus d'indifférenciation.

Par la suite, nous allons continuer les caractérisations diélectrophorétiques sur le cancer colorectal. Les EVs extraites de cellules cancéreuses souches seront mises en contact avec des cellules différenciées afin d'évaluer leur potentiel différenciant.

IV.3. Suivi cinétique du potentiel transformant des oncosomes sécrétés par des cellules cancéreuses différenciées et par des cellules cancéreuses souches

Dans cette partie, le but est d'étudier le pouvoir transformant des oncosomes sécrétés soit par des cellules cancéreuses différenciées, soit par des cellules cancéreuses souches. Les EVs sont extraites du surnageant des cellules considérées comme étant les plus agressives. Les signatures électromagnétiques seront mesurées et comparées à la population de référence qui a été incubée avec les EVs. Le cancer colorectal sera étudié avec dans un premier temps, des oncosomes issus de lignées cellulaires et dans un deuxième temps, des oncosomes sécrétés par des cellules de cultures primaires.



IV.3.1. Le potentiel différenciant des oncosomes provenant des lignées cellulaires

Le potentiel différenciant des EVs sécrétées par les lignées tumorales a été étudié en premier lieu. Les deux lignées modèles pour le cancer colorectal que nous avons utilisées sont les SW480 et les SW620 étant respectivement de stade II et III. Le type cellulaire SW620 est considéré alors comme étant plus agressif que SW480. Afin de confirmer ceci, une analyse transcriptomique comparative est réalisée avec des immuno-marqueurs souches sur les cellules SW620 NM.

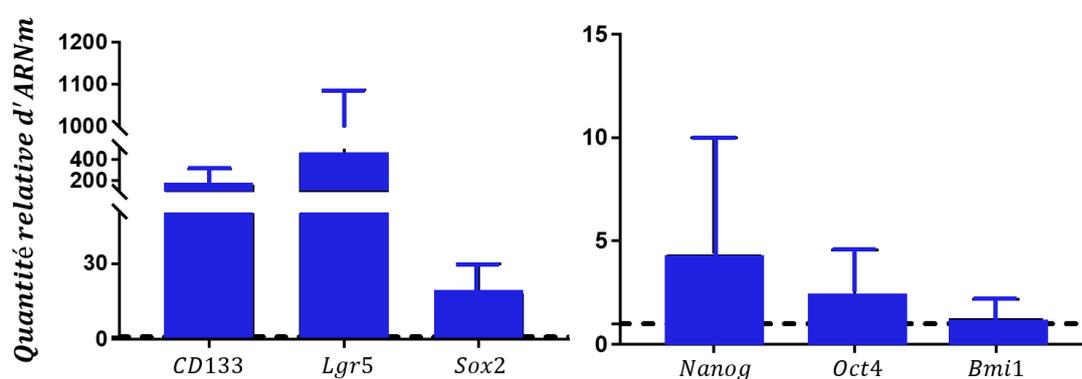


Figure II.20 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Lgr5, Sox2, Nanog, Oct4 et Bmi1, entre des cellules SW620 cultivées dans les conditions NM (en bleu) et des cellules SW480 cultivées également dans les conditions NM (ligne pointillée).

La majorité des marqueurs est surexprimée excepté pour *Bmi1*. Cela atteste bien que les cellules SW620 originaires d'un stade III présentent un phénotype plus indifférencié que les SW480. On considère alors la lignée SW620 comme étant plus résistante aux traitements conventionnels. Des tests préliminaires en biologie ayant permis de révéler que les oncosomes provenant de cellules cancéreuses plus agressives avaient un impact sur le phénotype de cellules moins agressives, il a donc été décidé d'exposer des EVs sécrétées par la lignée SW620, lignée métastatique dans le ganglion lymphatique considérée comme étant plus agressive, sur la lignée SW480 moins agressive, afin d'étudier par l'outil de caractérisation électromagnétique le pouvoir oncogénique des oncosomes.



Tableau II.6 : Synthèse du plan d'expérience (cf Figure II.11)

| | | | |
|-------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| Type cellulaire | SW480 NM | SW620 NM | SW620 DM+ |
| Rôle expérimental | Cellules cibles | Cellules sécrétrices d'EVs | Cellules sécrétrices d'EVs |

La Figure II.11 résume le protocole d'incubation et de caractérisation UHF-DEP qui a été utilisé tout au long de cette étude et le Tableau II.6 récapitule les cellules cibles qui sont les SW480 NM incubées avec les EVs sécrétées par les SW620 NM et DM+.

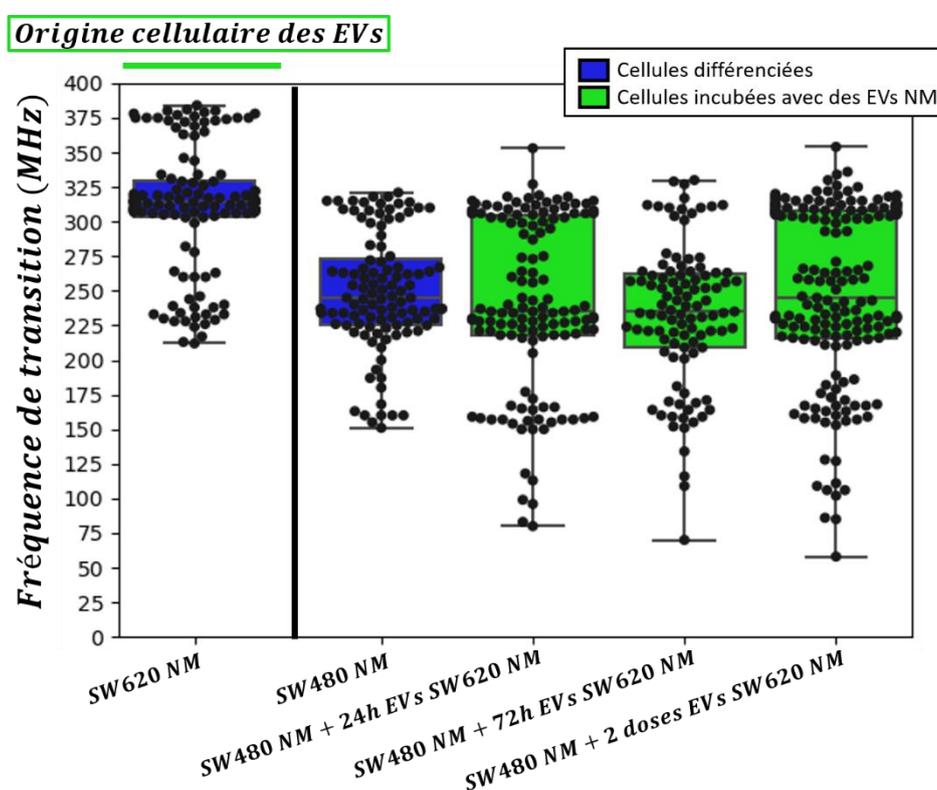


Figure II.21 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules SW480 NM incubées avec des oncosomes dans trois différentes conditions : (i) incubation pendant 24h avec une dose d'EVs sécrétées par SW620 NM, (ii) incubation pendant 72h avec une dose d'EVs sécrétées par SW620 NM, (iii) incubation pendant 72h avec deux doses d'EVs sécrétées par des cellules SW620 NM

La Figure II.21 représente la distribution des fréquences de transition mesurées pour chaque cellule SW480 NM caractérisée après avoir été incubée pendant 24 et 72h avec une seule dose d'EVs de SW620 NM et 72h après deux doses d'EVs. A la première observation, on peut remarquer qu'après exposition aux EVs SW620 NM, très peu de cellules présentent une fréquence de transition basse. Il



semblerait qu'au contact des oncosomes de cellules différenciées, la signature électromagnétique des cellules SW480 ne soit pas modifiée. On peut noter quelques événements apparaissant à basse fréquence, inférieure à 150MHz, cependant ces occurrences peuvent être considérées comme étant anodines. Rappelons que la valeur médiane pour la signature de référence SW480 NM est de 245MHz et celle des SW620 NM est de 314MHz. Avec une seule dose d'EVs NM, au bout de 24h d'incubation, la valeur médiane de la f_{x02} est de 235MHz, après 72h d'incubation, la signature UHF-DEP est de 236MHz. Avec deux doses d'EVs NM, la valeur médiane de la fréquence de transition est de 245MHz. D'après les données statistiques sur la valeur médiane, les EVs SW620 NM n'entraîneraient pas de modifications de la signature électromagnétique. Or, comme indiqué dans les simulations du chapitre 1, on associe un changement de la fréquence de transition UHF avec un changement global intracellulaire. L'impact des EVs provenant de cellules cancéreuses certes agressives mais ne possédant pas un phénotype souche semble peu important et donc négligeable.

En plus des grandeurs statistiques du jeu de données (minimum, maximum et les différents quartiles), il peut être pertinent d'étudier la répartition des fréquences de transition mesurées pour chaque condition d'incubation avec des EVs de cellules SW620 NM. Pour cela, la plage de fréquences a été divisée en quatre différentes zones :

- Cellules souches cancéreuses : lorsque les fréquences mesurées sont inférieures à 150MHz. Presque toute la population cellulaire des SW620 DM+ se trouve dans cette gamme de fréquence.
- Zone de recouvrement : entre 150MHz et 200MHz. C'est la zone de chevauchement entre les cellules du cancer colorectal différenciées et indifférenciées.
- Cellules différenciées SW480 proches de la médiane : entre 200MHz et 280MHz. Cette zone regroupe plus de 50% de la population de référence autour de sa médiane.
- Cellules différenciées haute fréquence : lorsque les fréquences de transition mesurées sont supérieures à 280MHz. Par rapport à la population SW480 NM de référence, cela représente le groupe de fréquences de transition qui se détache de la valeur médiane.

Le Tableau II.7 regroupe la répartition des fréquences de transition mesurées selon les zones définies précédemment pour chaque condition d'exposition aux EVs sécrétées par les SW620 NM.



Chapitre II. Caractérisation de cellules individuelles par diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence dans le but d'une discrimination phénotypique

Tableau II.7 : Distribution des fréquences de transition mesurées selon les zones prédéfinies (CSCs, zone de recouvrement, cellules différenciées SW480 proches de la médiane, cellules différenciées haute fréquence) en fonction des différentes conditions d'exposition des EVs de SW620 NM

| | SW620 NM | SW480 NM | 1 dose EVs/ 24H | 1 dose EVs/ 72H | 2 doses EVs |
|-------------------------------------|----------|--------------|--------------------|--------------------|--------------|
| $f < 150\text{MHz}$ | 0% | 0% | 7% | 3,9% | 5,8% |
| $150\text{MHz} < f < 200\text{MHz}$ | 0% | 12% | 14,7% | 15,7% | 14,6% |
| $200\text{MHz} < f < 280\text{MHz}$ | 21,1% | 63,9% | 42,6% | 66,7% | 39,8% |
| $280\text{MHz} < f$ | 78,9% | 24,1% | 35,7% | 13,7% | 39,8% |

Pour chaque condition d'incubation, très peu de cellules possèdent une fréquence de transition inférieure à 200MHz. La population des SW620 NM d'où proviennent les EVs ne présente aucune fréquence de transition dans la zone de recouvrement et celle des cellules cancéreuses souches. Avec une seule dose, il y a 21,7% des fréquences de transition mesurées dans cette gamme au bout de 24h et 19,6% au bout de 72h. Avec deux doses d'EVs NM, on trouve 20,4% des f_{x02} obtenues dans la gamme des basses fréquences. Quant à la population SW480 NM de référence, le pourcentage est de 12%. La distribution des fréquences dans cette plage diffère un peu de la population de référence, cependant ces changements restent peu significatifs. Les EVs provenant de cellules différenciées ne semblent pas induire une indifférenciation des cellules avec lesquelles elles ont été mises en contact.

Dans les gammes de fréquences identifiées comme celles correspondant au phénotype différencié de la population de référence, même si la médiane ne révèle pas de changement significatif, on peut néanmoins observer une modification de la répartition des fréquences de transition notamment dans la gamme des fréquences supérieures à 200MHz. En effet, lorsqu'une seule dose d'EVs est appliquée aux cellules SW480 NM, après 24h, on remarque qu'il y a 10% de plus de fréquences de transition mesurées au-delà de 280MHz dans la zone des cellules différenciées haute fréquence. De plus, près de 20% des cellules ayant une fréquence de transition comprise entre 200MHz et 280MHz ne sont plus présentes. Cependant, après 72h, ces changements s'estompent et la distribution des mesures est de nouveau équivalente à celle de la population de référence. Il semblerait que deux doses d'EVs permettent de retrouver la même répartition qu'à 24h avec une dose. Ces EVs ont potentiellement pour effet d'augmenter légèrement la f_{x02} des cellules auxquelles elles sont exposées. Cet impact ne semblerait pas perdurer dans le temps. En effet, après 72h d'incubation, on estime qu'il y a eu au moins une division cellulaire [23], donc les modifications seraient temporaires. Une exposition en continu pourrait



vraisemblablement permettre d'entretenir le phénomène d'augmentation de la signature électromagnétique.

Les cellules SW620 NM qui sécrètent les EVs possèdent une valeur de la fréquence de transition globalement plus élevée que celle des cellules SW480 NM. En effet, la valeur médiane est de 314MHz avec 79% de la population dans la zone des cellules différenciées haute fréquence. Nous avons constaté qu'au contact avec des EVs secrétées par les SW620 NM, une plus grande proportion de cellules SW480 NM possèdent une f_{x02} présentant une plus haute fréquence et proche de la médiane des cellules SW620 NM. Il est difficile d'interpréter le changement induit par les oncosomes puisque le contenu de ces derniers est inconnu et qu'il est très probable que plusieurs voies de signalisations cellulaires aient été activées suite à l'endocytose des EVs.

Ce que nous pouvons affirmer est qu'un changement de la signature électromagnétique est la conséquence d'une ou plusieurs modifications du contenu interne de la cellule caractérisée. On peut en conclure que les EVs issues des cellules SW620 NM n'ont pas d'impact majeur global sur la signature des cellules car elles n'induisent pas de modification de la valeur médiane. Cependant, on peut noter une faible augmentation de la proportion de cellules dont la signature électromagnétique se situe vers les hautes fréquences, proches de la signature des SW620 NM. Ces effets sont temporaires et il est nécessaire d'exposer les cellules SW480 NM en continu afin de conserver ces modifications.



Par la suite, ce sont les EVs des cellules SW620 DM+ qui ont été incubées avec des cellules SW480 NM. Le protocole expérimental utilisé est le même que celui pour les EVs sécrétées par les SW620 NM.

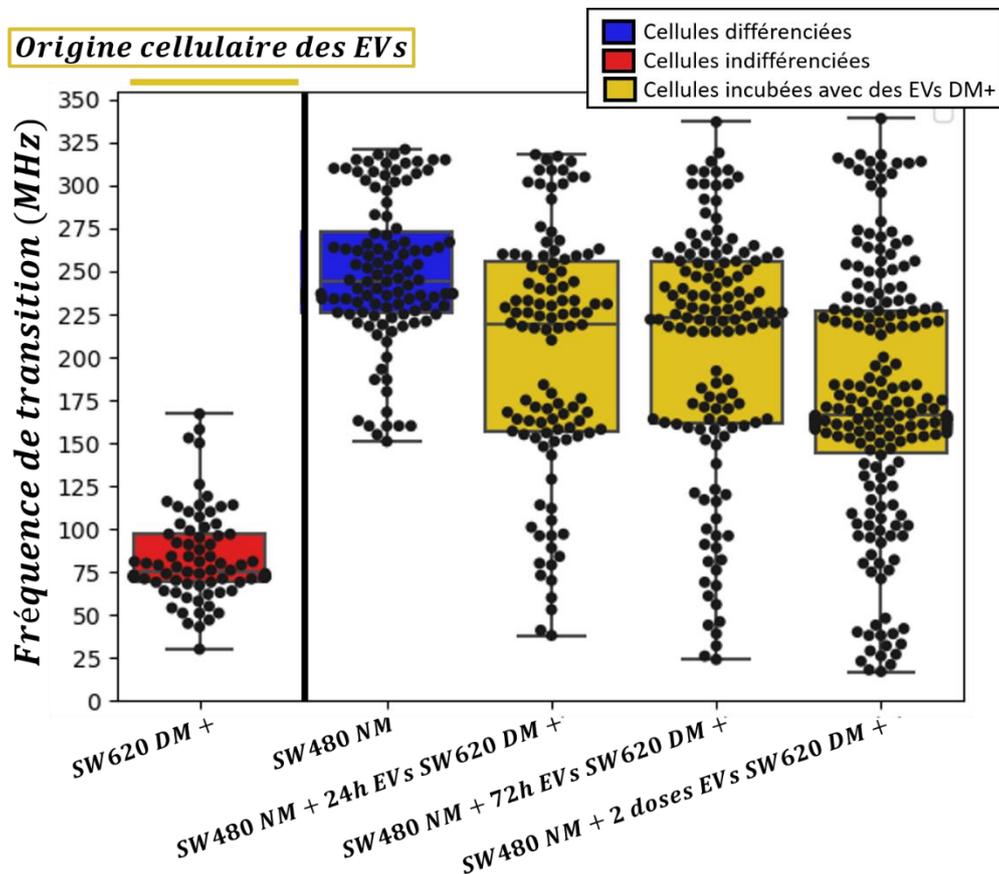


Figure II.22 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules SW480 incubées avec des oncosomes dans trois différentes conditions : (i) incubation pendant 24h avec une dose d'EVs sécrétées par SW620 DM+, (ii) incubation pendant 72h avec une dose d'EVs sécrétées par SW620 DM+, (iii) incubation pendant 72h avec deux doses d'EVs sécrétées par SW620 DM+

A la première observation, on peut remarquer qu'après exposition aux EVs DM+, une plus large proportion de cellules possède une fréquence de transition dans les basses fréquences (inférieure à 200MHz). Il semblerait qu'au bout de 24h, une partie de la population cellulaire présentant de faibles f_{x02} soit apparue à la suite de l'exposition aux EVs DM+. Nous pouvons noter qu'après 72h d'incubation, la signature électromagnétique reste très proche de la signature des cellules exposées uniquement pendant 24h. En effet, au bout de 24h d'incubation, la valeur médiane de la f_{x02} a diminué à 220MHz, après 72h d'incubation, la signature UHF-DEP ne bouge pas par rapport à 24h et est de 224MHz. De plus, deux doses d'oncosomes paraissent amplifier le phénomène de diminution de fréquence de transition vers la signature des cellules souches cancéreuses SW620 DM+, sa valeur médiane étant de



166MHz. L'exposition aux EVs issues de cellules cancéreuses souches semblerait donc avoir un impact sur les cellules cancéreuses différenciées et potentiellement influencer sur leur état de différenciation. Ce changement phénotypique pourrait signifier que les CSCs peuvent transmettre leur caractère agressif via les oncosomes.

Le Tableau II.8 regroupe la distribution des fréquences de transition mesurées selon les zones définies précédemment pour chaque condition d'exposition aux EVs sécrétées par les SW620 DM+.

Tableau II.8 : Distribution des fréquences de transition mesurées selon les zones prédéfinies (CSCs, zone de recouvrement, cellules différenciées SW480 proches de la médiane, cellules différenciées haute fréquence) en fonction des différentes conditions d'exposition des EVs de SW620 DM+

| | SW620 DM+ | SW480 NM | 1 dose EVs/ 24H | 1 dose EVs/72H | 2 doses EVs |
|-------------------------------------|-----------|----------|--------------------|-------------------|-------------|
| $f < 150\text{MHz}$ | 96,2% | 0% | 18,5% | 18,9% | 27,2% |
| $150\text{MHz} < f < 200\text{MHz}$ | 3,8% | 12% | 25% | 18,8% | 38,7% |
| $200\text{MHz} < f < 280\text{MHz}$ | 0% | 63,9% | 43,5% | 50,7% | 26,1% |
| $280\text{MHz} < f$ | 0% | 24,1% | 13% | 11,6% | 8% |

On peut remarquer que pour les cellules SW480 NM exposées aux EVs DM+, la distribution des signatures UHF-DEP dans la zone des CSCs et de recouvrement est très impactée. En effet, avec une seule dose, il y a 43,5% des fréquences de transition mesurées dans cette gamme au bout de 24h et 37,5% au bout de 72h. Avec deux doses d'EVs DM+, on trouve 65,9% des f_{x02} obtenues dans la gamme des basses fréquences. Alors que pour la population de référence SW480 NM, le pourcentage est de 18,6%. Les EVs provenant de cellules souches semblent induire une indifférenciation des cellules exposées. De plus, en se focalisant seulement sur une seule dose d'oncosomes, la répartition des f_{x02} obtenue ne semble pas varier de manière significative entre les deux conditions d'incubation de 24h et 72h. Cela pourrait signifier qu'après au moins un cycle cellulaire, la modification des fréquences de transition perdure dans le temps. Il est probable que la baisse des valeurs de fréquence de transition engendrée par les EVs DM+ soit effectivement corrélée à des changements phénotypiques de ces cellules.

En conséquence de l'augmentation de la proportion de fréquences de transition mesurées dans la gamme des cellules souches cancéreuses et celle de recouvrement, moins de cellules possèdent leur f_{x02} dans les zones identifiées relatives à un phénotype différencié. Même si à plus haute fréquence au-



delà de 280MHz, la répartition ne change pas de manière significative pour une seule dose d'EVs, avec deux doses, on peut noter clairement une forte réduction des cellules possédant une fréquence de transition supérieure à 200MHz. En effet, dans la zone des cellules différenciées proches de la médiane des SW480 NM, près d'un tiers de la population n'y est plus présent ainsi qu'environ la moitié dans les hautes fréquences. Une exposition en continu permettrait vraisemblablement d'entretenir et d'accentuer le phénomène de baisse de la signature électromagnétique, ce qui résulte en une indifférenciation de la population de référence.

Les cellules SW620 DM+, qui sécrètent les EVs sur lesquelles nos expériences se sont basées, possèdent une valeur de la fréquence de transition globalement plus faible que celle des cellules SW480 NM. En effet, la valeur médiane est de 76MHz avec 96% de la population dans la zone des cellules souches cancéreuses. Nous avons constaté qu'au contact des EVs secrétées par les cellules SW620 DM+, une plus grande proportion de cellules SW480 NM présentent une f_{x02} plus basse (inférieure à 150MHz), là où très peu de cellules se trouvaient de base. On peut en conclure que les EVs issues des cellules SW620 DM+ ont une influence majeure sur la signature des cellules, en induisant des modifications très significatives de la valeur médiane des fréquences de transition de l'ensemble de la population.

Synthèse de l'influence des oncosomes sécrétés par les SW620 NM et DM+

Pour les deux types d'EVs testées, les changements de valeurs de fréquences de transition observées révèlent un changement du contenu intracellulaire pour lequel nous pouvons émettre les deux hypothèses suivantes :

- Comme expliqué précédemment dans le chapitre I, en ultra haute fréquence, l'onde électromagnétique interroge le contenu intracellulaire dans son ensemble. La signature UHF-DEP mesurée est la conséquence d'un effet global comprenant le rapport volumique cytoplasme/noyau, les organelles, les protéines et le matériel génétique dans la cellule. Il se peut alors que la modification de la signature électromagnétique après l'exposition aux EVs soit uniquement en raison de l'incorporation de ces EVs dans le cytoplasme des cellules. En effet, il serait théoriquement possible d'induire un changement de la fréquence de transition si la cellule assimile des EVs qui n'étaient pas présents dans le milieu extracellulaire auparavant. Les EVs pourraient entraîner une modification de la signature UHF-DEP sans pour autant induire des changements phénotypiques dans la cellule. Cependant, cette hypothèse implique le fait que le contenu des oncosomes ne soit pas intégré par la cellule. Or, l'équipe de Tian [24] a pu suivre l'absorption et le trafic des nano-vésicules dans la cellule en colorant leurs membranes. Il s'est avéré que dès 3h après être endocytées par la cellule, les oncosomes présentent une membrane



plasmique qui commence à se dissocier pour libérer son contenu dans le cytoplasme. Cette phase peut durer jusqu'à 24h. On peut donc légitimement se demander si la caractérisation DEP qui intervient 24h après la première exposition aux EVs, permet déjà de voir les effets de ces derniers sur les cellules ou si on observe le début d'une cinétique avec un mélange des effets induits par EVs sur les cellules et les EVs absorbées elles-mêmes. Cette hypothèse n'est valable que pour la caractérisation DEP survenant 24h après.

- Une autre hypothèse pourrait être que les EVs sont incorporées dans les cellules et induisent des changements en cascade au sein de la cellule. Il est assez difficile de s'avancer quant aux modifications apportées par les EVs sur le fonctionnement de la cellule biologique, tellement les mécanismes peuvent être nombreux et encore peu étudiés.

Afin de pouvoir affirmer qu'un changement phénotypique peut être associé ou non associé à l'exposition des EVs sécrétées par les cellules SW620 NM et DM+, une analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression des immuno-marqueurs d'indifférenciation des cellules SW480 NM exposées à une seule dose d'EVs issues de cellules SW620 NM (en vert) et d'EVs de SW620 DM+ (en jaune) après 24h d'incubation est présentée sur la Figure II.23. Le niveau d'expression a été normalisé par rapport à celui des cellules SW480 NM.

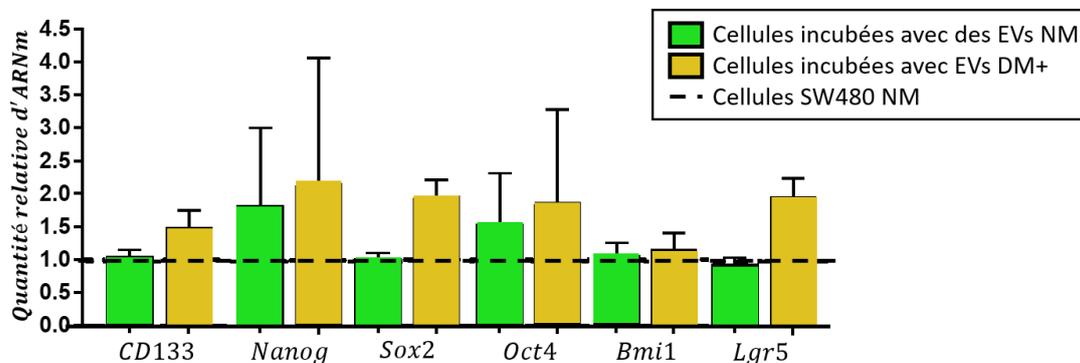


Figure II.23 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules SW480 NM (ligne pointillée), des cellules SW480 NM exposées aux EVs de SW620 NM (en vert) et des cellules SW480 NM exposées aux EVs de SW620 DM+ (en jaune). Les cellules et ces EVs ont été incubées durant 24h

Dans le cas des cellules SW480 NM exposées à une dose d'EVs de SW620 NM, on peut voir que seuls deux marqueurs *Nanog* et *Oct4* sont légèrement surexprimés, ce qui n'est pas suffisant afin de confirmer la présence du phénotype indifférencié donc souche au sein de la population cellulaire exposée



aux EVs provenant de cellules cancéreuses différenciées. Cela corrobore bien le fait que la signature UHF-DEP des cellules SW480 NM + EVs SW620 NM, globalement n'est pas modifiée.

Dans le cas des cellules SW480 NM exposées à une dose d'EVs de SW620 DM+, on peut remarquer que les immuno-marqueurs *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* et *Lgr5* sont plus nettement surexprimés, alors que *CD133* l'est légèrement. D'une manière générale, les marqueurs des CSCs ont un niveau d'expression plus important lorsque les cellules SW480 NM sont exposées aux EVs sécrétées par des cellules cancéreuses indifférenciées, confirmant ainsi la présence d'un nombre non négligeable de cellules au caractère souche dans la population cellulaire. On peut donc faire le lien entre la diminution de la médiane des valeurs de fréquence de transition ainsi que l'apparition de fréquences plus basses avec un probable changement de phénotype pour un certain nombre de cellules vers un caractère plus agressif. Par conséquent, les cellules SW480 NM incubées avec des EVs sécrétées par des CSCs, voient globalement leur phénotype changer. Il semblerait donc que les EVs des CSCs comparées aux EVs des cellules cancéreuses différenciées soient capables d'induire une indifférenciation et de transférer le phénotype souche à des cellules qui à l'origine ne le sont pas.

L'objectif principal de la thèse est de démontrer le potentiel de transformation oncogénique des EVs, reflétant les propriétés agressives des CSCs les produisant. Nous avons montré que l'outil de caractérisation UHF-DEP est capable de mesurer les changements intracellulaires induits par l'exposition des EVs. A partir de la signature électromagnétique, il nous est possible de prédire l'état phénotypique des cellules caractérisées par comparaison avec une population de référence. De plus, notre microsystème nous permet d'obtenir une autre information que le phénotype global comme en biologie avec les immuno-marqueurs : nous avons accès à la répartition des fréquences de transition au sein d'une population. En effet, l'analyse en cellule individuelle apporte un moyen de suivre la cinétique d'acquisition du phénotype indifférencié et d'étudier les effets des différentes conditions d'exposition aux EVs DM+. Nous avons ainsi pu démontrer le potentiel transformant des oncosomes sécrétés par des CSCs dans le cas des lignées cellulaires. Par la suite, nous allons nous intéresser aux effets d'EVs produits par les cultures primaires : une première étape vers une étude clinique.



IV.3.2. Le potentiel différenciant des oncosomes provenant des cultures primaires

Cette partie sera consacrée à l'étude du potentiel transformant et au transfert de caractéristiques souches des EVs sécrétées par des cellules de cultures primaires, c'est-à-dire par des cellules de patients *ex vivo*. Dans un premier temps, ces vésicules seront incubées avec des cellules de la lignée cellulaire SW480 NM puis avec des cellules d'une culture primaire identifiée comme peu agressives par l'analyse du niveau d'expression de marqueurs immuno-fluorescents.

IV.3.2.a. Suivi cinétique de l'acquisition du phénotype souche des cellules de cultures primaires dans un milieu d'enrichissement en CSCs

Les différents types de cultures primaires étudiés sont reportés dans le Tableau II.1. La culture primaire CPP14 a été isolée à partir d'un cancer colorectal de stade précoce (stade I), tandis que les CPP35 proviennent d'une tumeur à un stade plus avancé (stade II) et les CPP6 correspondent au stade métastatique du cancer (stade IV). A noter que ces types cellulaires issus du patient *ex vivo* proviennent tous du même organe : le côlon.

De même que pour les lignées cellulaires du cancer colorectal, les trois cultures primaires sont cultivées dans trois conditions suivantes : (i) NM : une semaine dans le milieu normal adapté aux cultures primaires ; (ii) DM : une semaine dans le milieu défini ; (iii) DM+ : deux semaines dans le milieu défini. Les cellules cancéreuses issues des patients étant plus fragiles que les lignées commerciales, il est nécessaire d'adapter le milieu de culture afin de maintenir une bonne viabilité.

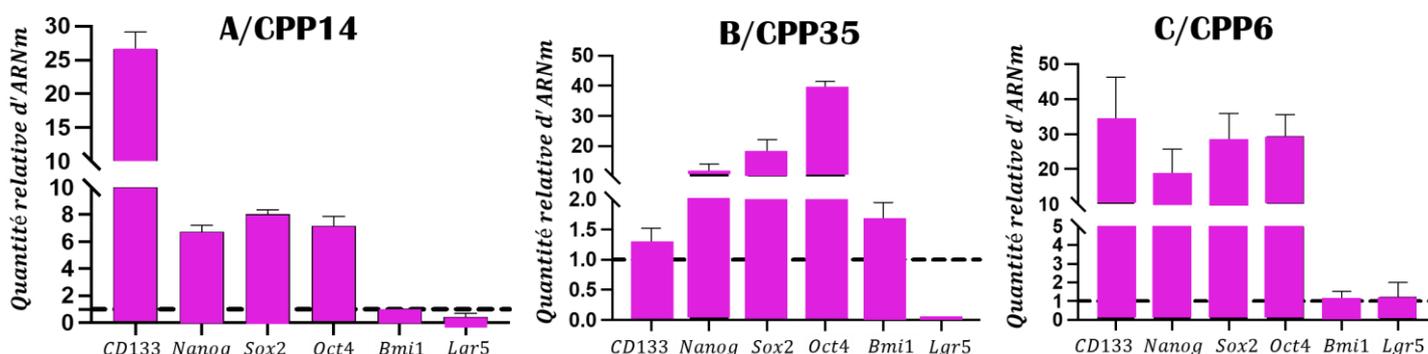


Figure II.24 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation des cellules de cultures primaires (A) CPP14, (B) CPP35 et (C) CPP6, cultivées dans les conditions NM (lignée pointillée) et en DM (en rose)



Sur la Figure II.24, les niveaux d'expression d'ARNm des cellules CPP14, CPP35 et CPP6 cultivées dans les conditions DM (en rose) ont été normalisés respectivement au niveau d'expression dans les conditions NM (ligne pointillée). Pour chaque culture primaire, une grande majorité des immuno-marqueurs analysés montre une surexpression lorsque les cellules du CCR sont cultivées pendant une semaine dans le milieu DM, confirmant ainsi la présence plus importante de CSCs.

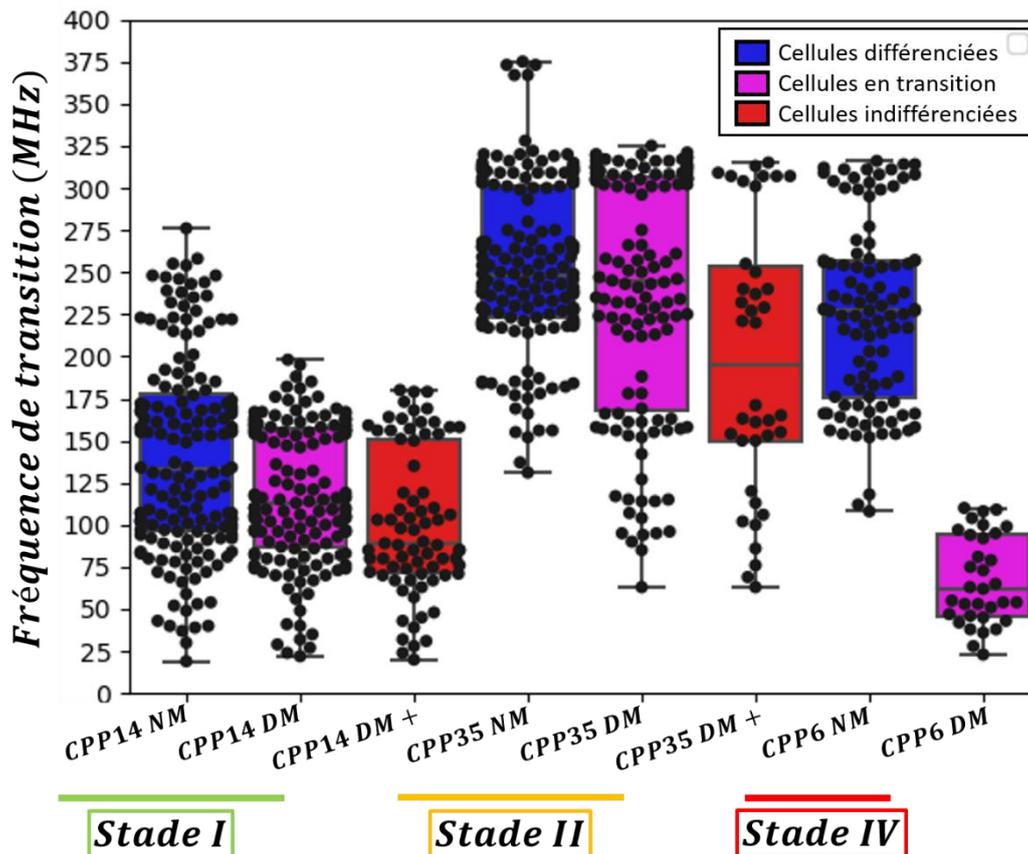


Figure II.25 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules de cultures primaires, cultivées dans trois différentes conditions : (i) 7 jours en milieu normal NM, (ii) 7 jours en milieu défini DM, (iii) 15 jours en milieu défini DM+

La Figure II.25 représente la distribution des fréquences de transition mesurées pour chaque culture cellulaire. Par comparaison aux lignées commerciales, on retrouve un étalement plus important des signatures UHF-DEP obtenues pour toutes les différentes cultures primaires. Les cellules CPP14 NM, DM et DM+ présentent une large plage de recouvrement des fréquences de transition entre 25MHz et 175MHz. Il en va de même avec les cellules CPP35 qui présentent un fort recouvrement entre les différentes conditions de culture entre 130MHz et 320MHz. Pour la culture primaire de stade plus élevé, les signatures des CPP6 NM et DM n'ont pas de zone de recouvrement et c'est pourquoi nous n'avons pas testé le maintien de deux semaines dans le milieu défini pour cette culture primaire.



Tableau II.9 : Tableau reportant les valeurs mesurées des fréquences de transition UHF des cultures primaires

| <i>Culture primaire</i> | Condition de culture | Nombre de cellules | Valeur médiane | Ecart-type |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>CPP14 (Stade I)</i> | Condition NM | 160 | 133 MHz | 59 MHz |
| | Condition DM | 149 | 113 MHz | 41 MHz |
| | Condition DM+ | 74 | 89 MHz | 44 MHz |
| <i>CPP35 (Stade II)</i> | Condition NM | 160 | 248 MHz | 50 MHz |
| | Condition DM | 123 | 245 MHz | 73 MHz |
| | Condition DM+ | 38 | 196 MHz | 81 MHz |
| <i>CPP6 (Stade IV)</i> | Condition NM | 100 | 227 MHz | 54 MHz |
| | Condition DM | 33 | 62 MHz | 26 MHz |

Selon les données du Tableau II.9, pour les CPP14, dans les conditions NM, la valeur médiane de l'ensemble des f_{x02} est de 133MHz, après une semaine de culture dans le milieu défini, la médiane de la nouvelle signature UHF-DEP diminue à 113MHz. Lorsque les cellules sont maintenues dans les conditions DM+, la valeur médiane chute à 89MHz. On observe cette même tendance de baisse de la fréquence de transition pour les CPP35 et CPP6. Les écarts-types élevés observés pour les CPP14 NM, CPP35 NM/DM/DM+ reflètent l'hétérogénéité au sein de la population cellulaire. Cependant, pour la culture des CPP14, l'écart-type diminue dans les conditions du milieu défini du fait de la disparition de certaines fréquences de transition élevées (au-delà de 200MHz).

En corrélation avec les résultats biologiques précédents, on retrouve la même dynamique qu'avec les lignées commerciales, c'est-à-dire que les populations *ex vivo* enrichies en cellules souches présentent une fréquence de transition plus faible.

Par la suite, nous allons étudier le pouvoir transformant des EVs sécrétées par des cellules cancéreuses issues du patient. Nous porterons notre attention sur les cultures dont le stade est le plus avancé : CPP6 (stade IV). Les oncosomes seront extraits du surnageant des populations de cellules considérées comme les plus agressives, c'est-à-dire les plus concentrées en CSCs. Avec les différentes conditions d'exposition expérimentées sur les lignées cellulaires, nous avons décidé de mettre en contact les cellules cibles avec deux doses d'EVs sécrétées par les CPP6 DM.



IV.3.2.b. Evaluation du potentiel transformant des EVs de cultures primaires

Dans cette partie, nous avons mené les mêmes tests que précédemment cette fois ci avec les cellules du même patient CPP6 où seul le phénotype changera avec des EVs sécrétées par les cellules enrichies en CSCs mises en contact sur des cellules cancéreuses différenciées.

Tableau II.10 : Synthèse du plan d'expérience (cf Figure II.11)

| Type de cellules | CPP6 NM | CPP6 DM |
|-------------------|-----------------|---|
| Rôle expérimental | Cellules cibles | Cellules sécrétrices d'EVs (2 doses) |

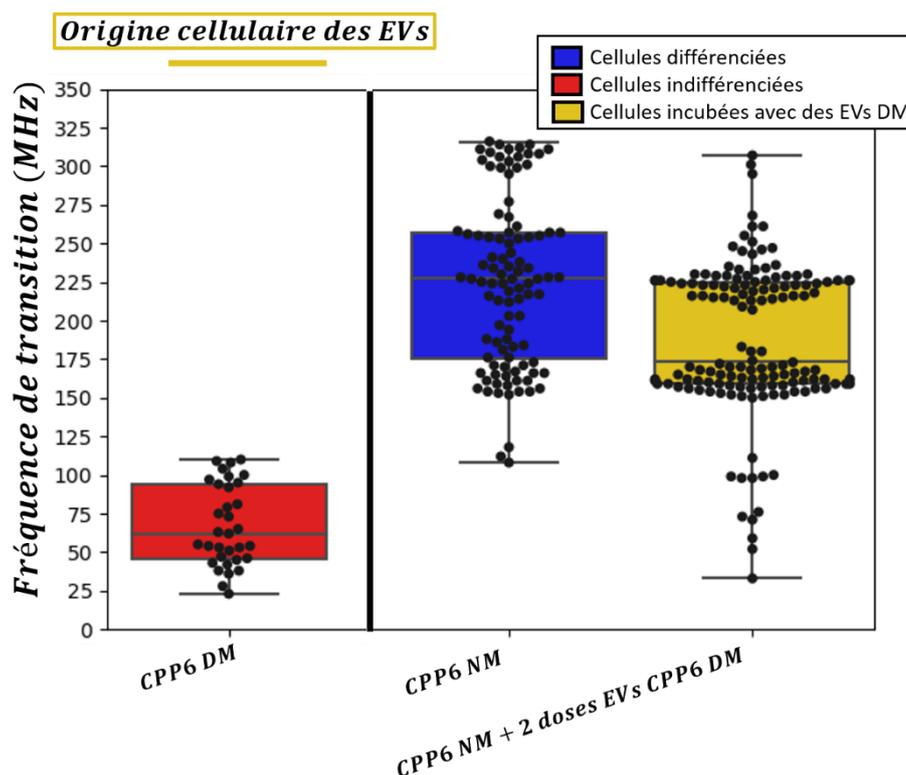


Figure II.26 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules CPP6 NM incubées avec des EVs sécrétées par des CPP6 DM. Les cellules sont incubées pendant 72h avec deux doses d'EVs.

A première vue, on peut voir qu'après exposition des EVs des CSCs, la signature électromagnétique a diminué. On peut noter quelques événements apparaissant à basse fréquence, inférieure à 125MHz. On peut remarquer qu'au niveau de la répartition des fréquences de transition, il



y a deux groupes qui se distinguent dans la population des cellules exposées : un premier groupe entre le premier quartile et la médiane, et un deuxième groupe au niveau du troisième quartile. Rappelons que la valeur médiane pour la signature de référence CPP6 NM est de 227MHz et celle des CPP6 DM est de 62MHz. Après exposition aux EVs CPP6 DM, la valeur médiane de la f_{x02} décroît jusqu'à 174MHz

De même que précédemment, il est intéressant d'étudier la répartition des fréquences de transition mesurées pour chaque condition d'exposition aux EVs. Pour cela, la plage de fréquences a été divisée en quatre différentes zones :

- Cellules souches cancéreuses : lorsque les fréquences mesurées sont inférieures à 140MHz. Toute la population cellulaire des CPP6 DM se trouve dans cette gamme de fréquence.
- Premier groupe EVs : entre 140MHz et 185MHz. C'est la zone dans laquelle se trouve le premier paquet de cellules CPP6 NM exposées aux EVs de CSCs.
- Zone de creux : entre 185MHz et 205MHz. C'est la zone dans laquelle il n'y a aucune fréquence de transition mesurée dans la population des cellules exposées aux EVs.
- Deuxième groupe EVs : entre 205MHz et 280MHz. C'est la zone dans laquelle se trouve le deuxième paquet de cellules CPP6 NM exposées aux EVs de CSCs.
- Cellules différenciées haute fréquence : lorsque les fréquences de transition mesurées sont supérieures à 280MHz. Par rapport à la population CPP6 NM de référence, cela représente le groupe de fréquences de transition qui se détache de la valeur médiane.

Tableau II.11 : Tableau reportant la répartition des fréquences de transition mesurées selon les zones prédéfinies (CSCs, 1^{er} groupe EVs, zone de creux, 2^e groupe EVs, cellules différenciées haute fréquence) en fonction des différentes conditions d'exposition des EVs de CPP6 DM

| | CPP6 DM | CPP6 NM | 2 doses EVs |
|-----------------------|---------|---------|--------------|
| $f < 140MHz$ | 100% | 3% | 8,5% |
| $140MHz < f < 185MHz$ | 0% | 27% | 44,4% |
| $185MHz < f < 205MHz$ | 0% | 7% | 0% |
| $205MHz < f < 280MHz$ | 0% | 44% | 45% |
| $280MHz < f$ | 0% | 19% | 2,1% |



A première vue, la répartition des fréquences de transition pour les cellules exposées aux EVs a globalement changé, sauf dans la zone du deuxième groupe EVs, c'est-à-dire dans la gamme de fréquence comprise entre 205MHz et 280MHz. On peut noter que le nombre de cellules ayant une fréquence de transition élevée (supérieure à 280MHz) a drastiquement chuté lorsqu'elles sont exposées aux EVs de cellules enrichies en CSCs. De plus, le tableau met l'accent sur le fait que la population est répartie en deux groupes séparés avec un « vide » qui s'étend sur une plage d'environ 20MHz (précisément entre 183MHz et 207MHz). Dans les deux zones de plus basses fréquences (inférieures à 185MHz), on peut trouver 30% des cellules différenciées de la population de référence alors que pour ces mêmes cellules incubées avec des EVs de CSCs, ce chiffre augmente considérablement et atteint les 52,9%.

On peut en conclure qu'à partir de cellules de cultures primaires avec le même stade métastatique, les EVs sécrétées par des cellules présentant un phénotype souche ont un impact majeur global sur la signature des cellules cancéreuses différenciées. On observe la même tendance que pour les lignées cellulaires, à savoir la baisse de la f_{x02} lorsque des cellules différenciées sont incubées avec des EVs de cellules enrichies en CSCs.

De même que précédemment, une analyse transcriptomique du niveau d'expression des immuno-marqueurs d'indifférenciation des cellules CPP6 NM incubées avec une dose d'EVs des CPP6 DM (en jaune) pendant 24h est présentée Figure II.27.

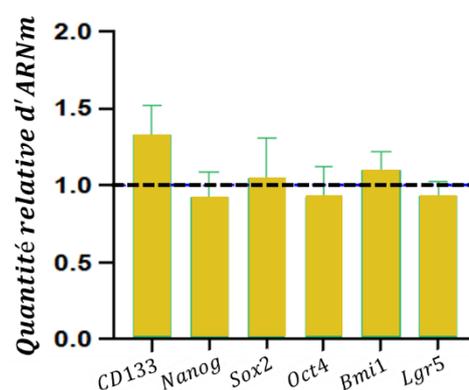


Figure II.27 : Analyse comparative transcriptomique du niveau d'expression de six marqueurs d'indifférenciation : CD133, Nanog, Sox2, Oct4, Bmi1 et Lgr5, des cellules CPP6 NM (ligne pointillée), des cellules CPP6 NM incubées avec des EVs de CPP6 DM (en jaune). Les cellules ont été incubées avec une dose d'EVs pendant 24h.



D'après la Figure II.27, les immuno-marqueurs ne sont pas surexprimés lorsque les CPP6 NM sont incubées avec des EVs de CPP6 DM. L'expression de ces marqueurs est analysée à 24h car les changements au niveau du transcriptome sont rapides. En dépit du changement de la fréquence de transition, aucun effet biologique n'est observé. Cependant, cela ne signifie pas que rien n'a évolué au niveau biologique, mais que les quelques protocoles choisis parmi un large choix ne sont pas révélateurs. On peut voir ainsi la limite des analyses biologiques que notre biocapteur peut compléter et donner des informations sur l'état des cellules traitées.

Dans cette partie, nous avons vu que lorsque les cellules cancéreuses différenciées sont incubées avec des EVs sécrétées par des CSCs, la signature électromagnétique diminue. Grâce à l'outil de diagnostic, nous pouvons quantifier l'ampleur du phénomène avec l'analyse en single-cell. En effet, bien qu'une baisse de la f_{x02} soit notable, seulement une partie de la population cellulaire est réceptive aux oncosomes. Après incubation avec les EVs de cellules indifférenciées, les cellules isolées des échantillons de tumeurs CCR de patients *ex vivo* présentent un comportement similaire à celui observé avec la lignée SW480 *in vitro*.



V. Conclusion du Chapitre II

Dans ce second chapitre, nous avons exploité notre outil microfluidique de caractérisation cellulaire basé sur la diélectrophorèse. L'objectif était de discriminer et d'identifier la sous-population des CSCs. Dans un premier temps, nous avons mesuré les deux signatures électromagnétiques basse et haute fréquences de cellules individuelles issues de lignée du cancer colorectal. Les cellules SW620 ont été cultivées dans deux conditions distinctes : l'une induisant la différenciation et la seconde sélectionnant les cellules indifférenciées. Nos résultats suggèrent que l'expression des immunomarqueurs des CSCs et la mesure de la fréquence de transition f_{x02} sont étroitement corrélés. Les cellules présentant un phénotype souche ont une forte probabilité d'être identifiées par une signature électromagnétique UHF-DEP plus faible. Nous avons démontré que l'exploitation habituelle de la première fréquence de transition f_{x01} ne permet pas de discriminer clairement les cellules cancéreuses souches du CCR des cellules cancéreuses différenciées. En effet, dans le régime des ultra hautes fréquences, notre dispositif microfluidique est plus à même d'appliquer des ondes capables d'interagir avec le contenu intracellulaire ; contenu qui semble plus différenciant vis-à-vis des caractéristiques « souches » des cellules cancéreuses. Nous avons ainsi pu évaluer les capacités de discrimination de notre laboratoire-sur-puce. La technique UHF-DEP apparaît donc très appropriée pour étudier le phénotype des cellules tumorales.

Par la suite, nous nous sommes concentrés sur la fréquence de transition f_{x02} , confirmée comme étant un paramètre discriminant pour les cellules indifférenciées et nous avons renforcé la pertinence de l'utilisation de la méthode de caractérisation UHF-DEP par une étude cinétique de l'acquisition du caractère « souche ». Nous avons ainsi pu démontrer la robustesse de notre outil de diagnostic quant à sa capacité de suivre la cinétique d'indifférenciation sur trois lignées tumorales différentes dans un milieu d'enrichissement en CSCs.

Ensuite, nous avons collecté les oncosomes sécrétés par la lignée cellulaire SW620 (CCR stade III) NM et DM+ pour les incubés avec des cellules SW480 (CCR stade II) NM. Il s'est avéré que seules les EVs DM+ ont induit un changement significatif dans la signature électromagnétique de la population exposée. Comme les faibles valeurs de la fréquence de transition apparaissent être corrélées au phénotype « souche », il semblerait que les EVs DM+ soient capables d'entraîner une indifférenciation des cellules cancéreuses. Ces modifications sembleraient permanentes car la signature UHF-DEP est stable après au moins une division cellulaire et le phénomène de diminution de la fréquence de transition est amplifiée après des expositions répétées aux oncosomes DM+. De plus, nous avons complété notre étude avec des cellules de patient isolées en cultures primaires, nous permettant d'avoir une première exploitation pré-clinique de notre outil de diagnostic. Nous avons en particulier sélectionné la culture primaire CPP6 de stade métastatique, culture qui a permis de sécréter les EVs. Les cellules CPP6



différenciées ont été incubées avec deux doses successives d'EVs sécrétées par les CPP6 DM. Nous avons remarqué un même comportement que pour les lignées, c'est-à-dire une baisse de la fréquence de transition.

Au cours de ce chapitre, nous avons vu que notre outil de diagnostic est suffisamment sensible pour détecter des changements de signature UHF-DEP et donc de contenu intracellulaire. De plus, nous avons montré que notre capteur électromagnétique a permis d'apporter une nouvelle information comparée aux techniques d'immuno-marquage conventionnelles : une analyse physique « single-cell ». En effet, cela nous permet alors d'obtenir la distribution des signatures UHF-DEP sur une certaine plage de fréquences, mettant en exergue l'hétérogénéité du contenu intracellulaire au sein d'une même population. Il s'est avéré qu'au cours de certaines caractérisations DEP, des f_{x02} de cellules se regroupent par paquets, suggérant un phénotype proche. Il serait intéressant de pouvoir isoler les cellules présentant des fréquences de transition communes afin d'avoir une plus fine identification de leur état d'indifférenciation. En outre, l'acquisition des fréquences de transition est très rapide et se fait en quelques heures, alors que les tests fonctionnels sont réalisés sur une période entre plusieurs jours à plusieurs semaines. L'outil de diagnostic pourrait apporter une aide précieuse aux biologistes en établissant des plans d'expérience. En utilisant le capteur dans un premier temps, plusieurs conditions expérimentales peuvent être testées et si les résultats obtenus sont satisfaisants, alors seulement en deuxième temps, les biologistes pourront lancer leur batterie de tests ciblés.



VI. Référence bibliographique du Chapitre II

- [1] F. Hjeij, « Caractérisation diélectrique de cellules biologiques par diélectrophorèse haute fréquence », Université de Limoges, Limoges, 2018. Consulté le: 14 octobre 2019. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02280081>
- [2] S. Orłowski et L. M. Mir, « Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.*, vol. 1154, n° 1, p. 51-63, juin 1993, doi: 10.1016/0304-4157(93)90016-H.
- [3] F. Hjeij *et al.*, « UHF dielectrophoretic handling of individual biological cells using BiCMOS microfluidic RF-sensors », in *2016 46th European Microwave Conference (EuMC)*, oct. 2016, p. 265-268. doi: 10.1109/EuMC.2016.7824329.
- [4] S. Shim, K. Stemke-Hale, J. Noshari, F. F. Becker, et P. R. C. Gascoyne, « Dielectrophoresis has broad applicability to marker-free isolation of tumor cells from blood by microfluidic systems », *Biomicrofluidics*, vol. 7, n° 1, p. 011808, janv. 2013, doi: 10.1063/1.4774307.
- [5] R. Pethig *et al.*, « Dielectrophoretic studies of the activation of human T lymphocytes using a newly developed cell profiling system », *ELECTROPHORESIS*, vol. 23, n° 13, p. 2057-2063, 2002, doi: 10.1002/1522-2683(200207)23:13<2057::AID-ELPS2057>3.0.CO;2-X.
- [6] U. Kaatze, « Complex permittivity of water as a function of frequency and temperature », *J. Chem. Eng. Data*, vol. 34, n° 4, p. 371-374, oct. 1989, doi: 10.1021/je00058a001.
- [7] E. B. Hendry, « Osmolarity of Human Serum and of Chemical Solutions of Biologic Importance », *Clin. Chem.*, vol. 7, n° 2, p. 156-164, avr. 1961, doi: 10.1093/clinchem/7.2.156.
- [8] M. Cheray *et al.*, « Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma », *Exon Publ.*, p. 59-71, sept. 2017, doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch4.
- [9] R. Manczak *et al.*, « UHF-Dielectrophoresis Crossover Frequency as a New Marker for Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells », *IEEE J. Electromagn. RF Microw. Med. Biol.*, vol. 3, n° 3, p. 191-198, sept. 2019, doi: 10.1109/JERM.2019.2895539.
- [10] E. Lambert *et al.*, « Microfluidic Lab-on-a-Chip Based on UHF-Dielectrophoresis for Stemness Phenotype Characterization and Discrimination among Glioblastoma Cells », *Biosensors*, vol. 11, n° 10, Art. n° 10, oct. 2021, doi: 10.3390/bios11100388.
- [11] T. Provent *et al.*, « A High Frequency Dielectrophoresis Cytometer for Continuous Flow Biological Cells Refinement », in *2020 50th European Microwave Conference (EuMC)*, janv. 2021, p. 921-924. doi: 10.23919/EuMC48046.2021.9338228.
- [12] M. Luthringer et J. Marziale, « Colon Cancer Treatment (PDQ®): Treatment-Health Professional Information [NCI] ».
- [13] G.-J. Tong *et al.*, « Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data », *World J. Clin. Oncol.*, vol. 9, n° 7, p. 148-161, nov. 2018, doi: 10.5306/wjco.v9.i7.148.
- [14] Institut du Cancer de Montpellier - Val d'Aurelle, « Prospective, Multicenter, Clinical and Biological Database Set-up in Colon Cancer and Colic Tumors », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT03976960, nov. 2021. Consulté le: 23 mai 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03976960>
- [15] C. A. Gilbert et A. H. Ross, « Cancer stem cells: Cell culture, markers, and targets for new therapies », *J. Cell. Biochem.*, vol. 108, n° 5, p. 1031-1038, 2009, doi: 10.1002/jcb.22350.
- [16] O. N. Suslov, V. G. Kukekov, T. N. Ignatova, et D. A. Steindler, « Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, n° 22, p. 14506-14511, oct. 2002, doi: 10.1073/pnas.212525299.
- [17] S. Shaheen, M. Ahmed, F. Lorenzi, et A. S. Nateri, « Spheroid-Formation (Colonsphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer », *Stem Cell Rev. Rep.*, vol. 12, n° 4, p. 492-499, août 2016, doi: 10.1007/s12015-016-9664-6.



- [18] S. Pinet *et al.*, « TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells », *Oncotarget*, vol. 7, n° 31, p. 50349-50364, juill. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10387.
- [19] D. Olmeda, D. Cerezo-Wallis, E. Castellano-Sanz, S. García-Silva, H. Peinado, et M. S. Soengas, « Physiological models for in vivo imaging and targeting the lymphatic system: Nanoparticles and extracellular vesicles », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 175, p. 113833, août 2021, doi: 10.1016/j.addr.2021.113833.
- [20] I. CHERCIU, A. BĂRBĂLAN, D. PIRICI, C. MĂRGĂRITESCU, et A. SĂFTOIU, « Stem Cells, Colorectal Cancer and Cancer Stem Cell Markers Correlations », *Curr. Health Sci. J.*, vol. 40, n° 3, p. 153-161, 2014, doi: 10.12865/CHSJ.40.03.01.
- [21] M. Mathonnet *et al.*, « Hallmarks in colorectal cancer: Angiogenesis and cancer stem-like cells », *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 20, n° 15, p. 4189-4196, avr. 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i15.4189.
- [22] G. Tabatabai et M. Weller, « Glioblastoma stem cells », *Cell Tissue Res.*, vol. 343, n° 3, p. 459-465, mars 2011, doi: 10.1007/s00441-010-1123-0.
- [23] H. Liang, « Advanced glycation end products induce proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of human SW480 colon cancer cells through the PI3K/AKT signaling pathway », *Oncol. Lett.*, vol. 19, n° 4, p. 3215-3222, avr. 2020, doi: 10.3892/ol.2020.11413.
- [24] T. Tian, Y. Wang, H. Wang, Z. Zhu, et Z. Xiao, « Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy », *J. Cell. Biochem.*, vol. 111, n° 2, p. 488-496, 2010, doi: 10.1002/jcb.22733.



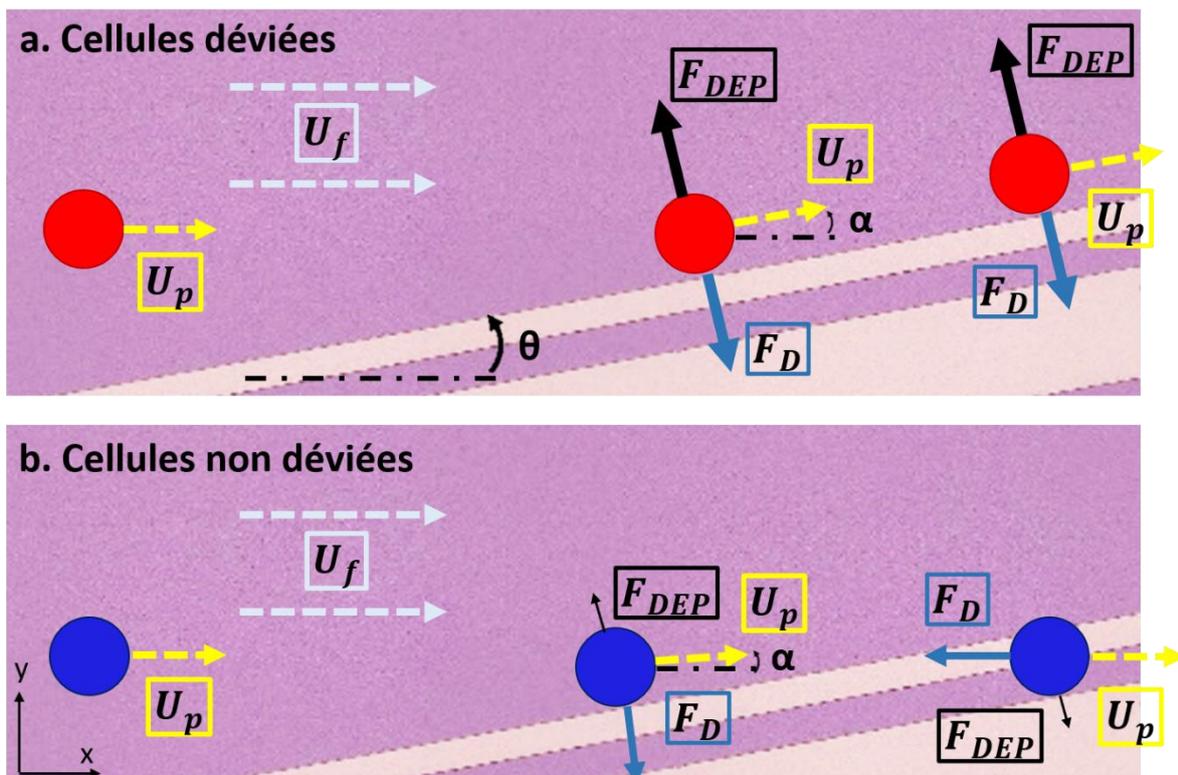
Chapitre III. Développement d'un cytomètre électromagnétique basé sur la diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence pour le tri cellulaire en flux



I. Introduction

Au cours du Chapitre II, nous avons pu caractériser les cellules individuellement en mesurant leur fréquence de transition. Cette étape de caractérisation électromagnétique est utile pour obtenir des informations diélectriques sur une population connue. Comme nous l'avons démontré, à haute fréquence, les cellules cancéreuses différenciées semblent présenter une signature électromagnétique distincte des CSCs.

Sur cette base, nous allons à présent proposer une méthode de tri pour isoler la sous-population de cellules souches cancéreuses d'une suspension cellulaire issue à terme d'une culture primaire ou d'un échantillon dissocié, grâce à un cytomètre basé sur la diélectrophorèse haute fréquence. Pour ce faire et démontrer la faisabilité de notre approche, nous allons exploiter les signatures UHF-DEP précédemment obtenues sur des modèles de lignées cellulaires en sélectionnant pour nos expériences la lignée tumorale présentant le plus grand écart dans les fréquences de transition entre les conditions de culture NM et DM : les SW620 (cancer colorectal de stade III). En effet, la force DEP répulsive serait plus intense pour une population cellulaire vis-à-vis de l'autre permettant une déviation et une séparation sélective.



Le principe de fonctionnement du cytomètre diélectrophorétique que nous avons conçu consiste à utiliser la force DEP en répulsion ; ce qui revient à dire qu'il fonctionne en régime nDEP pour que le champ électrique puisse dévier les cellules d'intérêt tout en limitant les phénomènes d'adhésion cellulaire sur les électrodes, souvent amplifiés par un régime de fonctionnement en pDEP. Contrairement au précédent laboratoire-sur-puce que nous utilisions pour mesurer les fréquences de transition, le flux de cellules est ici continu. Entrent alors en compétition deux forces : la force nDEP et la force de traînée générée par l'écoulement fluidique qui amène les cellules biologiques à suivre le mouvement et la direction du fluide. La fréquence de tri f_i choisie influence l'intensité de la réponse de la cellule biologique à être plus ou moins repoussée. A une fréquence f_i très supérieure à la f_{x02} , le facteur CM est important, résultant en une force DEP fortement répulsive et la cellule est repoussée par le champ électrique (Figure III.1A). A une fréquence f_i peu supérieure à la f_{x02} , la partie réelle du facteur CM est négative mais de faible valeur, la force DEP n'est plus assez importante pour repousser la cellule et le fluide continue à entrainer cette dernière selon sa trajectoire initiale (Figure III.B). Avec la dispersion des valeurs de la fréquence de transition, certaines cellules peuvent subir une force attractive pDEP faible, qui ne sera pas suffisante pour contrer la force de traînée.

Pour développer notre cytomètre DEP, nous nous sommes inspirés du prototype conçu par Thomas Provent au cours de ses travaux de thèse [1] (Figure III.2).

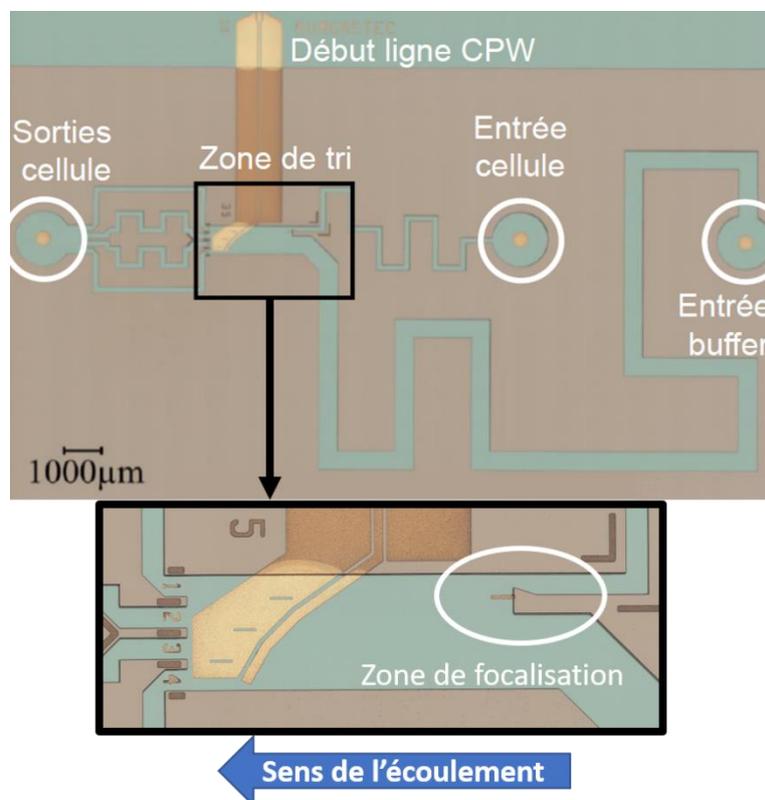


Figure III.2 : Cytomètre nDEP à quatre sorties développé lors des travaux de thèse de Thomas Provent [1]



Ce cytomètre diélectrophorétique est capable de diviser et de séparer une suspension cellulaire en quatre sous-populations. Pour cela, une électrode assez complexe a été conçue présentant trois inclinaisons différentes. En conséquence, les canaux de sorties doivent être positionnés de manière précise vis-à-vis des positions de changement d'inclinaison et l'écoulement des flux doit être parfaitement maîtrisé impliquant la contrainte d'avoir à imposer une contre-pression pour chaque sortie afin d'équilibrer les voies et ne pas perturber les trajectoires des cellules. Pour le canal principal ne soit pas trop large, une réduction la longueur des électrodes a été privilégiée. Elles sont alors plus épaisses et des problèmes d'adhésion cellulaire apparaissent aux endroits les plus rugueux. De plus, de par la valeur des angles d'inclinaison choisis (35° , 45° , et 60°), le débit de cellules doit rester faible dans le canal principal afin que leurs trajectoires puissent suivre les changements de direction imposés par pentes des électrodes métalliques. En pratiquant, il s'est avéré au final assez difficile de maintenir un écoulement fluide stable et de trouver les bonnes valeurs de contre-pressions pour maintenir un flux cellulaire continu et équilibré. En outre, le système de pressage du tampon de PDMS (décrit ultérieurement), a posé des problèmes de reproductibilité d'injection de la suspension cellulaire d'une campagne de tri à l'autre soit par le blocage du canal microfluidique avec des agglomérats lors d'un pressage trop serré, soit par des fuites dans le cas contraire.

Ainsi, afin de minimiser le nombre de difficultés rencontrées lors des travaux précédents, nous allons opérer des simplifications et des optimisations géométriques du réseau microfluidique pour mieux maîtriser les écoulements et les débits. Nous allons augmenter l'épaisseur des canaux microfluidiques à $100\ \mu\text{m}$ pour limiter les problèmes liés au pressage du PDMS. Nous avons pour objectif d'isoler les CSCs de la suspension cellulaire d'intérêt, c'est-à-dire collecter seulement deux sous-populations : une fortement enrichie en CSCs et une autre majoritairement composée de cellules cancéreuses différenciées. Cette application du cytomètre diélectrophorétique ne nécessite pas une architecture aussi complexe que celle présentée par la Figure III.2, mais requiert un débit cellulaire conséquent sur un temps assez long pour analyser une quantité suffisante de cellules récupérées à la fin du tri.

Nous allons dimensionner trois modules associés en série ayant chacun une fonction spécifique pour former le cytomètre DEP (Figure III.3) :

- **Module de focalisation cellulaire** : pour que le tri diélectrophorétique soit effectué dans des conditions optimales, il est nécessaire que les cellules biologiques arrivent toutes dans la même zone d'intersection avec les électrodes. C'est pourquoi le dispositif comporte une zone de focalisation avec une entrée des cellules et une entrée pour un liquide buffer (milieu DEP sans cellules) qui permet de plaquer les cellules contre une des parois du canal microfluidique et les focaliser dans une zone de quelques dizaines de microns de large.



- Module de tri UHF-DEP : constitué d'une électrode avec une géométrie particulière permettant la séparation des cellules et le guidage des cellules d'intérêt jusqu'à la voie de sortie souhaitée.
- Module de collecte des cellules triées : pour lequel le nombre de sorties indépendantes est réduit à deux et dont la géométrie favorise une collecte à une cadence assez élevée et équilibrée sans avoir recours à des contre-pressions.

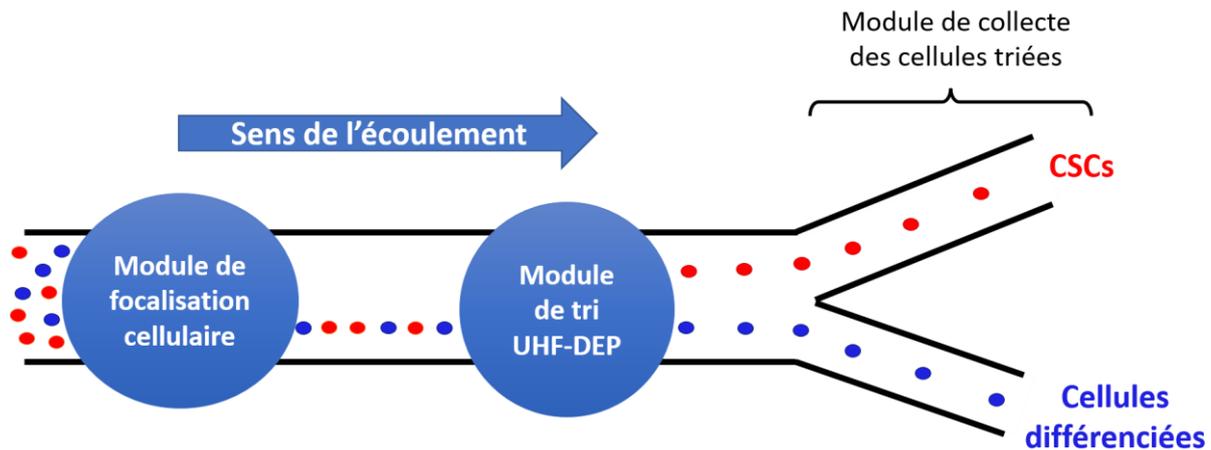


Figure III.3 : Implémentation des différents modules du cytomètre diélectrophorétique

En partant de ce principe, notre objectif consiste à implémenter un réseau microfluidique plus simple, pour travailler sans avoir à pressuriser les canaux de sortie et donc pouvoir collecter les cellules biologiques à la suite du tri dans n'importe quel conteneur à l'air libre et sans que ce dernier ne perturbe les paramètres d'écoulements dans les canaux et notamment dans la zone de tri. De plus la possibilité de pouvoir changer très facilement de conteneur pendant que le cytomètre fonctionne est avantageux. Cela nous permettra de pouvoir collecter les cellules triées dans des conteneurs différents des cellules ayant transitées au travers du cytomètre durant la phase de réglages des paramètres fluidiques et du signal DEP.

Au cours de ce chapitre, nous allons voir comment ont été conçus et optimisés les différents modules du cytomètre électromagnétique. Après avoir présenté la géométrie choisie nous montrerons et commenterons les premiers résultats de la séparation et d'extraction des cellules cancéreuses souches d'une suspension cellulaire.



II. Développement d'un outil de dimensionnement des canaux microfluidiques

Une des fonctions indispensables au laboratoire-sur-puce est de pouvoir faire circuler une suspension de cellules à travers des canaux microfluidiques. Dans notre cas, pour des applications de tri cellulaire, le dimensionnement de ces canaux est particulièrement crucial afin que les écoulements fluidiques soient laminaires et rectilignes et ainsi ne puissent pas induire des biais lors de la déviation des cellules par le cytomètre électromagnétique. Pour aider à la conception, un outil de dimensionnement des canaux microfluidiques a été codé en langage python, en se basant sur les équations régissant la mécanique des fluides.

II.1. Notions de microfluidique

La microfluidique est l'étude des écoulements fluidiques (gaz ou liquide) à l'échelle microscopique. La réduction de la taille du système entraîne des changements sur le comportement du fluide même si la base de la mécanique des fluides reste l'équation de Navier-Stokes qui peut s'écrire comme ci-dessous dans le cas général :

$$\left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\vec{u} \cdot \nabla) \vec{u}\right) = \vec{f}_{\text{vext}} - \frac{1}{\rho} \nabla p + \nu \Delta \vec{u} \quad (\text{III.1})$$

Avec ρ la masse volumique qui est constante car le milieu DEP est un fluide newtonien ; \vec{u} le vecteur vitesse du fluide ; ν la viscosité cinématique du fluide ; $\frac{\partial \vec{u}}{\partial t}$ le terme temporel (dans l'hypothèse stationnaire ce terme est nul); $(\vec{u} \cdot \nabla) \vec{u}$ les forces d'inertie ; \vec{f}_{vext} les forces volumiques extérieures, (comme notre milieu DEP est très faiblement conducteur, même sous l'application d'un champ électrique, ce terme est au final négligeable); ∇p les variations de pression mesurées dans le sens de l'écoulement ; $\mu \Delta \vec{u}$ le gradient des forces visqueuses.

Le nombre adimensionnel de Reynolds est le rapport entre les forces de convection et les forces visqueuses, ce qui permet de déterminer le type de régime (Figure III.4) pour l'écoulement du fluide [2] :

$$Re = \frac{U_{\text{max}} L_c}{\nu} \quad (\text{III.2})$$

avec U_{max} la vitesse maximale d'écoulement et L_c la longueur caractéristique.



- Si $Re < 2000$, le régime est dit laminaire [3]. Le terme convectif devient négligeable devant les forces visqueuses. Dans ce type d'écoulement, les particules du fluide sont à l'équilibre à chaque instant et se déplacent en lignes droites parallèles ; ce que nous recherchons. Il est possible de déterminer le profil de vitesse grâce à deux types d'écoulements : celui de Poiseuille dû à un gradient de pression ou celui de Couette dû à la mise en mouvement d'une des parois contenant le fluide.
- Si $2000 < Re < 2300$, le régime est dit transitoire.
- Si $Re > 2300$, le régime est dit turbulent. Le terme convectif devient dominant. En effet, en raison de l'état irrégulier engendré par les turbulences, des tourbillons apparaissent et se superposent aléatoirement. Il est alors difficile de prédire le profil de vitesse du fluide.

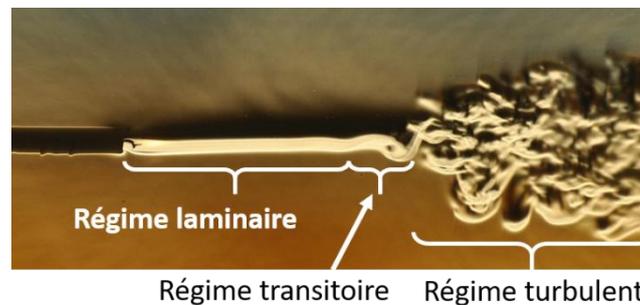


Figure III.4 : Illustration des différents régimes d'écoulements possibles⁸ grâce à la fumée d'une bougie

Dans notre cas, la section des canaux microfluidiques sera de l'ordre de $100 \mu\text{m}$, la vitesse d'écoulement du fluide est d'environ quelques mm/s et la viscosité cinématique de l'eau est de $10^{-6} \text{m}^2/\text{s}$. Grâce à la réduction de la taille du système, le nombre de Reynolds est très faible ($Re \approx 0,1$) et assure ainsi un régime d'écoulement laminaire lorsqu'on travaille en microfluidique.

Par la suite, nous considérons un cas 2D pour les calculs théoriques car la forme planaire des électrodes induira majoritairement une déviation dans un plan. Comme évoqué dans le Chapitre II, nous utilisons un contrôleur de flux externe qui exerce une pression sur le fluide afin de faire circuler la suspension cellulaire dans le microsystème. Il s'agit alors d'un écoulement de Poiseuille et l'équation de Navier-Stokes peut se simplifier de la manière suivante en supposant le flux stationnaire et totalement établi [2] :

$$0 = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial P}{\partial x} + \nu \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \quad (\text{III.3})$$

⁸ Source : https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89coulement_laminaire



Les conditions aux limites sont des conditions de non-glissements, c'est-à-dire que $u(y = h/2) = u(y = -h/2) = 0$ (voir Figure III.5). En résolvant l'équation (III.3), on obtient le profil de vitesse du fluide suivant :

$$u(z) = \frac{1}{2\mu} \frac{\partial P}{\partial x} \left(z^2 - \frac{h^2}{4} \right) \quad (\text{III.4})$$

Avec μ la viscosité dynamique du fluide.

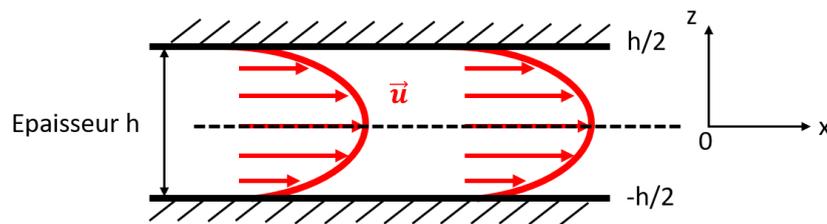


Figure III.5 : Profil de vitesse du flux dans le cas d'un écoulement de Poiseuille

Le profil de vitesse du fluide est parabolique avec une vitesse maximale au centre du canal microfluidique et une vitesse très faible proche des parois. En raison de la symétrie du système, ce profil de vitesse de l'écoulement de Poiseuille est le même sur la largeur y . Il est à noter que le gradient de pression est négatif, car le sens d'écoulement va des pressions les plus fortes aux pressions les plus faibles. Le gradient peut être approximé comme tel :

$$\frac{\partial P}{\partial x} = - \frac{P_{\text{sortie}} - P_{\text{entrée}}}{L} = - \frac{\Delta P}{L} \quad (\text{III.5})$$

Avec L la longueur du canal microfluidique.

II.1.1. Calcul des résistances microfluidiques

Il est possible de déterminer le débit fluidique qui se définit par la quantité de volume du fluide qui se déplace dans les canaux par seconde ou par la vitesse du fluide traversant une section S :

$$Q = \iint u(z) dS \quad (\text{III.6})$$

A partir du profil de vitesse (III.5) lors d'un écoulement de Poiseuille, nous pouvons exprimer le débit en fonction du gradient de pression :

$$Q = \int_{y=0}^w \int_{z=-h/2}^{h/2} \frac{-1}{2\mu} \frac{\Delta P}{L} \left(z^2 - \frac{h^2}{4} \right) dz dy \quad (\text{III.7})$$



Avec w la largeur du canal. En intégrant l'expression (III.7), on obtient :

$$Q = \frac{h^3 w}{12 \mu L} \Delta P \quad (\text{III.8})$$

Par analogie avec la loi d'Ohm [4], on peut identifier ce qu'on nomme la résistance hydraulique d'un canal fluide. Ce terme définit la capacité à laisser s'écouler un fluide à travers un canal. Elle dépend de la section du canal et de la viscosité du fluide :

$$R_H = \frac{12 \mu}{h^3 w} L \quad (\text{III.9})$$

On peut alors associer le débit Q à un courant électrique i et la pression P à la tension V . Grâce à l'analogie électrique/hydraulique, il est possible de représenter un réseau microfluidique par un circuit électrique comme dans la Figure III.6.

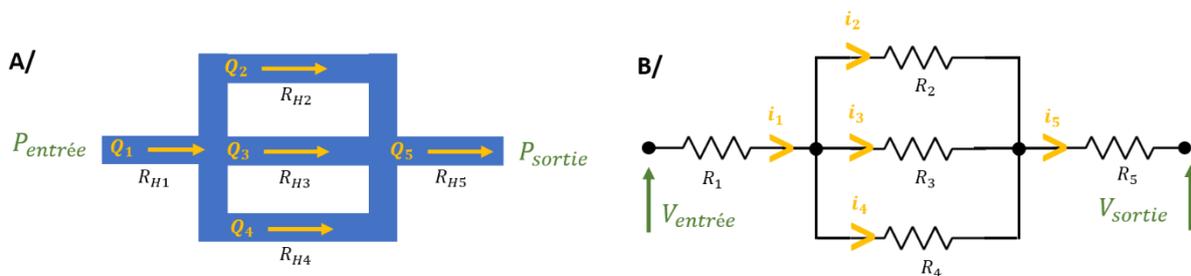


Figure III.6 : (A) Exemple d'un réseau microfluidique et (B) son schéma électrique équivalent

Un système de canaux hydrauliques de différentes sections mises bout à bout est considéré comme étant reliées en série [5]. La résistance hydraulique équivalente du système est égale à la somme des résistances hydrauliques de chaque section. Un système de deux canaux hydrauliques (ou plus) qui partent d'un point où ils étaient réunis pour se raccorder par la suite est considéré comme étant relié en parallèle [5]. L'inverse de la résistance (admittance) hydraulique équivalente du système est égal à la somme des admittances hydrauliques de chaque section.

Ainsi, à partir des lois des nœuds et des mailles, il est possible de dimensionner au premier ordre relativement simplement une puce microfluidique. En effet, nous ne pouvons contrôler que les pressions d'entrée et de sortie par des contrôleurs de flux externes. Or, comme l'appareil est limité dans les gammes de faibles pressions (inférieures à 3 mbar), il nous est toujours plus aisé de travailler à une plus forte gamme de pression, tout en pouvant ajuster la vitesse des cellules dans le canal pour les observer au microscope. Pour cela, il est nécessaire que la résistance hydraulique vue par le fluide soit assez élevée afin de travailler dans les gammes de pression adéquates sans pour autant que le débit fluide



augmente. Le dimensionnement se fait alors sur la géométrie des canaux microfluidiques en jouant sur les paramètres de la hauteur, de la largeur et de la longueur.

Les résistances hydrauliques sont liées aux pertes de charges régulières. Elles traduisent la perte d'énergie, générée par la viscosité et les frottements du fluide sur la paroi interne du canal. Il existe aussi des pertes de charges singulières qui sont la conséquence de changements de direction ou de section qui peuvent être évaluées de la manière suivante [6] :

$$\Delta P_s = 1/2 \rho k U_{\max}^2 \quad (\text{III.10})$$

Avec k le coefficient de singularité.

Ce coefficient peut être calculé dans le cas d'un régime laminaire selon la singularité rencontrée (Figure III.7) :

- Dans le cas d'un élargissement brusque (Figure III.7A), les pertes de pressions sont dues à la séparation provoquée par un gradient positif de pression résultant de la réduction de la vitesse d'écoulement. En régime laminaire, on a $k = 26/Re$ [6]. Si nous faisons l'application numérique de la perte de pression engendrée, alors $\Delta P_s = 0,5 * 997 \text{ kg.m}^{-3} * 26/0,1 * (1 \text{ mm.s}^{-1})^2 = 0,13 \text{ Pa}$. Or, si nous travaillons à une pression minimale de 1 mbar (soit 100 Pa), les pertes de pressions liées à des changements brusques de section sont négligeables.
- Dans le cas de coudes à 90° ou 180° présents dans des méandres (Figure III.7B), les pertes de pressions sont dues à l'augmentation de pression qui se produit dans la partie extérieure de la courbe, et de la diminution de la pression dans la partie inférieure. Cette différence de pression provoque une modification de la forme de l'écoulement. Le coefficient de singularité k varie entre 0,7 et 8 quelle que soit la forme du coude. Encore une fois, les pertes de pression engendrées sont négligeables.
- Dans le cas d'une bifurcation ou embranchement (Figure III.7C), les pertes de pressions sont dues au choc lors de la réunion des flux de vitesses différentes des canaux n°1 et n°2 et du changement de direction du flux n°2. Il faut tenir compte cette fois-ci de deux pertes de pression : celle concernant le canal rectiligne n°1 et celle du canal latéral n°2. Chaque branchement se caractérise par l'angle de déviation θ , par le rapport des aires des sections des deux branches et par le rapport des débits. Même si également dans ce cas, les pertes de pressions sont négligeables, pour certaines valeurs du rapport des débits, ces dernières peuvent être négatives, ce qui signifie une remontée du flux dans la branche négative [7]. Le cas des



embranchements et bifurcations sera détaillé plus tard dans ce chapitre, lors de l'optimisation du réseau microfluidique pour le cytomètre DEP.

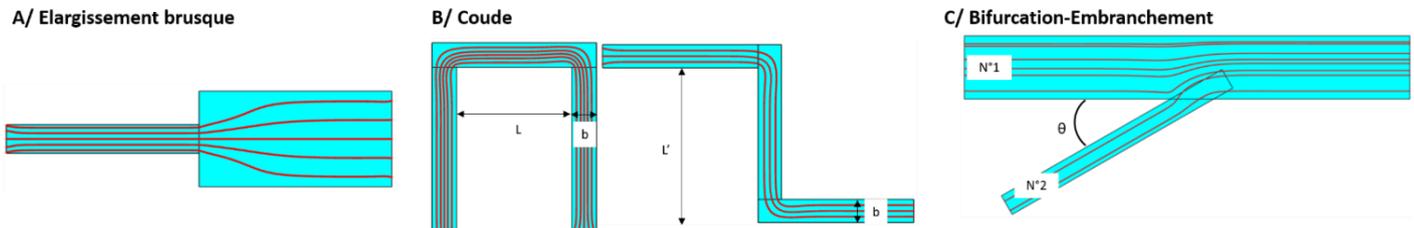


Figure III.7 : Exemples de cas courants de singularités rencontrées dans les canaux microfluidiques. Les zones en rouge représentent le décollement de la veine fluide avec une zone de recirculation dans le cas de vitesse d'écoulement élevée. Adapté de [6].

De manière générale, en régime laminaire les pertes de pressions singulières peuvent être négligées. Seules les résistances microfluidiques sont à prendre en compte lors du dimensionnement des canaux du cytomètre DEP afin d'optimiser le rapport ΔP et la vitesse des cellules.

II.1.2. S'affranchir des contre-pressions extérieures

La contre-pression se définit comme étant une pression de sens contraire à une autre. Dans notre cas, nous ajoutons une contre-pression en sortie du système microfluidique, opposée à la pression d'entrée et imposée par le contrôleur de flux. Cela nous permet de travailler à faible débit, garantissant de se trouver dans une gamme de pression stable, loin des zones de régulations limites de faible précision pour le contrôleur de flux par la génération d'un offset. Cependant pour chaque sortie, afin de pallier la faible valeur de la résistance microfluidique du système, il est nécessaire d'y ajouter une contre-pression extérieure générée par le contrôleur afin de réduire le débit fluide. Par conséquent, en plus de gérer les pressions d'entrée du buffer et de la suspension cellulaire, il faut aussi piloter deux contre-pressions, ce qui entraîne de fortes contraintes et des complications pour les futurs réglages fluidiques. Nous avons donc décidé de nous affranchir des contre-pressions extérieures des sorties afin de limiter les paramètres de réglages à ajuster en temps réel si besoin lors des manipulations.

Pour faire cela, nous pouvons utiliser le théorème de Bernoulli dans le cas hydrostatique car on peut considérer le liquide en mouvement d'ensemble [6] :

$$P + \rho gh = \text{constante} \quad (\text{III.11})$$



Avec h , la cote au-dessus d'un plan de référence aussi appelée hauteur géométrique. L'équation (III.11) traduit le bilan d'énergie le long d'une ligne de courant avec P qui exprime le travail des forces de pression et le deuxième terme représente la force potentielle.

Grâce à la hauteur géométrique h , il est alors possible d'élever les Eppendorfs de sortie à une altitude légèrement au-dessus du plan sur lequel repose la puce microfluidique afin d'ajouter une contre-pression sans force extérieure. Comme indiqué sur la Figure III.8, l'Eppendorf de sortie (n°7) est placé sur un support élévateur (n°6) afin d'ajuster la hauteur h_7 . On considère que la hauteur de l'Eppendorf d'entrée (n°1) est fixe, car ce dernier est rattaché à une platine de positionnement d'échantillons (n°2) sur laquelle est posée la puce microfluidique (n°4) et qui peut se déplacer sous l'objectif de microscope. Il nous est alors possible de régler la différence d'altitude entre l'entrée du capillaire d'entrée et la sortie du capillaire de sortie afin de contrôler la contre-pression induite.

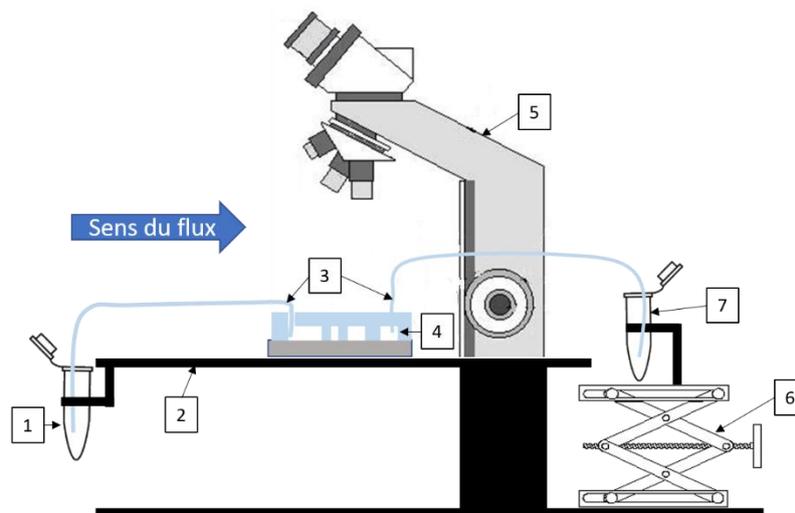


Figure III.8 : Schéma du banc expérimental permettant de contourner le recourt à des contre-pressions de sortie. (1) Eppendorf d'entrée sous pression ; (2) support de platine de positionnement ; (3) capillaires ; (4) puce microfluidique ; (5) microscope ; (6) support élévateur ; (7) Eppendorf de sortie à pression atmosphérique.

A partir de l'équation (III.11), on peut en déduire l'influence de l'altitude relative de l'Eppendorf n°7 sur la différence de pression. En ajoutant les pertes de pressions régulières induites par la résistance hydraulique des deux capillaires n°3 et du laboratoire-sur-puce, on obtient l'expression suivante [5] :

$$P_7 - P_1 = \rho g(h_1 - h_7) + \Delta P_{\text{rég}} \quad (\text{III.12})$$

Avec $P_{1,7}$ la pression respectivement d'entrée et de sortie, $h_{1,7}$ la hauteur géométrique et $\Delta P_{\text{rég}}$ la perte de pression régulière du système complet capillaires et micropuce.



Ainsi, si $h_7 > h_1$, la différence de pression entre l'entrée et la sortie diminue, et la vitesse dans le canal microfluidique diminue aussi. Il y a une hauteur h_{7c} critique telle que le premier terme de (III.12) devienne négatif et puisse compenser les pertes engendrées naturellement par la géométrie du système. Dans ce cas, le fluide est arrêté. Si ce terme devient supérieur, alors l'écoulement est inversé et se fait dans le sens : sortie vers entrée.

Il est possible alors de régler la vitesse d'écoulement du fluide visuellement et sans avoir à ajuster la pression d'entrée. En effet, on peut observer la vitesse de déplacement des cellules sous un microscope optique et ainsi ajuster la hauteur géométrique des Eppendorf de sorties. De plus, cette solution nous permet d'équilibrer les voies de sortie, c'est-à-dire répartir de manière égale les débits dans les voies parallèles (Figure III.9A). Si un des canaux a des pertes de pressions trop élevées, le fluide se voit opposer une trop forte résistance et sera principalement dévié vers l'autre sortie (Figure III.9B).

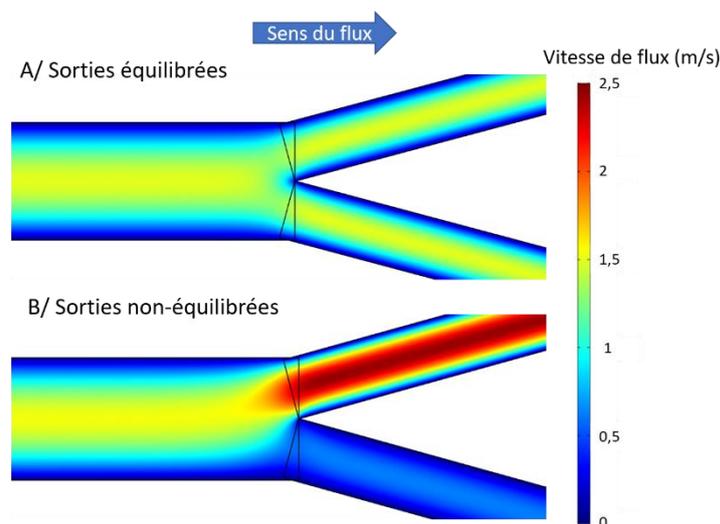


Figure III.9 : Simulation numérique de l'écoulement d'un fluide lorsque les sorties sont (A) équilibrées et (B) non équilibrées

II.2. Logiciel python avec interfaces graphiques

Le but du programme développé avec le langage python est de répondre à un besoin de simplification et d'aide à l'optimisation de la géométrie d'un réseau microfluidique. Ce logiciel se veut être facile d'utilisation grâce à ses interfaces graphiques et permet de récupérer les données géométriques entrées et calculées avec un fichier texte automatiquement généré.

Il existe des calculateurs mis à disposition par des entreprises spécialisées dans la microfluidique comme par exemple Fluigent : <https://www.fluigent.com/resources-support/support-tools/microfluidic->



Chapitre III. Développement d'un cytomètre électromagnétique basé sur la diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence pour le tri cellulaire en flux

calculators/flow-rate-pressure-calculator/. Cependant, les géométries des puces sont limitées à quatre formes : un canal droit, en forme de Y, en forme de X et en forme de H. Les configurations proposées ne correspondent pas à une application pour un cytomètre à plusieurs voies d'entrées et de sorties. De plus, une fois la géométrie choisie, les largeurs et les hauteurs des canaux microfluidiques sont les mêmes pour toutes les sections, il en est de même pour les capillaires avec un unique diamètre possible. Seules les longueurs restent modifiables. Il est donc nécessaire d'avoir un logiciel plus souple et plus personnalisable dans la géométrie proposée. C'est pourquoi le programme python développé laisse le choix du nombre de canaux d'entrée et de sortie ainsi que de leurs dimensions.

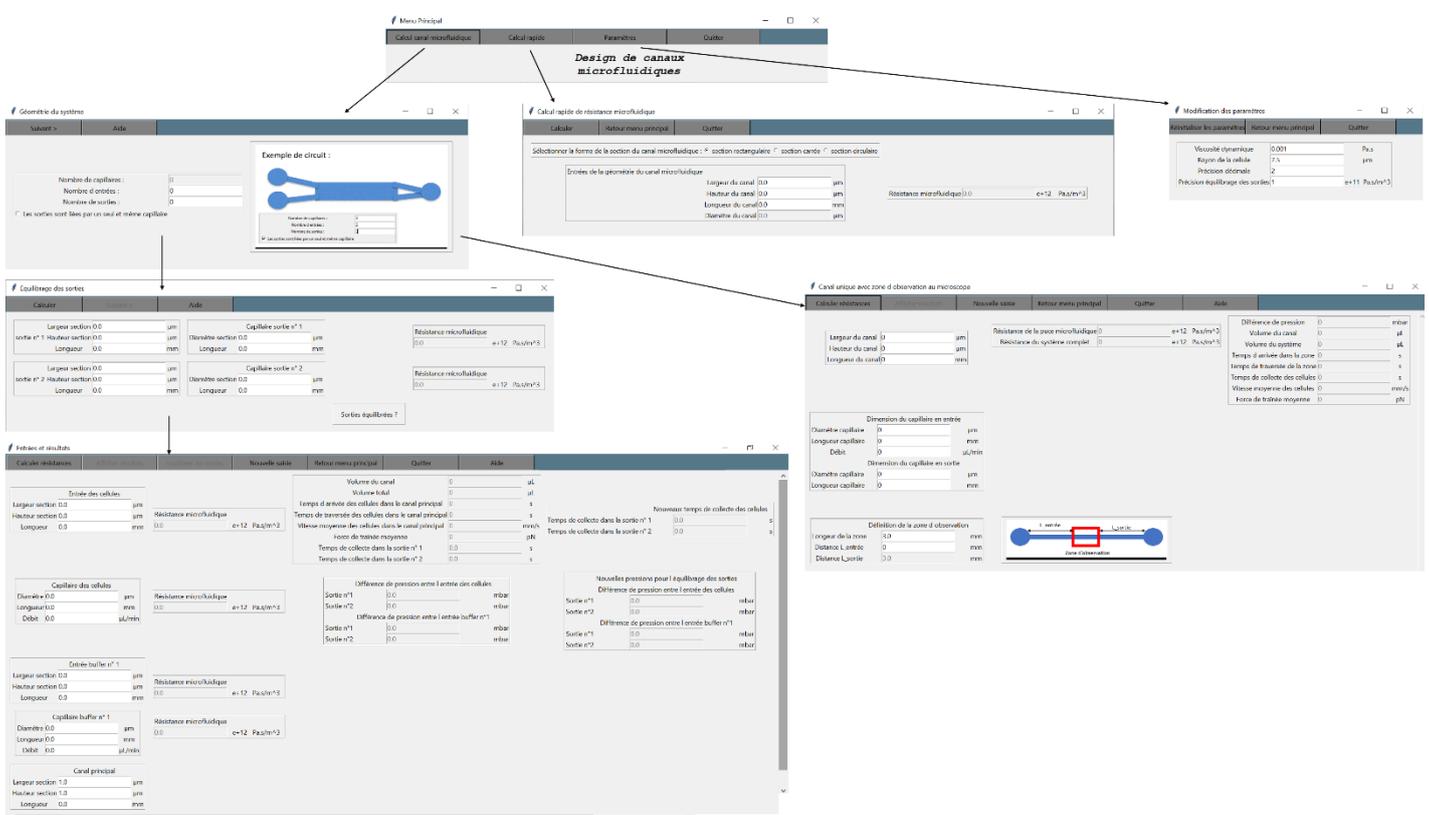


Figure III.10 : Aperçu des différentes fenêtres du logiciel python d'aide à la conception d'un réseau microfluidique

Le logiciel se présente sous plusieurs fenêtres selon la Figure III.10, les fenêtres seront zoomées en Annexe 2. La fenêtre principale permet d'accéder à différentes fonctionnalités :

- Le premier onglet « calcul canal microfluidique » permet d'accéder à la principale fonction du logiciel. Une nouvelle fenêtre s'affiche permettant de choisir le nombre de voies d'entrée et de sorties du cytomètre. Il est possible d'ajouter une option si les voies de sortie sont reliées entre elles. Le nombre de capillaires est automatiquement calculé en fonction des informations entrées. Un schéma explicatif montre un exemple de circuit microfluidique et comment remplir les informations correspondantes. Puis en cliquant sur « Suivant », on accède à une autre fenêtre



où il est possible de saisir les paramètres géométriques des canaux et capillaires de sorties. Le logiciel détecte si les sorties sont équilibrées, c'est-à-dire lorsque les résistances hydrauliques sont les mêmes, sinon un message apparaît. Enfin, une dernière fenêtre apparaît où la géométrie des canaux d'entrée et les débits désirés peuvent être saisis. Une fois tous les paramètres entrés, le logiciel peut calculer toutes les résistances hydrauliques et la différence de pression entre les entrées et les sorties. D'autres données sont fournies par le logiciel à savoir : le volume de la puce et du système complet ; les temps d'arrivée des cellules dans le canal principal, de traversée dans le canal principal et de collecte dans les différentes sorties ; une estimation de la vitesse moyenne des cellules dans le canal principal ; la force de traînée moyenne (qui est la force engendrée par le frottement entre le milieu et la cellule, cette force sera décrite plus tard). Toutes les variables saisies et calculées sont enregistrées dans un fichier créé au format « .txt » à la date du jour. Pour revenir sur une fenêtre précédente, il est possible de cliquer sur « Nouvelle saisie » et les paramètres précédemment saisis sont automatiquement pré-remplis. Cela facilite un futur traitement de données dans le cadre d'une étude paramétrique.

L'onglet « Calcul microfluidique » peut aussi servir à des ajustements post fabrication d'un laboratoire-sur-puce. En effet, il se peut qu'au moment de la fabrication, il y ait des tolérances plus ou moins grandes et que les dimensions fabriquées diffèrent des dimensions théoriques. Si les canaux de sorties ne sont pas de même dimension, alors le flux ne sera pas équilibré. Le logiciel est capable de proposer des pressions à adapter pour rééquilibrer l'écoulement, et les temps de collectes des cellules au bout du microsystème sont mis à jour. Afin de calculer les débits réels dans les voies de sorties géométriquement différentes, on utilise ce qu'on appelle la méthode de Hardy-Cross. Cette méthode consiste à donner des valeurs aux débits circulants dans toute la puce, puis d'y appliquer un facteur correctif Δ en rétablissant l'équilibre des pertes de charges régulières dans les boucles (ou mailles pour l'analogie électrique) I et II [8]. Si on prend l'exemple d'un réseau fluidique comme sur la Figure III.11, on a :

$$H_{ABCD} = H_{AD} = H_{AEFD} \quad (\text{III.13})$$

Avec H les pertes de charges dans chaque branche du réseau, et $H = \frac{32\mu LU}{g D_H^2}$, avec D_H le diamètre hydraulique de la section du canal.



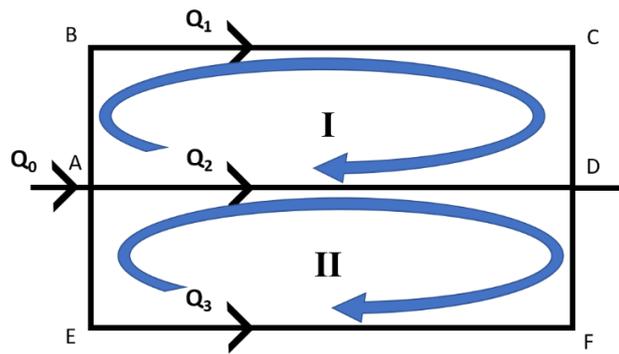


Figure III.11 : Schéma présentant la méthode de Hardy-Cross permettant de calculer les débits dans les conduites non équilibrées

Le facteur correctif de chaque boucle peut s'exprimer de la manière suivante [5] :

$$\Delta = - \frac{\sum_{\text{branche}} H}{1,85 * \sum_{\text{branche}} (H/Q_{\text{supposé}})} \quad (\text{III.14})$$

Il est possible de donner n'importe quelle valeur au débit supposé. Dans le programme python, il a été choisi de diviser le débit total par le nombre de sorties. L'objectif recherché étant de viser un équilibre du flux entre chaque voie de sortie, partir d'une répartition égale du débit ne paraît pas aberrant. Il est important de prendre en compte le sens des débits mis en jeu dans une boucle. On part du postulat d'un déplacement imposé du liquide de la gauche vers la droite. Les écoulements s'effectuant dans le sens inverse, entraînent des débits et des pertes de charges négatifs.

Dans le cas de la Figure III.11, on a les expressions des facteurs de correction suivant :

$$\Delta_I = - \frac{H_{ABCD} - H_{AD}}{1,85 * \left(\frac{H_{ABCD}}{Q_0/3} - \frac{H_{AD}}{Q_0/3} \right)} ; \Delta_{II} = - \frac{H_{AD} - H_{AEFD}}{1,85 * \left(\frac{H_{AD}}{Q_0/3} - \frac{H_{AEFD}}{Q_0/3} \right)} \quad (\text{III.15})$$

A partir de (III.15), on peut obtenir la valeur des débits réels dans chaque branchement en parallèle [5] :

$$Q_1 = Q_0/3 + \Delta_I ; Q_2 = Q_0/3 - \Delta_I + \Delta_{II} ; Q_3 = Q_0/3 + \Delta_{II} \quad (\text{III.16})$$

Une fois les débits réels circulants dans les voies de sortie connus, il est possible de jouer avec la différence de pression pour rééquilibrer le flux.

Dans le cas d'un unique canal microfluidique ou d'un système à trois voies (soit 1 entrée/2 sorties ou 2 entrées/1 sortie), une fenêtre spécialement dédiée à cette configuration s'ouvre. Les paramètres géométriques peuvent être saisis et les calculs fluidiques restent les mêmes. Dans cette fenêtre il est possible de connaître la résistance hydraulique de l'ensemble du système et à



la place d'un canal principal, on peut définir une zone d'intérêt pour calculer les temps d'arrivée, de traversée et de collecte des cellules à partir de cette zone.

- Le deuxième onglet du menu principal « Calcul rapide », permet de calculer la résistance hydraulique d'un canal microfluidique soit de section carrée, rectangulaire ou circulaire, en saisissant les paramètres géométriques.
- Le troisième onglet « Paramètres » permet de modifier des variables utilisées dans les calculs. Il est possible de changer la valeur de la viscosité dynamique du fluide, le rayon de la cellule, la précision décimale et le niveau de précision pour décider si les sorties sont équilibrées ou non. Des paramètres par défaut sont entrés et il est possible après modification des variables, de réinitialiser les paramètres par défaut.
- Le dernier onglet « Quitter » permet de fermer le programme en toute sécurité.

Pour chaque onglet, il est possible de revenir au menu principal en cliquant sur « Retour menu principal ». Pour exécuter le programme, il suffit de presser la touche F5, et dans la boîte de dialogue sera demandé le chemin d'accès du fichier dans lequel se trouve le programme. En appuyant sur « Entrée », la fenêtre du menu principal apparaît.

Ce logiciel python permet d'aider à la conception d'un réseau microfluidique qui, dans notre cas, sera implémenté au cytomètre électromagnétique en flux. Grâce aux différents paramètres calculés, on peut déterminer le meilleur dimensionnement. Afin de confronter les résultats prédits par le programme avec la pratique, nous allons fabriquer différents canaux microfluidiques.

II.3. Validation fluide du logiciel de conception développé sous python

Il est important d'éprouver les résultats présentés par le logiciel python pour valider l'exactitude de ses calculs d'un point de vue expérimental et pouvoir l'utiliser pour dimensionner et optimiser le réseau microfluidique du cytomètre électromagnétique en flux que nous allons concevoir. Pour ce faire, nous avons dessiné de simples canaux microfluidiques à une entrée et une sortie. La géométrie des différents canaux est présentée Figure III.12 et les dimensions associées sont reportées dans le Tableau III.1.



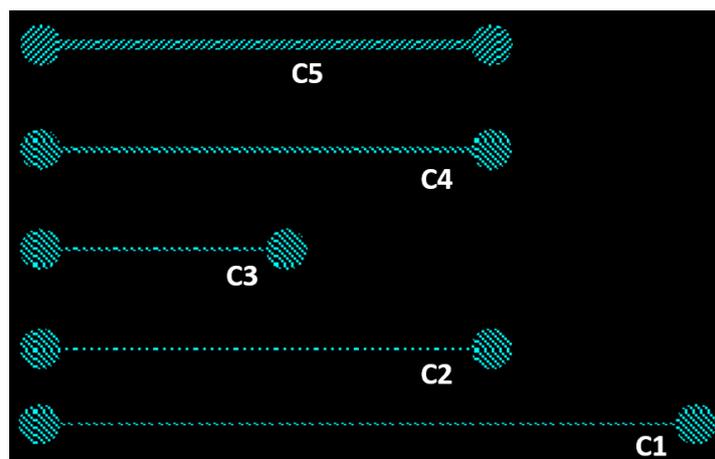


Figure III.12 : Masque des différents canaux microfluidiques utilisés pour valider expérimentalement le logiciel de conception python

Tableau III.1 : Géométrie des canaux microfluidiques moulés au-dessus d'un film polymère de 50 μm d'épaisseur selon les dessins présentés sur la Figure III.12.

| <i>Nom du circuit</i> | Largeur (μm) | Longueur (mm) | Résistance hydraulique théorique du canal (Pa.s.m^{-3}) | Résistance théorique du microsystème complet (Pa.s.m^{-3}) |
|-----------------------|---------------------------|---------------|--|---|
| <i>Circuit n°1</i> | 150 | 30 | $24,3 \cdot 10^{12}$ | $26,67 \cdot 10^{12}$ |
| <i>Circuit n°2</i> | 150 | 20 | $16,2 \cdot 10^{12}$ | $18,57 \cdot 10^{12}$ |
| <i>Circuit n°3</i> | 150 | 10 | $8,1 \cdot 10^{12}$ | $10,47 \cdot 10^{12}$ |
| <i>Circuit n°4</i> | 300 | 20 | $7,15 \cdot 10^{12}$ | $9,51 \cdot 10^{12}$ |
| <i>Circuit n°5</i> | 500 | 20 | $4,1 \cdot 10^{12}$ | $6,46 \cdot 10^{12}$ |

Tous les canaux microfluidiques ont été réalisés à partir d'un film sec (DF1050) de 50 μm d'épaisseur qui est au préalable laminé sur un substrat de silicium et photosensibilisé par lithographie laser afin de créer les motifs. Les paramètres de lithographie laser associés sont : modulation à 75% avec un filtre 10% et vitesse d'écriture à 30mm/s, le procédé est décrit par la suite. Puis le substrat est recouvert par du PDMS qui une fois réticulé et démoulé, est par la suite collé sur une lame de verre grâce à un plasma d'O₂. Le détail du procédé est décrit à la fin de la prochaine partie. On utilise des capillaires afin d'introduire le liquide dans le microsystème et de le collecter à sa sortie dans un Eppendorf. Le diamètre des capillaires d'entrée et de sortie est de 300 μm et la longueur en entrée est de 33 cm et en sortie 14 cm. La résistance globale du « microsystème complet » prend en compte l'effet



des capillaires dans les calculs. Le logiciel python peut alors nous donner les résistances microfluidiques totales et on peut remarquer l'influence non négligeable des capillaires dans la valeur de la résistance.

Le protocole pour valider expérimentalement le logiciel python à partir des circuits fabriqués est le suivant : on commence par remplir le système microfluidique par de l'eau distillée jusqu'à l'entrée du capillaire de sortie, puis on chronomètre le temps nécessaire au liquide pour sortir du capillaire (jusqu'à observer la première goutte d'eau), enfin on déconnecte le capillaire rempli d'eau et on connecte un capillaire de même taille vide. On répète cette opération quatre fois afin de moyennner les résultats obtenus. Ce procédé est réalisé pour différentes pressions d'entrée allant de 50 mbar à 100 mbar.

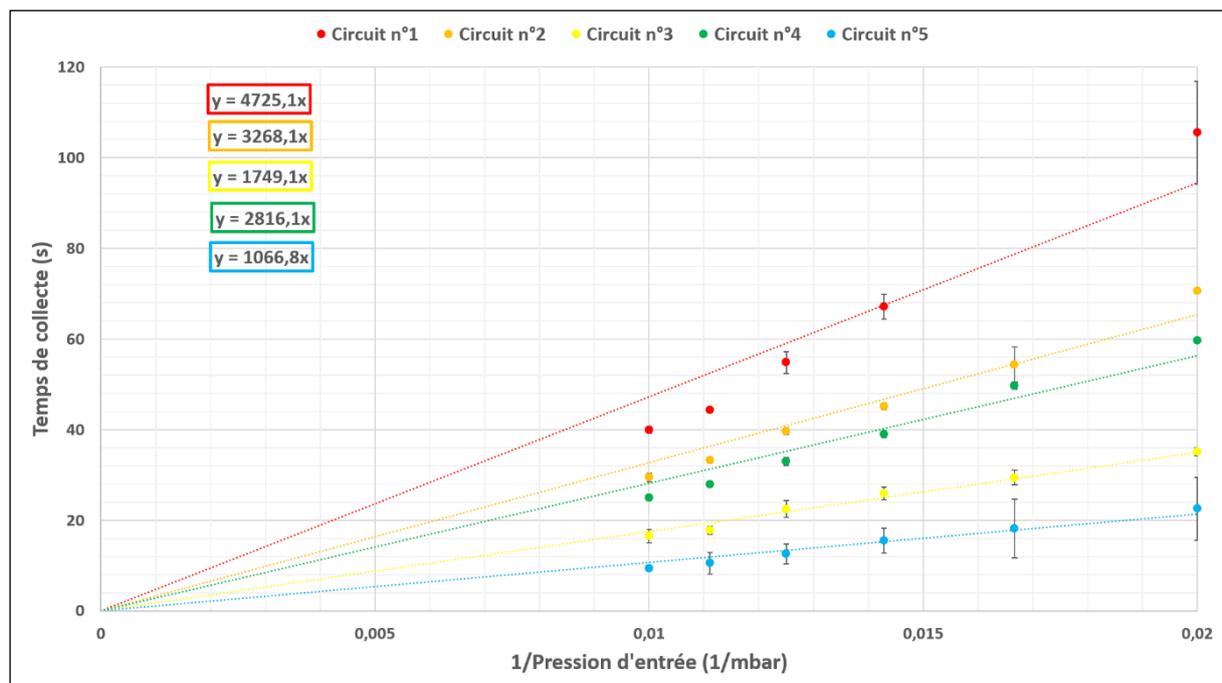


Figure III.13 : Temps de collecte mesuré pour chaque circuit microfluidique fabriqué, à une pression d'entrée donnée

La Figure III.13 présente les temps de collecte (du liquide dans le capillaire de sortie) mesurés en fonction de l'inverse de la pression d'entrée pour chaque circuit microfluidique. En effet, rappelons que la différence de pression entre l'entrée et la sortie est directement proportionnelle à la résistance hydraulique du microsystème et du débit imposé. Or le débit est la vitesse du fluide (V) qui passe à travers une section (S), donc on arrive à l'équation suivante :

$$\Delta P = R_{H,\text{système}} Q = R_{H,\text{système}} V * S \quad (\text{III.17})$$



Afin de relier l'équation (III.17) avec le temps de collecte mesuré, on utilise la conservation massique du débit. En effet, le débit est le même dans tout le réseau microfluidique, que ce soit dans les capillaires ou dans le canal en PDMS. Donc on peut calculer la vitesse du fluide dans le capillaire de sortie de diamètre 300 μm et de longueur 14 cm et ainsi relier le temps de collecte à la pression d'entrée. On a alors l'expression suivante :

$$t_{\text{collecte}} = \frac{R_{H, \text{ système}}}{\Delta P} L_{\text{cap}} S_{\text{cap}} \quad (\text{III.18})$$

ΔP est directement la valeur de la pression d'entrée car aucune contre-pression n'est utilisée en sortie. Les dimensions du capillaire de sortie sont connues et données par le fabricant. Ainsi, on peut extraire la valeur de la résistance hydraulique de l'ensemble du système à partir du coefficient directeur de la régression linéaire pour chaque circuit.

Tableau III.2 : Tableau reportant les valeurs expérimentales et théoriques de la résistance hydraulique des différents microsystèmes

| <i>Nom du circuit</i> | Résistance expérimentale du microsystème (Pa.s.m^{-3}) | Résistance théorique du microsystème (Pa.s.m^{-3}) pour $h = 50\mu\text{m}$ | Résistance théorique du microsystème (Pa.s.m^{-3}) pour $h = 40\mu\text{m}$ |
|-----------------------|---|--|--|
| <i>Circuit n°1</i> | 47,75 10^{12} | 26,67 10^{12} | 47,44 10^{12} |
| <i>Circuit n°2</i> | 33,02 10^{12} | 18,57 10^{12} | 32,41 10^{12} |
| <i>Circuit n°3</i> | 17,67 10^{12} | 10,47 10^{12} | 17,39 10^{12} |
| <i>Circuit n°4</i> | 28,46 10^{12} | 9,51 10^{12} | 16,01 10^{12} |
| <i>Circuit n°5</i> | 10,78 10^{12} | 6,46 10^{12} | 10,26 10^{12} |

Le Tableau II.2 rapporte les différentes valeurs des résistances hydrauliques expérimentales et théoriques. A la première observation, on peut remarquer qu'à hauteur et largeur fixées, plus la longueur du circuit microfluidique augmente (du circuit n°3 au circuit n°1), plus la résistance hydraulique augmente. De plus, lorsque la largeur du canal augmente (circuit n°2, 4 et 5), la résistance rencontrée par le fluide diminue. Ces deux observations vont dans le même sens que la formule théorique III.9.

Rappelons que l'épaisseur de la résine qui a servi à faire le moule de PDMS est de 50 μm . On peut voir que les valeurs calculées par le logiciel python sont très éloignées des valeurs expérimentales. Il est alors légitime de penser que la hauteur supposée des canaux microfluidiques ne soit pas de 50 μm mais inférieure. En effet, au niveau du fabricant, il est indiqué que l'écart-type de l'épaisseur du film sec est de plus ou moins 3% de l'épaisseur visée. De plus, la résine épaisse est un film sec (DF1050) qui est laminé sur le substrat de silicium, il est alors écrasé entre deux rouleaux. En outre, le moulage et le



collage du PDMS par plasma sur la lame de verre, peuvent aussi induire un biais dans l'épaisseur du canal. Tous ces biais cumulés peuvent entraîner une différence non négligeable entre la hauteur souhaitée et réelle. Il est possible de mesurer l'épaisseur des motifs des canaux sur le substrat de silicium grâce à un profilomètre. La hauteur est mesurée à l'aide d'une pointe qui se déplace sur le plan horizontal et mesure la hauteur par contact mécanique avec le substrat. Plusieurs mesures sont réalisées au niveau des réservoirs des canaux, c'est-à-dire la partie circulaire de la Figure III.12. La moyenne des résultats est de 45 μm de hauteur, ce qui est plus faible que l'épaisseur souhaitée. Malheureusement, il ne nous a pas été possible de mesurer l'épaisseur du canal directement dans le PDMS car cela requière une pointe spéciale, adaptée aux matériaux souples.

Lorsque dans le logiciel python, une hauteur de 40 μm est saisie, les valeurs des résistances microfluidiques sont plus proches des valeurs expérimentales à environ 0,65% - 1,85% d'écart pour les différents microsystèmes excepté le circuit n°4. En effet, la valeur expérimentale est quasiment deux fois plus importante qu'annoncée par le programme python. Il serait intéressant de mesurer à nouveau le temps de collecte pour ce circuit afin de vérifier la valeur de la résistance hydraulique.

On peut conclure que dans le cas le plus simple d'un réseau microfluidique composé d'un canal de section rectangulaire et de deux capillaires de section circulaire, le programme python permet bien de prédire les différents paramètres utiles (résistances microfluidiques, temps de collecte...) afin d'aider au dimensionnement. L'étude serait à compléter avec des circuits plus complexes à savoir par exemple un motif de canal en Y.

III. Conception du microsystème de tri cellulaire de CSCs

Comme évoqué précédemment, une première démonstration de cytomètre électromagnétique basé sur la diélectrophorèse UHF a été réalisée lors des travaux de thèse de Thomas Provent [1]. Basé sur la répulsion en nDEP, l'outil de tri cellulaire permet de séparer une population hétérogène cellulaire selon certains critères. En se plaçant à haute fréquence, on peut potentiellement discriminer les cellules présentant un contenu interne différent. En reprenant le principe des prototypes fabriqués par Thomas, nous avons poursuivi le développement du microsystème de tri en y apportant des améliorations au niveau fluidique, de façon à pouvoir collecter en sortie les cellules triées et pouvoir analyser leur phénotype. Ces modifications et le procédé de fabrication du cytomètre électromagnétique seront décrits dans cette partie.



III.1. Optimisation microfluidique du cytomètre électromagnétique

Dans cette partie, nous allons chercher à optimiser la forme géométrique des canaux microfluidiques du cytomètre électromagnétique. Nous nous concentrerons sur deux parties précises du dimensionnement : au niveau de la zone de focalisation des cellules à l'entrée du canal principal (jonction entre le canal d'arrivée des cellules et le canal du buffer) et au niveau de l'autre extrémité du canal principal et de l'embranchement des sorties du cytomètre (Figure III.3).

III.1.1. Développement d'un module de focalisation cellulaire à l'entrée du canal principal du cytomètre

Comme nous allons le voir dans le paragraphe III.3, il est nécessaire d'avoir un module de focalisation cellulaire à l'entrée de la zone de tri du cytomètre afin de maîtriser la position d'arrivée des cellules. En effet, pour réaliser un tri en limitant les risques d'artéfacts, les cellules doivent être exposées au même champ électrique afin d'engendrer une déviation de leur trajectoire reproductible et sélective en fonction de leurs caractéristiques diélectriques intracellulaires intrinsèques.

Il existe différentes méthodes pour réaliser une focalisation hydrodynamique de cellules. La première est une focalisation passive mettant en œuvre juste le canal d'entrée des cellules et une géométrie adaptée du reste des canaux microfluidiques permettant de focaliser les cellules à un endroit précis du canal principal. Cela est possible en mettant à profit l'effet d'une force centrifuge [9], [10] ou en créant des obstacles dans le canal microfluidique [11], [12]. Même si l'avantage de cette méthode est de n'avoir plus qu'une seule voie d'injection à gérer avec le contrôleur de flux, elle nécessite d'implémenter une longueur très conséquente de canal (de quelques centimètres juste pour l'entrée des cellules) afin d'obtenir une focalisation efficace. En effet, dans [10], la partie du canal microfluidique d'injection des cellules fait 13 cm de long pour une section de $100\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$. Le canal est enroulé sur lui-même afin de limiter la surface de la puce et permet une focalisation des particules selon le débit d'entrée. Cependant, une telle géométrie nécessite tout de même de la place pour être implémentée et va rendre plus complexe la fabrication de nos prototypes qui deviendraient trop grands.

Une deuxième méthode de focalisation de particules est le flux pincé ou « pinched flow » en anglais. Elle consiste à implémenter deux canaux microfluidiques en entrée de canal principal dont l'un permet d'injecter les cellules biologiques suspendues dans un fluide et un autre délivre le même fluide mais sans particule que l'on nomme généralement « buffer ». Le buffer est injecté à un débit généralement supérieur à celui de la suspension cellulaire. A la jonction des deux canaux, le flux transportant les cellules peut être repoussé et pincé dans une région étroite près de la paroi opposée au



flux du buffer. Ce type de focalisation particulière est très souvent utilisé [13]–[15] car la géométrie des canaux microfluidiques reste simple à réaliser et à mettre en œuvre. Son principal inconvénient est qu'il faut alors contrôler les deux pressions d'entrée et trouver le bon réglage afin d'obtenir une focalisation efficace. C'est la technique de pinched flow qui a été utilisée dans les différents prototypes du cytomètre électromagnétique qu'avait développés Thomas Provent (cf Figure III.2). Nous allons également reprendre ce principe à deux entrées mais en optimisant la géométrie de la jonction entre les voies d'injection de la suspension cellulaire et du buffer.

Dans le cas de la réunion de deux flux ayant la même direction, c'est-à-dire lorsque les canaux d'apports sont parallèles, mais se déplaçant à des vitesses différentes, il y a une zone de rencontre et de choc des deux écoulements. En pratique, il est difficile d'avoir les deux canaux d'entrée implémentés en parallèle sans introduire une zone de non-circulation du fluide.

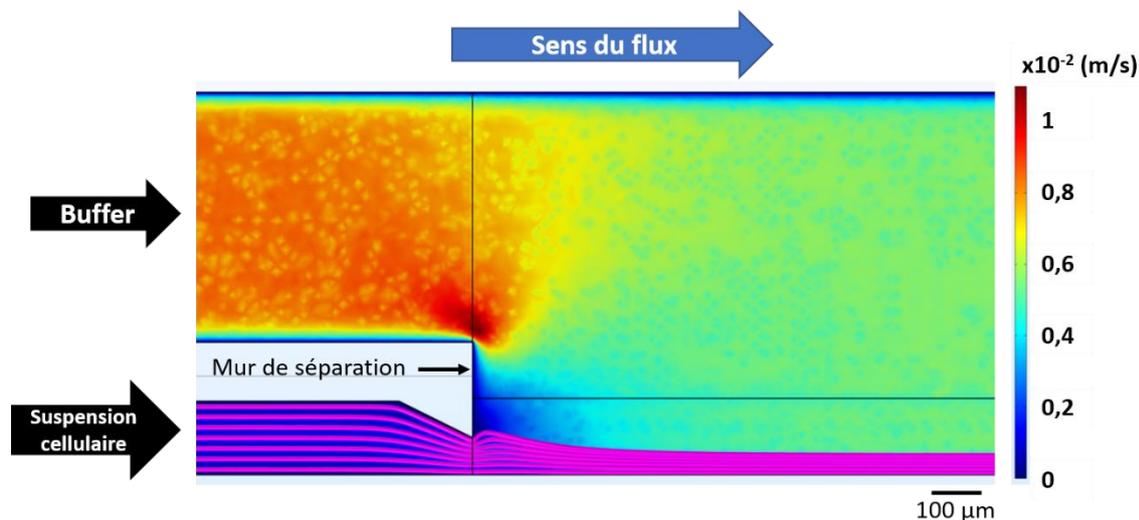


Figure III.14 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans la zone d'injection cellulaire du prototype de cytomètre électromagnétique développé par Thomas Provent. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules.

La Figure III.14 est une coupe dans le plan XY du profil de vitesse du fluide s'écoulant dans les canaux microfluidiques, vitesses calculées par simulation 3D avec COMSOL Multiphysics sur la base de la géométrie de la zone d'injection de la Figure III.2. La coupe est faite à l'altitude $z = 25\mu\text{m}$, soit à la moitié de la hauteur du canal principal. Seule la zone d'injection a été modélisée en 3D avec les entrées du buffer et de la suspension cellulaire et le canal principal, car ce type de calculs 3D requière un maillage précis et des temps de calcul très conséquents entraînant des problèmes de mémoire sur les simulateurs que nous avons à disposition. Il nous a donc fallu faire un compromis entre la précision des



calculs, leur faisabilité et un temps de calcul raisonnable. La pression à l'entrée des cellules est de 100 Pa et celle à l'entrée du buffer est de 150 Pa afin d'observer une focalisation cellulaire. Les couleurs indiquent le gradient de vitesse de l'écoulement du fluide dans le réseau de canaux et les lignes roses correspondent à la trajectoire des cellules selon la position des cellules dans la largeur du canal d'injection. On peut voir que le canal du buffer joue bien son rôle en focalisant les cellules du côté de la paroi du canal principal du microsysteme. Cependant, on remarque qu'au niveau de la rencontre des deux fluides, la vitesse du fluide chute brutalement voire devient quasi nulle. Le mur de séparation des deux canaux crée une zone de non-circulation du fluide et les cellules semblent alors aspirées vers la partie supérieure du canal avant d'être rabattues sur la paroi car l'action du buffer se fait plus en aval. Cette géométrie provoque aussi des problèmes de remplissage du cytomètre en facilitant la génération de bulles d'air dans la zone de focalisation cellulaire.

C'est pourquoi nous avons décidé de d'optimiser cette géométrie en privilégiant une jonction où la branche du buffer fusionne progressivement avec à la branche d'injection des cellules. Plusieurs géométries ont été étudiées. Pour chacune, le type de bifurcation choisi est celui où la somme des surfaces des sections des deux canaux est égale à la surface du canal principal qui en résulte. Les différents embranchements se caractérisent par un angle d'inclinaison α différent. Nous avons considéré pour cet angle les valeurs suivantes 15° , 30° , 45° , 60° et 90° [7].

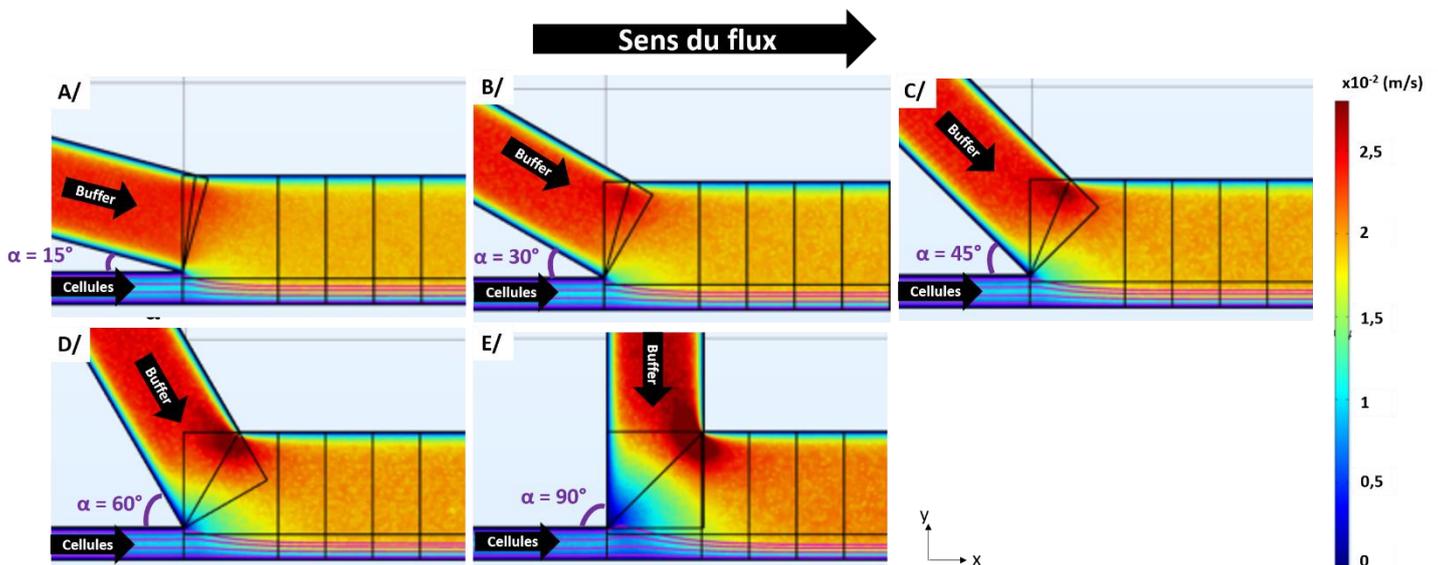


Figure III.15 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans la zone d'injection cellulaire en fonction de l'angle d'inclinaison. (A) $\alpha = 15^\circ$; (B) $\alpha = 30^\circ$; (C) $\alpha = 45^\circ$; (D) $\alpha = 60^\circ$; (E) $\alpha = 90^\circ$. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules.



L'écoulement du fluide en fonction de l'angle d'inclinaison de l'embranchement a été simulé numériquement à l'aide de COMSOL Multiphysics (Figure III.15). La coupe est faite à l'altitude $z = 50\mu\text{m}$, soit à la moitié de la hauteur du canal principal. Nous avons choisi d'incliner le canal du buffer afin de conserver la trajectoire des cellules dans une direction identique à celle du canal principal. Les mêmes pressions d'entrée pour le buffer et la suspension de cellules sont utilisées dans chaque cas, à savoir 150 Pa et 100 Pa respectivement. Le gradient de couleurs indique la vitesse du flux. On constate que pour un angle de 90° , il y a de nouveau une zone de non-circulation/ralentissement du fluide au niveau de l'intersection. En revanche plus l'angle α diminue, plus cette zone tend à disparaître. De plus, il semblerait que quel que soit l'angle d'inclinaison, la largeur de la zone de focalisation des cellules dans le canal principal ne change pas. Les paramètres à prendre en compte sont la bonne circulation des fluides à leur rencontre afin de faciliter le remplissage du cytomètre DEP sans création de bulles d'air et sans perturber la reproductibilité d'injection des cellules dans la zone de tri, ainsi que la distance pour que s'établisse un écoulement stable dans le canal principal. Il semble donc judicieux de privilégier un angle inférieur à minima à 60° .



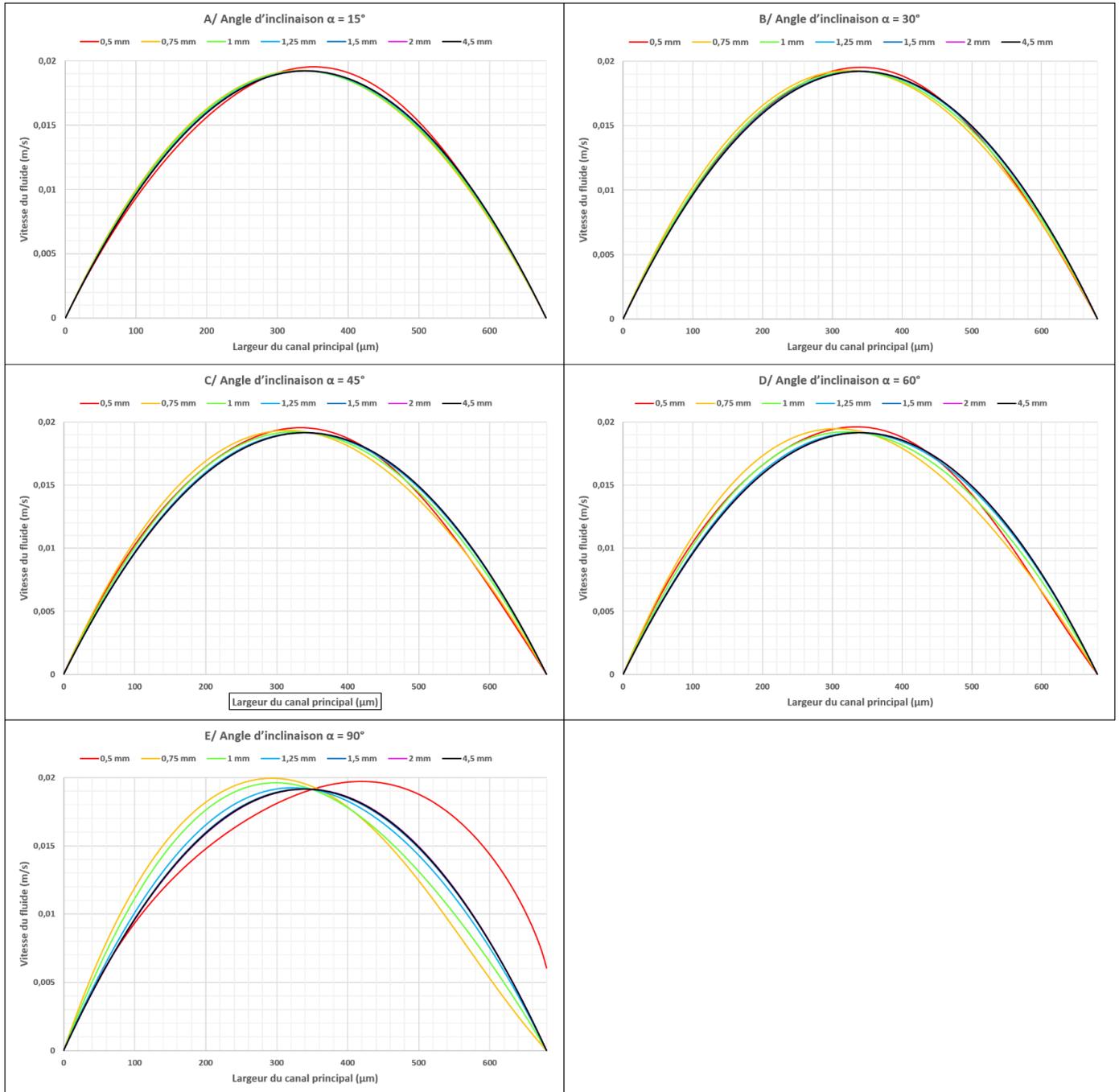


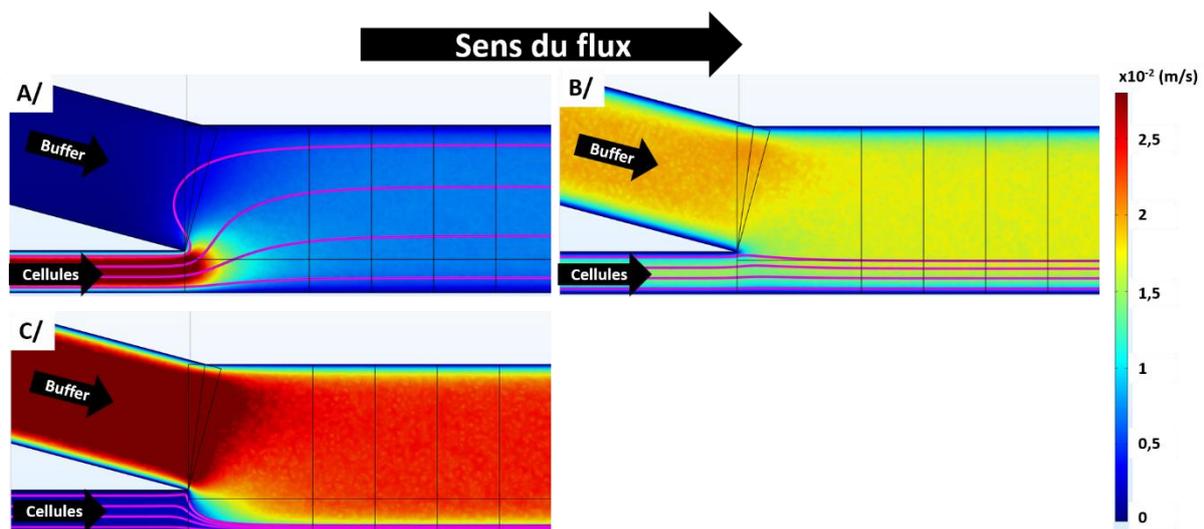
Figure III.16 : Profil de vitesse dans la largeur du canal principal calculé à mi-hauteur et à différentes distances selon x de l'embranchement des deux canaux d'entrée pour chaque valeur d'angle d'inclinaison. (A) $\alpha = 15^\circ$; (B) $\alpha = 30^\circ$; (C) $\alpha = 45^\circ$; (D) $\alpha = 60^\circ$; (E) $\alpha = 90^\circ$.

La distance minimale pour que s'établisse un écoulement stabilisé du fluide dans le canal principal après l'intersection peut être déterminée à partir des profils de vitesse présentés dans la Figure III.16. Les profils sont prédits à partir de la simulation 2D des canaux de la Figure III.15. Bien qu'une modélisation 2D de réseaux microfluidiques ne permette pas de prendre en compte le profil parabolique de la vitesse dans la hauteur du canal, cela limite les temps de calcul et nous garantit une meilleure précision corrélée à la possibilité d'utiliser un maillage plus fin.



Les profils de vitesse sont calculés à une distance respectivement de 500 μ m, 750 μ m, 1mm, 1,25mm, 1,5mm, 2mm et 4,5mm de la jonction entre les deux canaux d'entrée. La dernière distance (4,5mm) est choisie comme référence afin de s'assurer que l'écoulement se soit déjà stabilisé en amont. Si une des paraboles est décalée par rapport à celle de 4,5mm, alors l'écoulement n'est pas encore stable. Pour un angle d'inclinaison de 15°, le flux est établi à minima dès 750 μ m après l'embranchement. Pour un angle de 30°, 45°, 60° et 90°, le flux est stabilisé respectivement dès 1mm, 1,25mm, 1,25mm et 1,5mm après l'embranchement.

La distance de stabilisation du flux dans le canal principal la plus courte est obtenu pour un angle de 15° ; c'est donc celui-ci qui sera choisi pour réaliser la jonction de focalisation des cellules de notre cytomètre.



La Figure III.17 présente une coupe dans le plan XY à mi-hauteur du canal permettant d'observer la distribution de vitesse du fluide s'écoulant dans la zone de focalisation pour un angle d'inclinaison de 15° lorsque la pression à l'entrée du buffer varie. Grâce au tracé des trajectoires des cellules, on peut observer l'efficacité de la focalisation effectuée par le buffer. Lorsque $P_{\text{buffer}} < P_{\text{cellule}}$ (Figure III.17A), les cellules se situent sur toute la largeur du canal principal et la pression exercée par le buffer n'est pas assez forte pour empêcher une défocalisation des cellules. Lorsque $P_{\text{buffer}} \approx P_{\text{cellule}}$ (Figure III.17B), le fluide provenant du buffer permet de maintenir les cellules dans une zone à peu près aussi large que leur canal d'injection. Lorsque $P_{\text{buffer}} > P_{\text{cellule}}$ (Figure III.17C), le buffer joue son rôle de focaliseur en venant plaquer les cellules contre la paroi du canal principal. Ainsi, avec un équilibre



des pressions bien trouvé, il semble même possible de pincer l'injection de cellules de telle sorte qu'elles arrivent une par une au niveau des électrodes de tri.

Cependant, nous devrions faire en sorte que les cellules n'arrivent pas contre la paroi extérieure du canal microfluidique ou que le buffer les plaque contre cette paroi car la vitesse d'écoulement y est très faible et le champ électrique induit par les électrodes n'est pas suffisamment homogène. Pour ce faire, une approche consiste à réaliser une double focalisation grâce à un second canal de buffer venant pincer les cellules mais avec un offset Y' (Figure III.18A). Néanmoins, cette approche nous ramènerait à implémenter trois entrées indépendantes et donc pourrait entraîner des difficultés supplémentaires pour trouver les bons équilibres entre les 3 pressions d'injection afin de contrôler et d'ajuster en temps réel l'écoulement fluide souhaitable.

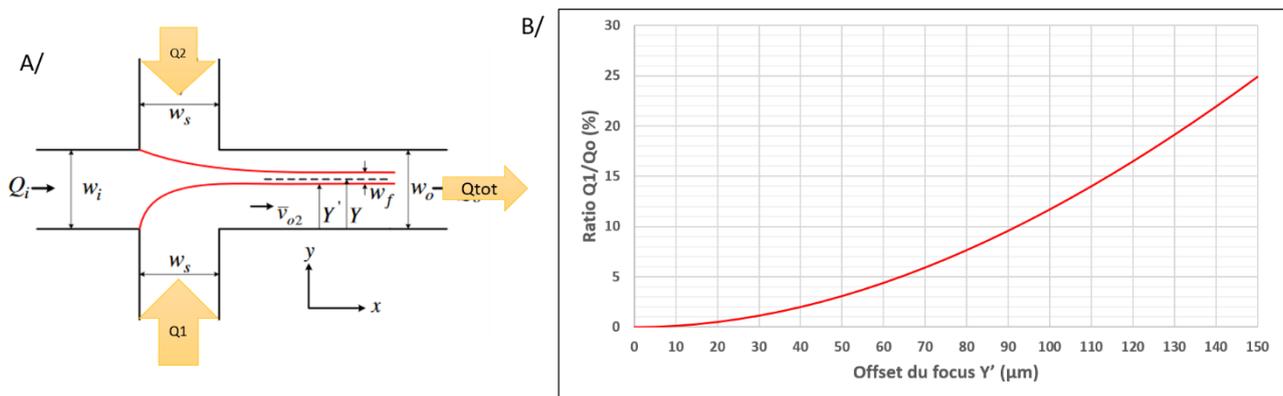


Figure III.18 : (A) Vue du dessus d'une jonction de flow focusing asymétrique, avec Q_i Q_1 Q_2 respectivement les débits des cellules, du buffer prélevé, du buffer après prélèvement [16]. (B) Graphique du ratio de débit prélevé en fonction de l'offset du focus souhaité.

Aoki *et al* [12] ont utilisé un système auto-focalisation original qui prélève une partie du liquide du canal principal puis le réinjecte en aval pour focaliser le flux (Figure III.19A). Sur un principe similaire, il nous est possible de prélever une portion du liquide venant du canal du buffer pour le réinjecter dans le canal des cellules en amont de la jonction de focalisation du canal principal. Cela permettrait de décoller les cellules de la paroi extérieure tout en ayant seulement deux pressions d'entrée à gérer. Pour choisir la largeur appropriée pour le canal latéral qui viendra prélever une portion de fluide buffer, il faut considérer le lien entre l'offset de la focalisation désirée et le pourcentage de fluide prélevé [16] :

$$\frac{Y'}{w_o} = \frac{Q_1}{\gamma'(Q_i + Q_o)} \quad \text{avec} \quad \gamma' = 3 \frac{Y'}{w_o} - 2 \left(\frac{Y'}{w_o} \right)^2 \quad (\text{III.21})$$



On obtient alors :

$$\frac{Q_1}{Q_0} = \left(\frac{Q_i}{Q_0} + 1\right) * \left[3 \left(\frac{Y'}{w_0}\right)^2 - 2 \left(\frac{Y'}{w_0}\right)^3\right] \quad (\text{III.22})$$

Avec Y' l'offset de la focalisation, w_0 la largeur du canal principal (680 μm), Q_1 le débit prélevé du buffer, Q_0 le débit total du buffer ($Q_0 = Q_1 + Q_2$), Q_i le débit des cellules.

Selon la position de l'offset de focalisation dans la largeur du canal principal, il est possible de déterminer le pourcentage du débit du buffer à détourner et l'injecter dans le canal d'injection des cellules. Dans notre cas, il serait judicieux de choisir un offset de 80 μm pour être certain que toutes les cellules biologiques « voient » un champ électrique homogène bien établi et identique le long des électrodes. Pour cela, il est nécessaire de prélever 8% du fluide provenant du buffer et le réinjecter pour pousser les cellules de la paroi latérale droite du canal (Figure III.18B).

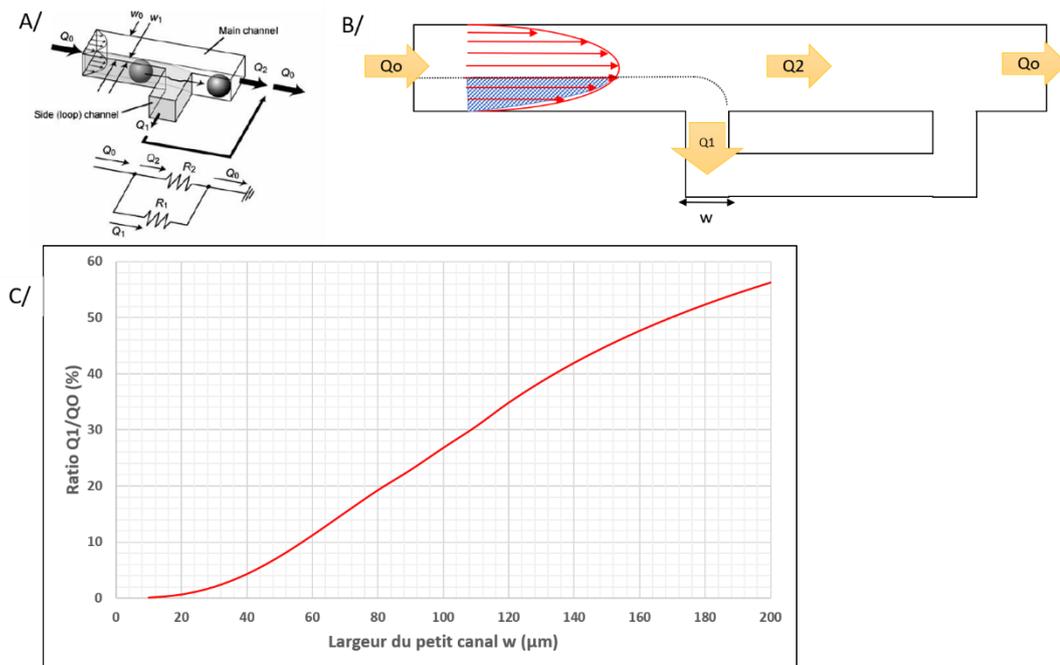


Figure III.19 : Module de prélèvement de débit du canal du buffer. (A) Vue 3D du point de branchement composé du canal buffer et d'un canal en boucle fermée avec le schéma équivalent électrique. La région entrant dans le canal latéral est colorée en gris [12]. (B) Vue du dessus, avec Q_0 , Q_1 et Q_2 respectivement débit du buffer, du canal latéral et après le prélèvement et w la largeur du canal de déviation. (C) Ratio de débit prélevé en fonction de la largeur du canal w .



Maintenant que nous connaissons le débit à prélever, nous pouvons le relier à la largeur du canal de déviation en prenant en compte que les résistances microfluidiques sont implémentées en parallèle (Figure III.19A) :

$$\frac{Q_1}{Q_0} = \frac{Q_1}{Q_1 + Q_2} = \frac{R_2}{R_1 + R_2} \quad (\text{III.23})$$

Avec R_1 et R_2 les résistances microfluidiques respectivement du canal de déviation et du canal du buffer.

Les dimensions des sections des canaux utilisés seront indiquées par la suite dans le Tableau III.3. On peut en déduire du graphique de la Figure III.19C que pour prélever 8% du fluide du buffer, il faudrait une largeur de canal latéral de 50 μm . La géométrie du module de focalisation avec le canal latéral pour la réinjection du buffer est présentée Figure III.20A. Les simulations COMSOL montrent qu'on peut effectivement s'attendre à une certaine efficacité du module (Figure III.20B).

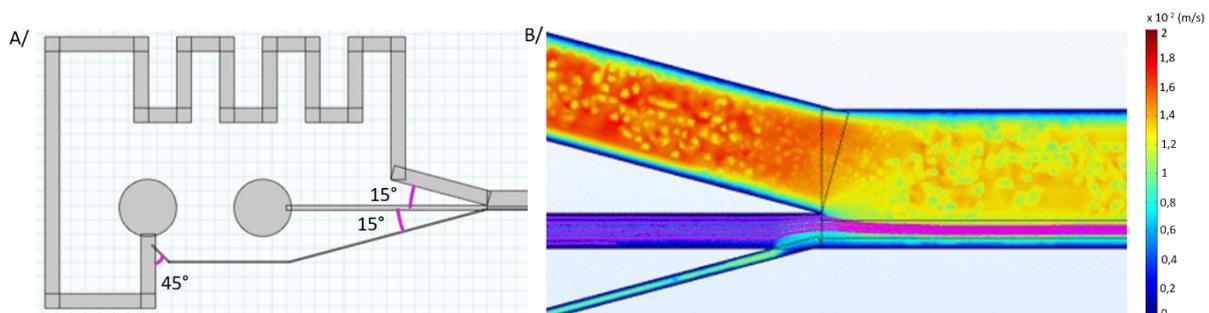


Figure III.20 : Géométrie du module de focalisation (A) Géométrie ; (B) Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans la zone de focalisation cellulaire. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules.

III.1.2. Optimisation du module de collecte des cellules triées en sortie du canal principal du cytomètre

La deuxième optimisation que nous avons menée concerne la géométrie des différents canaux que vont prendre les cellules une fois triées pour être collectées en sortie du cytomètre. En effet, il est important de pouvoir récupérer les cellules séparées en sous-populations à la fin de chaque expérience afin de pouvoir évaluer l'efficacité du tri en fonction des différents réglages possibles du cytomètre (fréquence et amplitude du signal DEP, vitesse des cellules...). Dans le prototype initial de Thomas Provent (Figure III.2), les sorties sont reliées entre elles, se limitant à une démonstration de concept qualitative du principe de fonctionnement du module de tri (observation sous le microscope et comptage



par reconnaissance de formes des cellules déviées jusqu'à une sortie donnée). Par conséquent, cette étape de collecte effective des cellules biologiques triées n'avait pas pu être effectuée jusqu'à présent. Dans cette partie, nous allons nous attacher à proposer une géométrie plus simple de ce module de collecte, capable de récupérer les cellules séparées par le cytomètre en deux sous-populations dans des conteneurs (Eppendorfs) distincts.

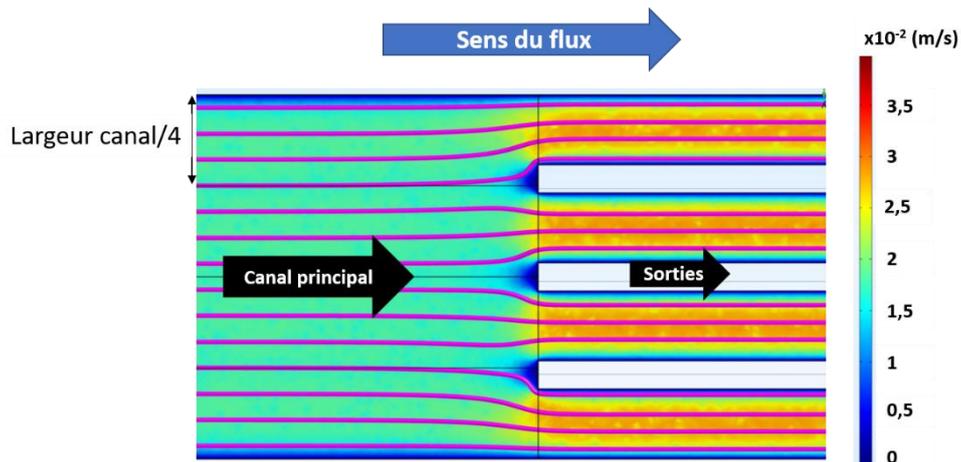


Figure III.21 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide au niveau des sorties du cytomètre électromagnétique conçu par Thomas Provent. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules.

Le cytomètre électromagnétique développé au cours des travaux de thèse de Thomas Provent possédait quatre sorties qui étaient reliées entre elles au bout du microsysteme afin de n'avoir à gérer qu'une seule contre-pression de sortie à l'aide d'un contrôleur de flux. La Figure III.21 présente une coupe dans le plan XY permettant de visualiser le comportement du fluide lorsqu'il arrive au niveau de l'embranchement des canaux de sortie. De même que pour la zone de focalisation, on peut voir la présence de zones de non-circulation fluide (en bleu) au moment de la séparation du flux, source de blocage des cellules si elles parviennent à ce niveau-là qui pourrait provoquer un bouchon.



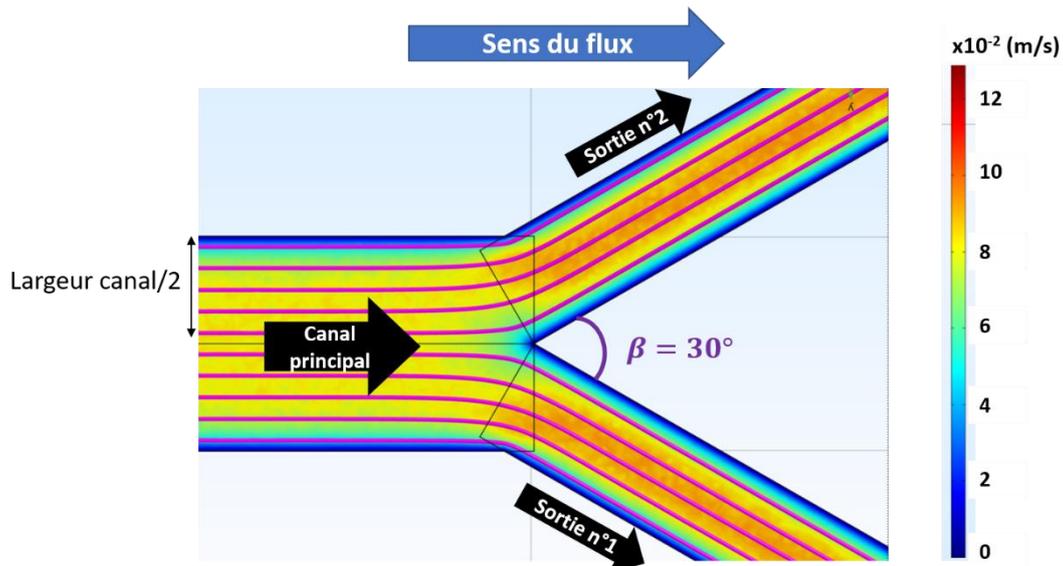


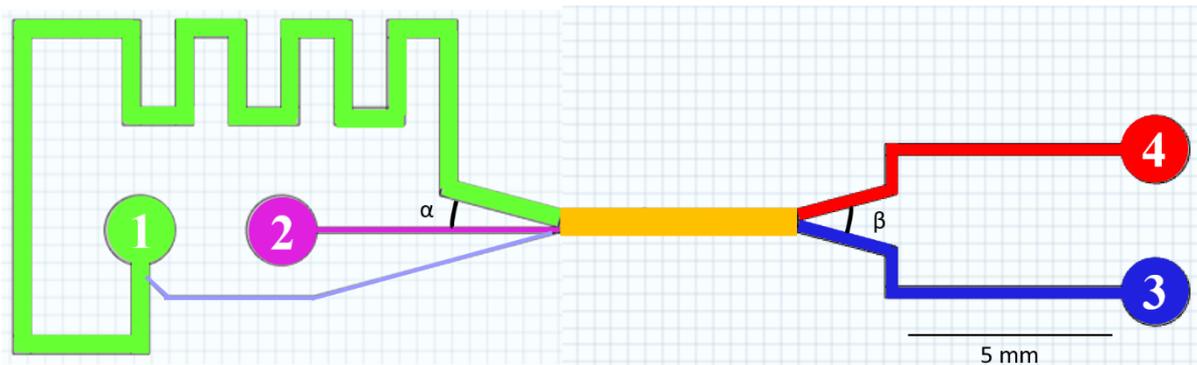
Figure III.22 : Coupe XY à mi-hauteur de canal de la simulation calculant la vitesse d'écoulement fluide dans le module de sortie du canal principal. L'échelle des couleurs correspond à la vitesse d'écoulement du fluide (m/s) et les lignes roses représentent la trajectoire des cellules.

La Figure III.22 représente une coupe dans le plan XY permettant de visualiser le comportement de l'écoulement fluide au niveau du module de sortie du cytomètre : une jonction symétrique en Y à 3 voies. Pour ce type de jonction, en général dans la littérature l'angle de séparation β prend des valeurs de 30° , 60° ou 90° [6]. Si l'on se réfère aux considérations faites lors du design du module de focalisation des cellules, nous choisissons un angle de séparation minimal de 30° . De plus, nous avons choisi de dimensionner la largeur des canaux de sortie comme la moitié de celle du canal principal. Comme on peut le voir sur la Figure III.22, les lignes des trajectoires des cellules respectent bien une équipartition du fluide entre les deux sorties, ce qui devrait nous permettre de parfaitement conserver la séparation des cellules qui aura été faite en amont. Donc, en optant pour ce design, on peut s'attendre à ce que toutes les cellules localisées dans la moitié supérieure du canal soient récoltées dans la sortie n°2, alors que celles localisées dans la moitié inférieure sortiront du cytomètre via la sortie n°1. A présent, on peut dessiner des électrodes de telle sorte que les cellules d'intérêt soient séparées des autres cellules de la population originelle pour être déviées dans la partie supérieure du canal principal et par la suite collectées à l'extrémité de la première sortie.



III.1.3. Géométrie finale du réseau fluidique du cytomètre électromagnétique

En fonction des optimisations menées et des implémentations choisies pour les zones de focalisation, de tri et de collectes des sous populations triées, la géométrie finale du réseau fluidique du cytomètre électromagnétique est présentée Figure III.23.



Légende :

- Canal buffer
- Canal latéral
- Canal cellules
- Canal principal
- Sortie n°1 (cellules non déviées)
- Sortie n°2 (cellules déviées)

Figure III.23 : Prototype du réseau microfluidique du cytomètre électromagnétique. Chaque couleur indique la fonction du canal. 1. Réservoir pour connexion du capillaire amenant le buffer ; 2. Réservoir pour de connexion du capillaire amenant la suspension cellulaire ; 3. Réservoir pour de connexion du capillaire pour la récupération des cellules non déviées ; 4. Réservoir pour de connexion du capillaire pour la récupération des cellules déviées.

Les angles d'inclinaison α de la zone de focalisation et de séparation β des sorties sont respectivement de 15° et de 30° . Les voies d'entrée sont le buffer (canal bleu) et la suspension cellulaire (canal violet). Les cellules sont ensuite focalisées en direction de la paroi du canal principal (en jaune) puis triées par déviation DEP à l'autre extrémité de la largeur du canal et récupérées dans les sorties n°1 et 2. Les dimensions de chaque section de canal sont reportées dans le Tableau III.3. Les résistances microfluidiques ont été calculées avec le logiciel python avec la hauteur théorique de $100\mu\text{m}$. Les vitesses d'écoulement visées doivent prendre en compte le fait de voir les cellules être déviées en temps réel. Sachant que la caméra Axiocam 105 color Zeiss prend 15 images par secondes et que notre champ de vision pour un grandissement donné par le microscope nous permet d'observer au maximum environ 1,39 mm de distance dans la direction d'écoulement du flux, la vitesse maximale des cellules ne doit pas dépasser les 21mm/s. Afin d'être sûr de pouvoir les observer, nous resterons dans des gammes de



vitesses moyennes comprises entre 5mm/s et 8mm/s. Le logiciel python nous permet d'estimer les valeurs de pression en entrée de chaque voie : environ 13 mbar (entrée des cellules) et 14 mbar (entrée buffer) pour une vitesse moyenne de 5 mm/s dans le canal principal ; environ 20,8 mbar et 22,4 mbar pour une vitesse moyenne de 8 mm/s. Le temps de collecte des cellules biologiques dans les sorties est de l'ordre de la minute et dépend fortement de la longueur des capillaires utilisés (dans le logiciel, nous avons considéré une valeur de 250 μm de diamètre interne pour une longueur de 30 cm). Le logiciel nous donne les pressions à appliquer pour avoir des conditions expérimentales qui s'en rapprochent sans tâtonner dans toutes les directions.

Tableau III.3 : Dimensions des canaux du cytomètre électromagnétique

| | Canal buffer | Canal latéral | Canal cellules | Canal principal | Canaux de sortie |
|-----------------------------|--|---|--|--|--|
| <i>Largeur</i> | 510 μm | 50 μm | 170 μm | 680 μm | 340 μm |
| <i>Hauteur</i> | 100 μm | 100 μm | 100 μm | 100 μm | 100 μm |
| <i>Longueur</i> | 50,3 mm | 12 mm | 6,8 mm | 5,5 mm | 10,8 mm |
| <i>Résistance théorique</i> | 1,35 10^{12} Pa.s.m ⁻³ | 16,82 10^{12} Pa.s.m ⁻³ | 0,76 10^{12} Pa.s.m ⁻³ | 0,11 10^{12} Pa.s.m ⁻³ | 0,47 10^{12} Pa.s.m ⁻³ |

La largeur du canal d'injection des cellules est de 170 μm pour éviter le blocage de l'écoulement fluide si des agglomérats de cellules venaient à se former en amont dans l'Eppendorf. Le canal n'est pas trop large de façon à avoir un module de focalisation efficace. Le canal principal est quant à lui quatre fois plus large afin d'observer géométriquement une séparation importante des cellules. De plus, comme décrit précédemment avec le type de bifurcation choisi, la somme des surfaces des sections des canaux de la suspension cellulaire et du buffer est égale à la surface du canal principal. La largeur des canaux de sortie est la moitié de celle du canal principal. Le canal du buffer et les sorties sont particulièrement longs afin que les résistances hydrauliques de ces portions, accumulées avec les autres résistances du cytomètre soient suffisamment importantes pour que les pressions d'entrée soient situées dans les gammes stables du contrôleur de flux.



III.2. Choix de la géométrie des électrodes de déviation

Le choix de la géométrie des électrodes utilisées pour la déviation des cellules sera abordé dans cette partie. Le but est de dévier la sous-population des cellules souches cancéreuses de l'ensemble de la suspension cellulaire, par l'exploitation des signatures électromagnétiques précédemment obtenues (cf Chapitre II). Il a été décidé de partir du modèle développé par Thomas Provent à savoir des électrodes parallèles formant un angle avec le canal.

Comme nous l'avons décrit, le cytomètre électromagnétique va fonctionner majoritairement dans le régime nDEP, c'est-à-dire en répulsion. La cellule biologique est soit fortement repoussée et dirigée dans la sortie n°2, soit faiblement repoussée, et traverse la zone au-dessus des électrodes pour être collectée dans la sortie n°1. Les prototypes que nous avons conçus se basent sur une ligne coplanaire RF qui amène le signal DEP jusque dans le canal principal et forme un angle θ avec celui-ci (Figure III.24A). Pendant le tri cellulaire, la cellule biologique aux abords des électrodes va être soumise principalement à deux forces qui sont en compétition : la force diélectrophorétique et la force de traînée. Dans le canal microfluidique, le flux cellulaire est continu et la cellule va donc suivre la trajectoire du flux de fluide. Lorsque la cellule arrive près des électrodes, elle entre sous l'influence de deux forces en compétition : la force répulsive DEP et la force de traînée induite par le changement de vitesse de la cellule U_p liée à la vitesse U_f du fluide s'écoulant dans le micro-canal. En effet, l'effet répulsif du champ électrique induit une modification de la vitesse de la cellule alors que la vitesse du milieu de suspension environnant dans lequel elle est immergée, reste la même. La force de traînée existera jusqu'à ce que cette différence de vitesse disparaisse. L'expression de la force de traînée est la suivante [9] :

$$\vec{F}_D = 6\pi\mu r^2(\vec{U}_f - \vec{U}_p) \quad (\text{III.19})$$

Avec μ la viscosité dynamique du fluide, r le rayon de la cellule et U_p la vitesse de la cellule.



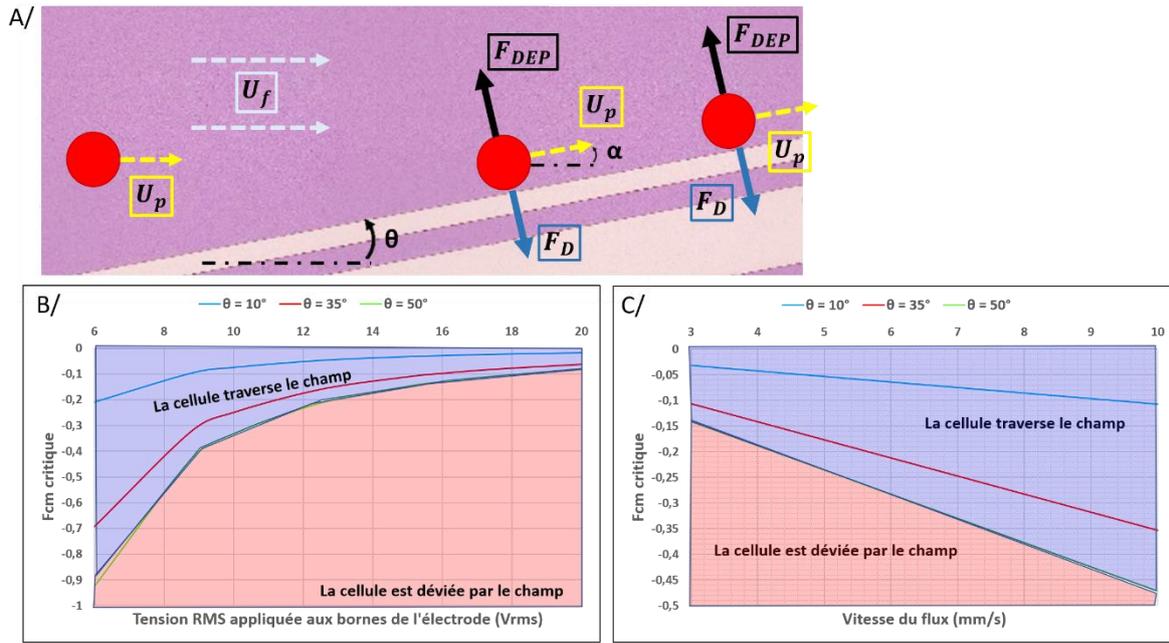


Figure III.24 : Influence de l'angle θ formé par les électrodes et la paroi du canal principale. (A) Description géométrique des paramètres [1] ; (B) Impact de la tension appliquée aux électrodes sur le f_{cm} critique pour différents angles θ à une vitesse de flux fixée de 3,6 mm/s ; (C) Impact de la vitesse fluïdique sur le f_{cm} critique pour différents angles θ à une tension fixée de 14 V_{RMS} . Un diamètre moyen de 12 μm pour la cellule a été considéré pour les deux graphiques.

Thomas Provent a démontré lors de sa thèse que lorsque la cellule est déviée par les électrodes, elle suit un mouvement rectiligne uniforme. En effet, cela réside dans le fait qu'il s'établit un équilibre entre les forces DEP et de trainée. La modification du vecteur vitesse de la cellule initiée par la force DEP entraîne une déviation de sa trajectoire d'un angle α par rapport à la direction du fluide (Fig III.24A). Les projections de l'égalité entre les forces sur l'axe x et l'axe donnent les équations suivantes:

$$\begin{cases} -2\pi\epsilon_m * Re[f_{cm}] * r^3 * \nabla|E_{RMS}^2| * \sin(\theta) = 6\pi\mu r * (U_f - U_p \cos \alpha) \\ 2\pi\epsilon_m * Re[f_{cm}] * r^3 * \nabla|E_{RMS}^2| * \cos(\theta) = 6\pi\mu r * U_p \sin \alpha \end{cases} \quad (III.20)$$

où α est l'angle de déviation de la trajectoire de la cellule. Le système d'équation résultant (III.21) permet de déterminer la vitesse d'une cellule présentant un rayon r donné et un facteur CM :

$$\begin{cases} U_p \cos \alpha = U_f + \frac{\epsilon_m * Re[f_{cm}] * r^2 * \nabla|E_{RMS}^2| * \sin(\theta)}{3\mu} \\ U_p \sin \alpha = - \frac{\epsilon_m * Re[f_{cm}] * r^2 * \nabla|E_{RMS}^2| * \cos(\theta)}{3\mu} \end{cases} \quad (III.21)$$

Dans notre cas, la cellule sera efficacement déviée pour un angle de déviation minimum $\alpha_{min} = \theta$, qui assurera la répulsion en continue de la cellule le long des électrodes pendant que le fluide l'entraîne dans le microcanal. Ainsi, en divisant les deux équations l'une par l'autre, nous pouvons



calculer un facteur CM « critique » qui représente la valeur minimale $\text{Re}[f_{cm}]$ que doit posséder une cellule biologique capable de suivre la pente des électrodes et d'être suffisamment déviée :

$$f_{cm}^c = -\frac{3\mu U_f \sin(\theta)}{r^2 \varepsilon_m \nabla |E^2|} \quad (\text{III.20})$$

Le f_{cm} critique ne dépend pas de la fréquence du signal appliqué mais de la géométrie des électrodes, de la vitesse du flux et de l'intensité du gradient de champ. Lorsque la valeur absolue du f_{cm} d'une cellule biologique est supérieure à la valeur absolue du facteur CM critique, cette dernière est déviée (zone verte de la Figure III.24), sinon elle traverse les électrodes. Dans la Figure III.24, nous avons pris l'exemple de tracer ces zones pour un angle $\theta = 50^\circ$. D'après la formule (III.20), il y a plusieurs paramètres à prendre en compte pour la déviation des cellules. En effet, plus l'angle θ est important, plus la valeur absolue du facteur f_{cm}^c est élevée et donc plus il devient difficile de suivre la pente des électrodes. De plus, le facteur critique dépend également du gradient de champ, qui expérimentalement peut être ajusté en modifiant la tension aux bornes des électrodes (Figure III.24B). Notons que le lien entre la tension appliquée et le gradient du champ a été déterminé à partir des maximums de gradient de champs simulés sous COMSOL pour un gap inter-électrodes de $30 \mu\text{m}$, une épaisseur de 600 nm et à une hauteur de $15 \mu\text{m}$ dans le canal microfluidique :

$$\nabla E^2 = V^2 \cdot 1 \cdot 10^{13} \text{ m}^{-1} \quad (\text{III.21})$$

Plus la tension augmente, plus le f_{cm}^c diminue en valeur absolue et il devient plus facile aux cellules de suivre la pente car c'est la force DEP qui est la plus importante comparée à la force fluidique. Au contraire, lorsque la vitesse du fluide augmente pour une tension donnée (Figure III.24C), le facteur de Clausius-Mossotti critique augmente en valeur absolue car la force fluidique devient supérieure à la force DEP et les cellules peuvent plus facilement traverser les électrodes.

Dans le choix de la valeur de l'angle de la pente, il faut prendre en compte le fait qu'en nDEP, le facteur de Clausius-Mossotti est plus faible dans le régime UHF qu'en basse fréquence (cf Chapitre I Figure I.22). Or, pour nous laisser une marge de manœuvre avec les paramètres que nous pouvons contrôler, c'est-à-dire l'intensité du champ électrique et la vitesse du flux, il serait judicieux de choisir un angle θ faible égal à 10° . Ainsi, avec un angle plus faible, il nous est possible d'augmenter la vitesse de tri des cellules sans pour autant être limité par l'intensité maximale de champ délivrée par le générateur RF.



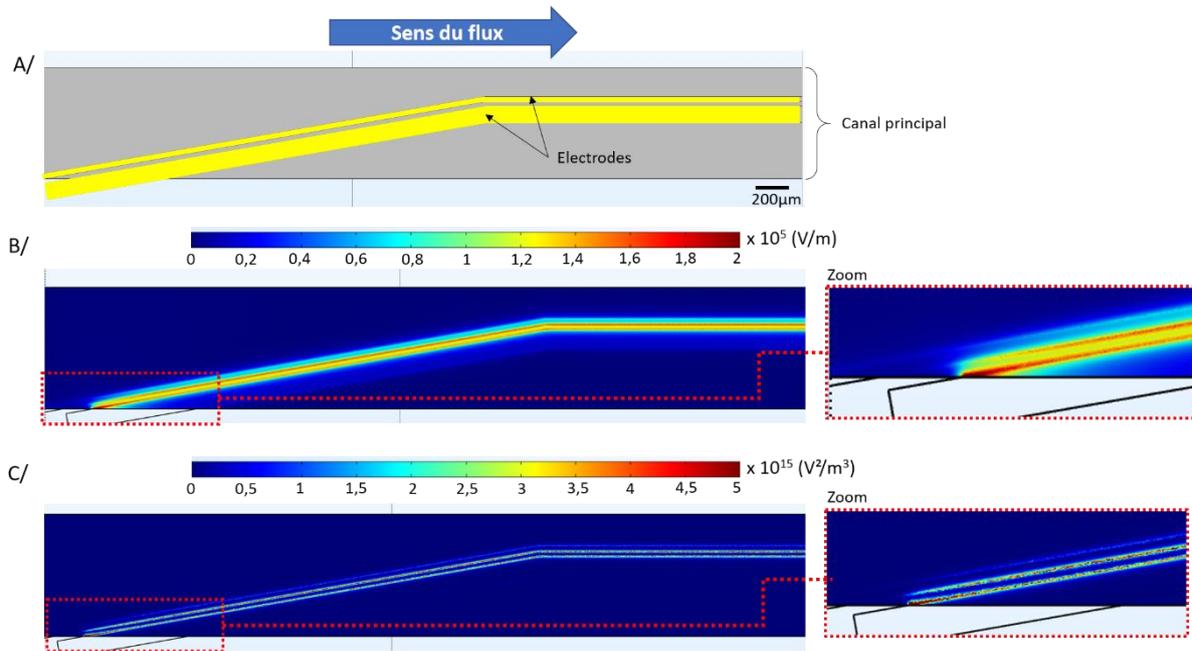


Figure III.25 : Simulation électrique des électrodes polarisées pour le tri cellulaire. (A) Géométrie des électrodes dans le canal principal avec un angle $\theta = 10^\circ$, un gap inter-électrode de $30\mu\text{m}$, une largeur de l'électrode signal et de la masse respectivement de $30\mu\text{m}$ et $100\mu\text{m}$; (B) Simulation du champ électrique généré par une tension de 5 V entre les électrodes ; (C) Simulation du gradient de champ $\nabla|E^2|$ dans les mêmes conditions.

La géométrie des électrodes est présentée sur la Figure III.25A avec un angle θ de 10° et un gap inter-électrode de $30\mu\text{m}$. En contrepartie, une électrode aussi peu inclinée impose une plus grande longueur du canal principal. De plus, après la partie oblique, les électrodes sont parallèles à la paroi afin de conduire les cellules déviées jusqu'à la sortie n°2. En effet, en cas de léger déséquilibre de pression entre les deux sorties, les électrodes pourront continuer de guider les cellules. La simulation du champ électrique (Figure III.13B) montre qu'il est plus intense entre les électrodes et sur les bords de ces dernières. Cela résulte en un gradient de champ (Figure III.13C) maximal sur les bords internes des électrodes. Alors, les cellules présentant un f_{cm} supérieur au f_{cm}^c du cytomètre en valeur absolue seront repoussées par le maximum de gradient et entraînées par le fluide, leur nouvelle trajectoire suivra la pente des électrodes. Cependant, on peut remarquer qu'à l'endroit où les électrodes pénètrent dans le canal principal, le champ électrique n'est pas encore homogène et le gradient n'est pas encore établi, ce qui risque de perturber localement le tri cellulaire. Ceci est en fait dû à la discontinuité diélectrique liée au changement abrupt de permittivité diélectrique entre les murs de PDMS délimitant le canal ($\epsilon_r \approx 3$) et le fluide circulant dans le canal ($\epsilon_r \approx 80$). Cette problématique a été considérée et prise en compte lors de la conception du réseau microfluidique. Le canal latéral du buffer empêchera les cellules d'arriver trop près de la paroi du canal principal, afin d'être déviées correctement par le signal DEP.



III.3. Procédé de fabrication du cytomètre électromagnétique

La suspension cellulaire à trier va circuler dans les canaux microfluidiques fabriqués dans une pièce de polydiméthylsiloxane (PDMS). Elle servira aussi de capot pour le substrat sur lequel seront réalisées les électrodes. Les canaux seront moulés dans du PDMS à l'aide d'une empreinte réalisée dans une double couche de films secs (polymère photosensible) laminés sur un substrat de silicium. Le motif électrode du cytomètre est quant à lui, réalisé sur un substrat de silicium haute résistivité par la technique de lift-off après une photolithographie UV par écriture directe laser dans une couche de résine étalée à la tournette.

III.3.1. Test de la photolithographie par écriture laser afin de connaître les doses et la vitesse d'écriture optimale

La méthode de la photolithographie repose sur la photosensibilité aux longueurs d'onde UV 365-405nm d'une résine polymère au préalablement déposée sur notre substrat soit par « spin coating » soit par lamination lorsqu'elle est conditionnée sous la forme d'un film sec. La surface de cette dernière est insolée partiellement, la plupart du temps au travers d'un masque qui est une plaque de verre avec des zones chromées et opaques définissant ainsi les motifs que l'on souhaite reproduire sur le substrat. En fonction de la quantité de lumière absorbée, les résines photosensibles voient leur solubilité dans une solution de développement appropriée évoluer.

Pour la technique conventionnelle de photolithographie, on utilise un masque sur lequel sont dessinés au préalable les motifs que l'on souhaite transférer sur notre substrat. Cette approche est particulièrement intéressante, lors d'une utilisation fréquente des mêmes motifs car les UV insolent toute la surface du substrat en une fois, nécessitant pas plus de quelques minutes de mises en œuvre (alignement et exposition inclus). Néanmoins, l'exposition au travers de masque souffre d'un manque de définition lors de l'utilisation des résines épaisses de plusieurs microns. Ce manque de précision est lié aux problématiques de diffraction sur les bords des zones chromées des motifs du masque et de réflexion sur la surface des substrats dont les effets sont d'autant plus visibles pour des distances importantes de séparation substrat-masque. A contrario, la lithographie laser par écriture directe, ne nécessite pas de recours à un masque et met à profit un spot laser qui éclaire toujours parfaitement à la perpendiculaire le polymère. Elle permet une souplesse dans les motifs à écrire, ajustables à façon en modifiant le fichier numérique de pilotage du balayage du faisceau laser, évitant la réalisation couteuse



de plusieurs masques. Pour réaliser nos étapes de photolithographie, nous avons utilisé la machine d'écriture directe Dilase 650 de la société Kloé.

Pour réaliser nos canaux, les motifs souhaités sont dessinés grâce au logiciel ADS (Advance Design System) et exportés sous format gds. Dès lors, le fichier peut être traduit en fichier de balayage pour l'écriture laser et définir des zones de remplissage (zones où le faisceau va faire un balayage continu d'aller-retours pour irradier toute une surface donnée). En effet, il est possible d'utiliser un spot laser de diamètre $1\mu\text{m}$ ou $10\mu\text{m}$ et de longueur d'onde de 375nm , qui peut balayer la surface de la résine, horizontalement ou verticalement ou obliquement selon l'option choisie et insoler la résine seulement dans les zones définies. Pour balayer la surface, un taux de chevauchement entre deux passages adjacents du laser de 50% a été choisi pour garantir une bonne uniformité d'exposition. Par ailleurs, plusieurs paramètres sont à considérer comme la modulation du laser (intensité lumineuse du spot), la vitesse d'écriture (temps passé à irradier un point donné) et la focalisation du laser (densité d'énergie concentrée en un point donné).

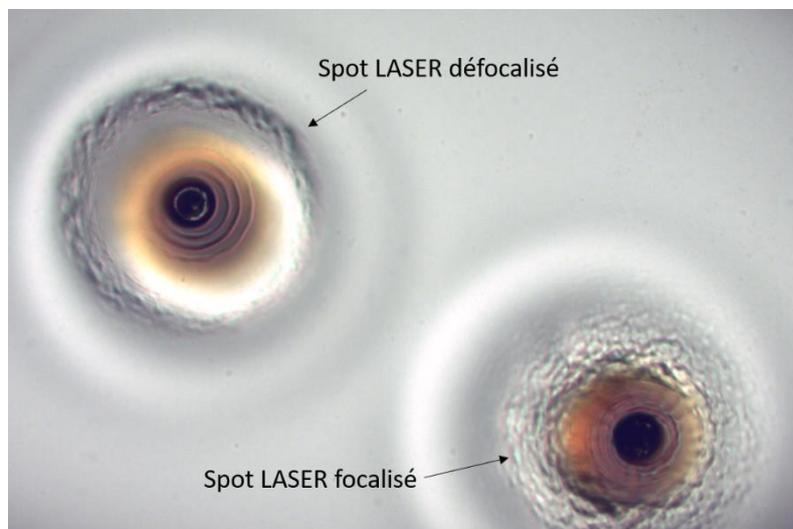


Figure III.26 : Impacts du spot LASER de $10\mu\text{m}$ de diamètre de l'appareil de lithographie dans le cas où il est défocalisé (en haut à gauche) et focalisé (en bas à droite)

Comme le faisceau laser est gaussien, il est nécessaire de focaliser le maximum d'intensité dans l'épaisseur totale de la résine afin qu'elle soit irradiée sur toute son épaisseur de manière homogène. En effet, sur la Figure III.26, on peut voir l'impact du laser sur la résine. Ici la résine utilisée est un film sec DF1050 d'épaisseur $50\mu\text{m}$. Lorsque le spot laser n'est pas focalisé, on constate que la résine n'est pas



irradiée de manière égale et des strates peuvent être observées, suggérant que les futurs murs des canaux microfluidiques ne seraient pas droits dans le plan vertical.

Une fois le laser bien focalisé sur la résine, il reste deux paramètres à déterminer : la modulation (intensité) du laser qui est exprimée en % de sa puissance maximale et la vitesse d'écriture (de balayage) qui est exprimée en mm/s. Cette dernière peut être ajustée entre 1 mm/s à 50 mm/s. Cependant, l'intérêt de la lithographie laser réside en la possibilité de fabriquer rapidement des prototypes de cytomètres pour aussitôt valider expérimentalement la géométrie choisie et dans le cas contraire, ajuster le fichier gds et réutiliser la lithographie laser pour intégrer les améliorations de design apportées. Par conséquent, il semble judicieux de ne pas utiliser une vitesse d'écriture trop faible, pour que l'impression soit plus rapide. Il faut savoir que les paramètres modulation/vitesse sont liés car si la vitesse d'écriture est faible alors la résine voit pendant plus longtemps le spot laser et donc reçoit une plus grande intensité lumineuse.



Figure III.27 : Monocouche de film sec DF1050 exposé à différentes doses de modulation laser. (A) La résine a reçu une trop forte dose et a été surexposée ; (B) la résine a reçu une dose correcte de radiation ; (C) la résine n'a pas reçu assez de lumière et est sous-exposée.

La Figure III.27 présente les résultats de tests d'écriture d'une couche du film sec DF1050 sur laquelle le motif des lettres XLIM a été écrit avec un spot laser de 10 μm . Sur la première image (Figure III.27A), la modulation laser est de 80% pour une vitesse d'écriture de 20 mm/s. On peut voir que la résine a trop intensément irradié et a même brûlé sous l'action du laser. Il a donc été décidé de placer un filtre sur le chemin optique du laser ne laissant passer que 10% de l'intensité du laser afin de l'atténuer. Sur la deuxième photo (Figure III.27B), la modulation laser est de 60% (+ filtre de transmission 10%) pour une vitesse d'écriture de 40mm/s. Cette exposition est correcte, car on peut voir les bords parfaitement définis (droits et traits fins) des motifs. Sur la troisième image (Figure III.27C), la modulation laser est de 20% (+filtre 10%) pour une vitesse d'écriture de 50mm/s. On constate que la résine n'a pas reçu une dose de radiation suffisante ne permettant pas un développement correct des



motifs. Plusieurs essais ont été effectués afin d'optimiser les paramètres. Néanmoins, les valeurs optimales se sont révélées valables que pour un type de résine et une épaisseur donnée, si cela change, il faudra réoptimiser les paramètres de modulation et de vitesse d'écriture.

Comme évoqué précédemment, le système de pressage du tampon de PDMS peut réduire artificiellement la hauteur des canaux microfluidiques et ainsi entraver la libre circulation des cellules dans le réseau fluide. Lorsque l'on double l'épaisseur du film sec DF1050 pour réaliser des canaux de hauteur 100 μm , les valeurs des paramètres de lithographie laser sont : modulation à 18% sans filtre et vitesse d'écriture à 30mm/s.

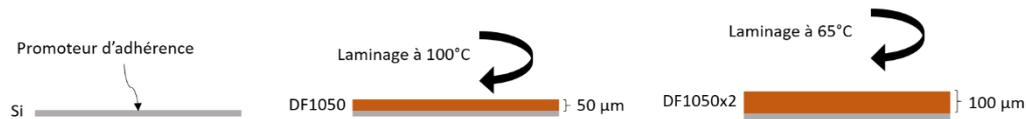
III.3.2. Réalisation du tampon en PDMS

Nous avons décidé de mouler les canaux microfluidiques dans le PDMS dont la Figure III.28 décrit les différentes étapes du procédé.

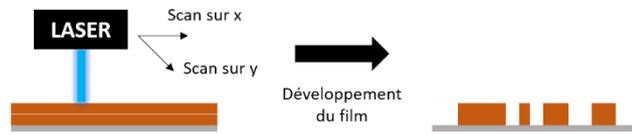
Dans un premier temps, il est nécessaire de réaliser le moule dans lequel le PDMS sera coulé pour obtenir l'empreinte du réseau microfluidique. La première étape consiste à laminier du film sec sur un substrat de silicium. En premier lieu, un promoteur d'adhérence est déposé à la tournette. Puis le substrat est chauffé à 100°C pendant 1 minute. Les rouleaux de la lamineuse sont chauffés à 100°C. Un premier film est découpé à la taille du substrat, puis plaqué sur le silicium, tous deux insérés entre les rouleaux chauffants de la lamineuse. Pour le deuxième film de polymère, on suit la même procédure si ce n'est que la température des rouleaux est abaissée à 65°C.



1/ Laminage du film sec



2/ Lithographie laser



3/ Moulage du PDMS

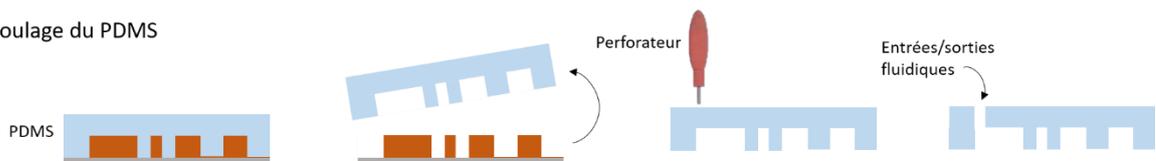


Figure III.28 : Schéma des différentes étapes de la fabrication des canaux microfluidiques moulés dans le PDMS

La deuxième étape est l'écriture laser avec une modulation de 18% sans filtre, et une vitesse d'écriture de 30mm/s. Comme la résine utilisée est négative, seules les zones non exposées aux radiations lumineuses disparaissent lors du développement. Pour créer le moule pour le PDMS, ce sont donc les motifs des canaux qui sont éclairés, et donc vont rester sur le substrat de silicium. Après exposition aux UV, le substrat subit une cuisson post-exposition bake (PEB) à la plaque chauffante avec une rampe de température par palier en partant de 65°C jusqu'à 100°C et cela pendant 12 minutes. Ensuite, le substrat est plongé dans deux bains successifs de cyclohexane pendant 6 minutes chacun pour réaliser le développement de la double couche de films. La dernière étape consiste en une dernière cuisson hard bake à 150°C sur une plaque chauffante pendant 1 heure pour augmenter l'adhésion de la double couche de film au substrat.

La solution visqueuse de PDMS est fabriquée à partir du mélange entre le monomère (Silgard 184) et un agent réticulant sous forme liquide avec le ratio 10:1. Puis le PDMS est dégazé sous vide, et versé délicatement sur le substrat de silicium avec l'empreinte des canaux qui a été disposé dans une capsule en aluminium. Le tout est placé dans une étuve à 75°C pendant 2 heures pour permettre au PDMS de réticuler et prendre sa forme solide. A la fin, le tampon de PDMS est décollé de la surface du moule, puis perforé au niveau des réservoirs pour les entrées des cellules, du buffer et des deux sorties, afin d'y connecter les capillaires faisant circuler le liquide des Eppendorfs jusqu'à la puce microfluidique.



Une fois le réseau microfluidique du cytomètre imprimé dans le tampon PDMS, ce dernier est pressé mécaniquement au substrat de silicium (Figure III.29) sur lequel les électrodes utilisées pour dévier les cellules d'intérêt par diélectrophorèse répulsive ont été fabriquées.

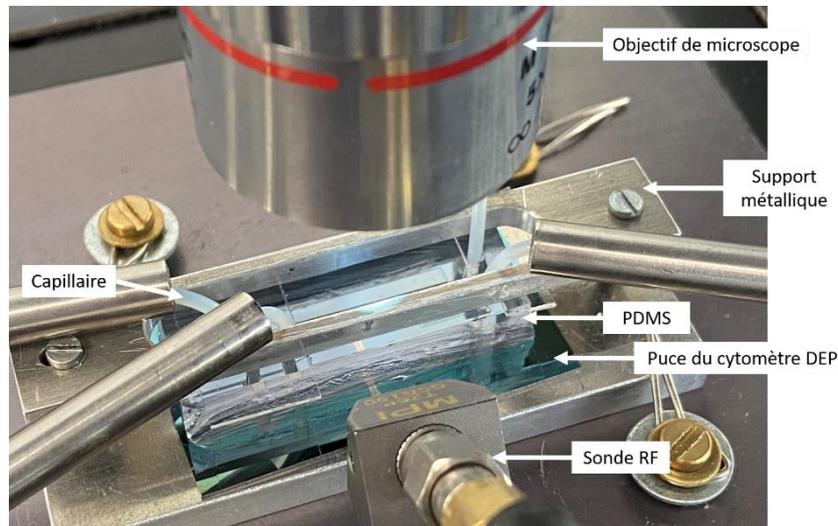


Figure III.29 : Support de pressage du PDMS sur la puce du cytomètre DEP

III.3.3. Fabrication des électrodes

La Figure III.30 décrit les différentes étapes du procédé de fabrication de la ligne CPW de l'électrode de déviation.

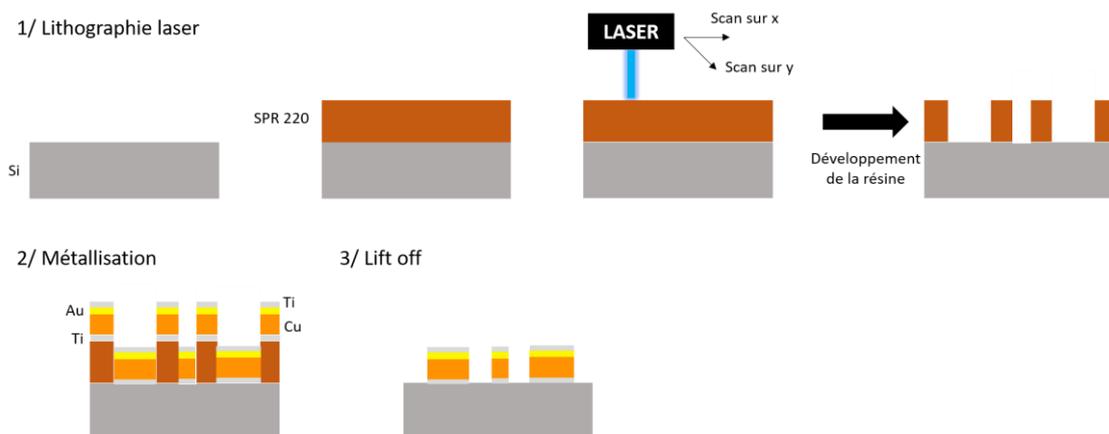


Figure III.30 : Procédé de fabrication de l'électrode du cytomètre électromagnétique (Les épaisseurs dessinées ne sont pas à l'échelle)

La première étape consiste à déposer sur un wafer de silicium haute résistivité recouvert d'une couche d'oxide de silicium d'épaisseur $1 \mu\text{m}$, une couche de résine sacrificielle SPR 220, qui est une résine positive, c'est-à-dire que les zones exposées aux UV deviendront solubles dans un développeur.



Les motifs sont écrits avec une vitesse de 20 mm/s, une modulation laser de 40% et un filtre de 10%. Ensuite, la résine est plongée dans le développeur dilué de ratio volumique 1:3 dans l'eau déionisée, pendant 5 à 6 minutes sans agitation pour révéler les motifs.

La seconde étape concerne la métallisation des électrodes. La technique précédemment utilisée par Thomas Provent était l'électrolyse, qui permet la croissance rapide en couche épaisse du métal. Cependant, il semblerait que la surface métallisée résultante présentait une rugosité de surface non négligeable favorisant ainsi l'adhésion des cellules sur les électrodes et pouvant ainsi perturber le tri cellulaire. Lors de nos travaux, la partie électrique est réalisée par évaporation uniquement grâce à un dépôt sous ultravide au canon à électrons. Cette méthode permet une métallisation en couche mince, permettant d'obtenir une surface plus uniforme. La première couche déposée est le titane (Ti) de 10 nm d'épaisseur qui est une phase d'accroche pour le métal suivant : le cuivre (Cu), monté à une épaisseur de 500 nm. Puis une couche d'or (Au) qui est non oxydable et biocompatible, est déposée sur une épaisseur de 50 nm, enfin un dernier dépôt de titane de 15 nm termine la constitution de l'électrode pour favoriser une meilleure adhérence sur les électrodes du tampon de PDMS qui va constituer les bords des canaux microfluidiques, et limiter les risques de fuites.

En dernière étape, le lift-off permet de retirer la couche sacrificielle de résine. Cette dernière se décolle du wafer dans un bain d'acétone avec ultrasons, laissant ainsi apparaître les électrodes du cytomètre (Figure III.31).

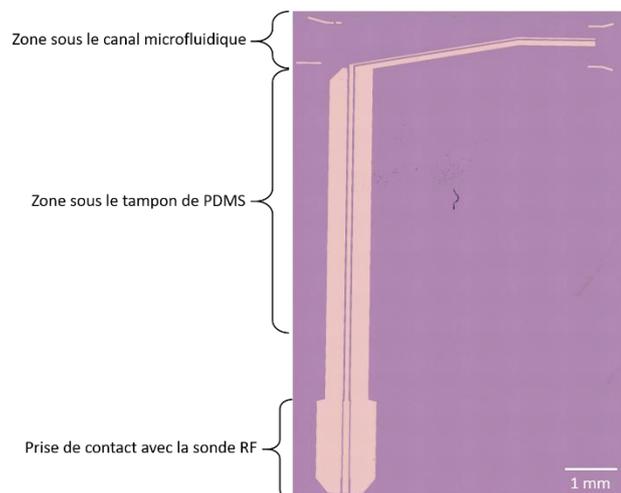


Figure III.31 : Photo de la ligne CPW pour la déviation cellulaire avec un gap inter-électrodes de 30 μm



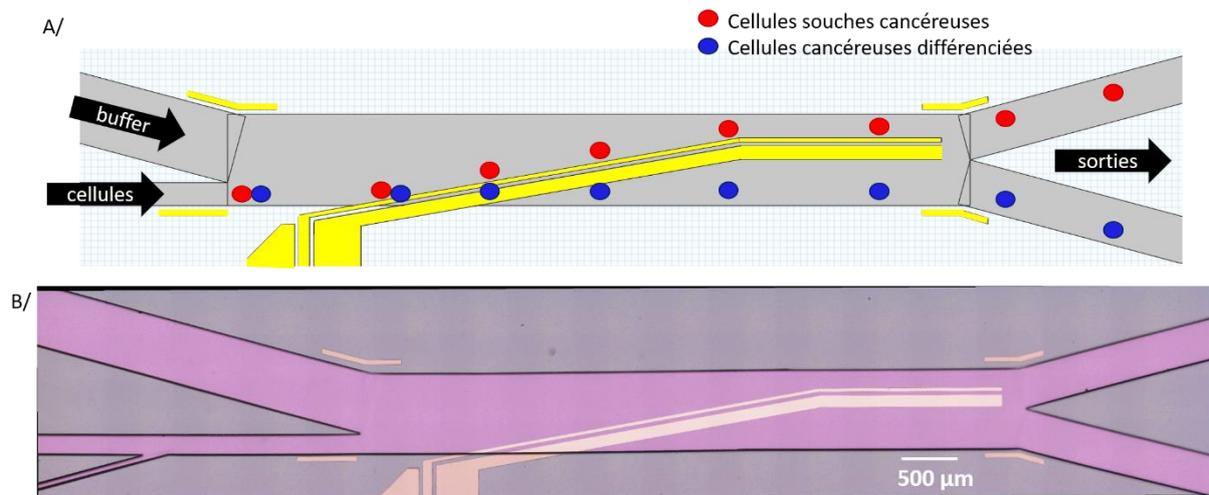


Figure III.32 : Focus sur la partie tri du cytomètre électromagnétique, le tampon de PDMS est posé et aligné sur les électrodes de tri (A) Principe du tri de notre cytomètre DEP (B) Visuel du prototype fabriqué.

Avec une fréquence f_i de tri adéquate, on s'attend à ce que les cellules cancéreuses différenciées (en rouge) réagissent faiblement à la force DEP, traversent les électrodes et soient entraînées par le fluide vers la sortie basse. Quant aux cellules souches cancéreuses (en vert), elles devraient être déviées par le champ électrique en suivant la pente des électrodes et devraient donc être récupérées dans la sortie haute.

IV. Mise en œuvre expérimentale du cytomètre en flux

Dans cette partie, nous allons présenter les résultats expérimentaux obtenus à partir de ce nouveau prototype de cytomètre électromagnétique. Pour ce faire, nous allons en premier lieu valider la géométrie du réseau microfluidique et en particulier le module de focalisation cellulaire. Puis, avec une population de SW620 NM, nous pourrions confirmer une première étape de déviation et de récupération de cellules en sortie du cytomètre. Enfin, une première preuve de concept de séparation sur un critère de fréquence de tri sera présentée. L'objectif est de trier la sous-population des CSCs des autres cellules cancéreuses différenciées en se basant sur la discrimination des signatures électromagnétiques. C'est pourquoi nous utiliserons la lignée cellulaire SW620 qui possède des gammes de fréquences de transition disjointes entre cellules différenciées et cellules souches (cf Chapitre II).



IV.1. Validation de l'efficacité du module de focalisation microfluidique

Tout d'abord, nous allons tester sans les électrodes de déviation, le réseau microfluidique complet du cytomètre que nous avons optimisé. Nous utilisons une suspension très concentrée de levures de petites tailles afin de valider visuellement l'efficacité du module de focalisation microfluidique et la stabilité du flux. L'usage de levures favorise l'obtention de suspension particulière dotée d'un fort contraste optique pour avoir une meilleure vue d'ensemble des phénomènes fluidiques.

A cet effet, les levures sont concentrées à 34 millions de levures par mL dans du milieu DEP. Elles sont injectées par l'entrée des cellules, tandis que du milieu DEP dépourvu de particules est injecté dans l'entrée du buffer. La pression pour l'entrée du canal d'injection des levures est fixée à 20 mbar, et la pression du buffer varie de 20 mbar à 42 mbar afin de tester l'effet de ce dernier sur la focalisation des levures à l'entrée du canal principal du cytomètre (Figure III.33)

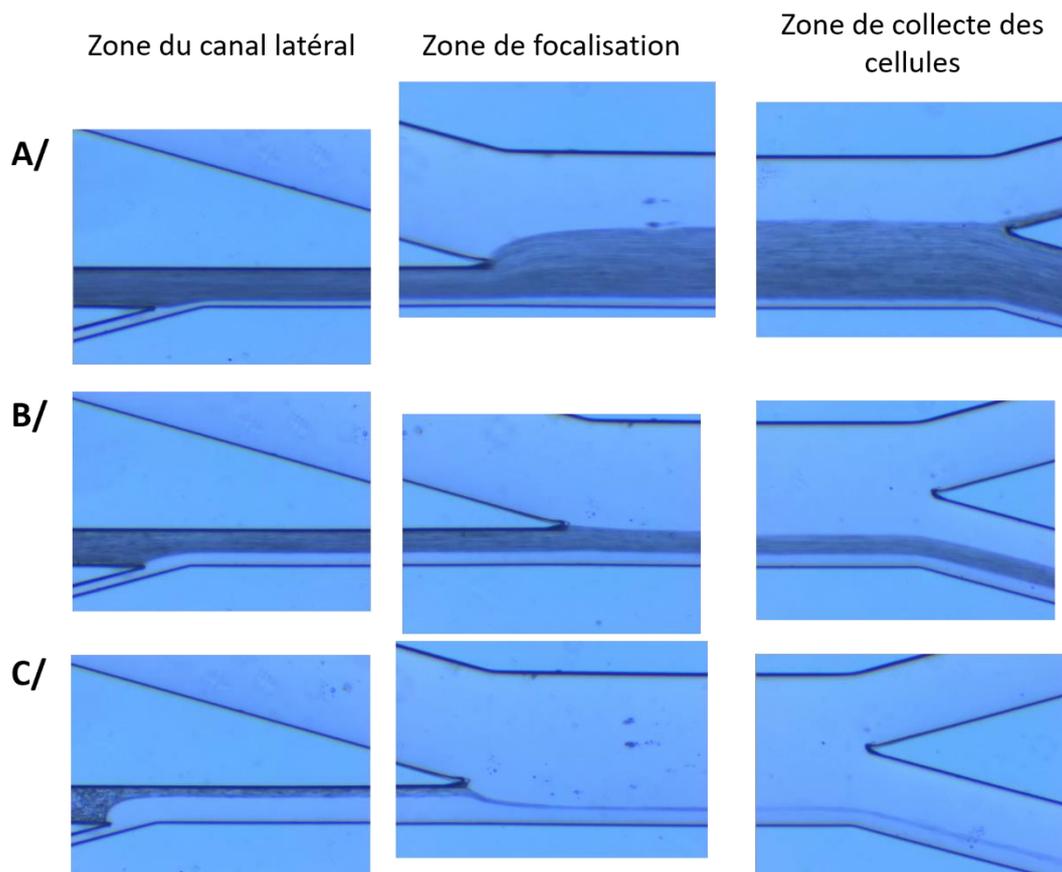


Figure III.33 : Photos de suspension de levures circulant dans le réseau fluidique du cytomètre électromagnétique (sans électrode) pour différentes pressions du buffer : (A) 20 mbar ; (B) 34 mbar ; (C) 42 mbar en maintenant une pression du canal d'injection à 20 mbar.



La Figure III.33 montre des photos de trois zones différentes du réseau microfluidique du cytomètre : la zone de l'intersection entre le canal latéral du buffer et celui de la suspension cellulaire, la zone de focalisation à l'entrée du canal principal et la zone de collecte des cellules triées. En première observation, on peut vérifier que nous sommes bien en régime laminaire car les levures suivent toujours la même direction. De plus, on peut remarquer que le canal du buffer et le canal latéral sont bien reliés sans problème fluide car plus la pression du buffer augmente, plus leur action conjuguée de déviation des levures et de leur focalisation sont importantes. Lorsque la pression du buffer n'est pas suffisante (Figure III.33A), les cellules sont situées au-delà de la demi largeur dans le canal principal et peuvent être collectées dans les deux sorties. Cette situation n'est pas souhaitable car il serait alors difficile de distinguer les cellules qui auraient été déviées par l'influence du champ électrique. La situation de la Figure III.33B ou III.33C sont optimales et permettent de voir que naturellement, les levures non déviées sont récupérées dans la sortie n°1.

A une pression d'injection cellulaire fixée, nous avons ainsi une marge de manœuvre suffisante au niveau de la pression du canal du buffer pour ajuster la focalisation des cellules souhaitée sans qu'il soit nécessaire de contre-pressuriser également les voies de sortie.

IV.2. Premier test fonctionnel : déviation d'une population cellulaire

Dans un premier temps, nous avons mené des tests de tri cellulaire avec le cytomètre électromagnétique sur une population de SW620 NM. Avec cette lignée dont nous connaissons la signature électromagnétique, nous pourrions analyser l'influence de la puissance du champ électrique sur le facteur de Clausius-Mossotti critique et donc sur la déviation cellulaire à vitesse fluide constante. Puis nous regarderons le nombre de cellules récupérables à la fin d'une expérience de déviation ainsi que leur viabilité (impact du passage des cellules dans le cytomètre).

On fixe une fréquence de déviation de 600 MHz et on fait varier la puissance délivrée par le générateur RF : -2 dBm, 0 dBm et 2 dBm (valeurs amplifiées par l'amplificateur de puissance du banc de test). Notons qu'en raison de l'impédance non parfaitement adaptée de notre circuit qui de surcroît varie en fonction de la fréquence, génère une réflexion d'une partie du signal CW d'origine à l'entrée du cytomètre, mais n'empêchant pas l'établissement d'une tension conséquente aux bornes des électrodes. Au cours des expériences, nous n'avons pas pu mesurer les tensions vues par les cellules en temps réel. Il faudrait pour cela implémenter une sonde de tension très haute impédance dans le canal



microfluidique. Néanmoins, afin de pouvoir mettre en place des modèles prédictifs, nous utilisons en première approximation, des puissances et des tensions correspondantes que délivrerait l'amplificateur sur une impédance idéale de 50Ω . Ainsi, pour une puissance émise par le générateur de -2dBm , l'amplificateur délivre au cytomètre $36,54 \text{ dBm}$ (soit $11,9 \text{ V}_{\text{RMS}}$); pour une puissance délivrée par le générateur de 0 dBm , l'amplificateur émet $37,5 \text{ dBm}$ (soit $13,3 \text{ V}_{\text{RMS}}$); pour une puissance délivrée par le générateur de 2 dBm , l'amplificateur émet $37,73\text{dBm}$ (soit $13,6 \text{ V}_{\text{RMS}}$). Il sera nécessaire de faire évoluer le banc de caractérisation afin de pouvoir mesurer ces paramètres en temps réel et ainsi, préciser les modèles théoriques.

Les pressions d'entrée sont aussi fixées à 4 mbar pour l'entrée d'injection cellulaire et 10 mbar pour l'entrée du buffer. La vitesse moyenne des cellules dans le canal principal est en pratique de $3,6 \text{ mm/s}$ (elle est donnée à $2,5 \text{ mm/s}$ avec le logiciel python). Le diamètre mesuré des SW620 NM est de $12\mu\text{m} \pm 1,5\mu\text{m}$.

A partir de ces données, nous pouvons estimer le facteur de Clausius-Mossotti critique en fonction de la puissance du signal DEP qui est de $-0,0533$ pour $36,54 \text{ dBm}$; $-0,0426$ pour $37,5 \text{ dBm}$ et $-0,0408$ pour $37,73 \text{ dBm}$ (reportés sur la Figure III.35). Avec la diminution du facteur critique, nous nous attendons donc à ce que plus de cellules soient déviées lorsque la puissance du signal DEP augmente.

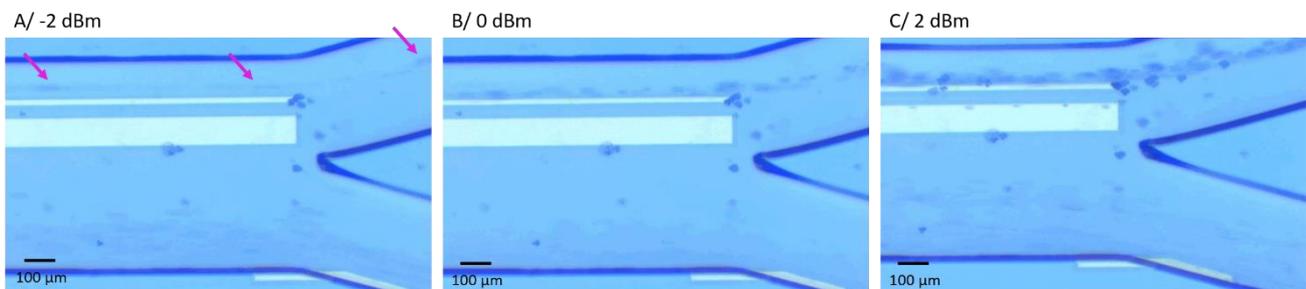


Figure III.34 : Influence de la puissance délivrée par le générateur RF avant amplification du signal DEP sur la quantité de cellules SW620 NM déviées à une fréquence fixée de 600MHz (pour une vitesse de déplacement dans le canal principal estimée à $3,6 \text{ mm/s}$)

On peut voir sur les photos de la Figure III.34 que l'effet de la puissance du signal DEP appliqué aux électrodes module bien le nombre de cellules dont la trajectoire a été déviée sous l'influence des électrodes du cytomètre. En effet, à vitesse fluide constante évaluée à $3,6 \text{ mm/s}$, plus la puissance augmente, plus la sortie n°2 collecte de cellules. En effet, l'intensité du gradient de champ est plus élevée, ce qui fait opérer le cytomètre avec un facteur de Clausius-Mossotti critique plus faible.



La signature électromagnétique de la population cellulaire des SW620 NM s'étend sur une plage de fréquences comprise entre 212 MHz et 384 MHz. A partir de l'équation de la fréquence de transition f_{x02} (I.24), les seules inconnues sont les propriétés diélectriques du contenu interne de la cellule biologique. Dans les travaux précédents [1], il a été démontré qu'en théorie il existe de très nombreux couples (σ_{int} ; ϵ_{int}) permettant d'obtenir la même valeur de la fréquence de transition et qu'il est possible d'exprimer la permittivité du contenu intracellulaire en fonction de sa conductivité respective. D'après les données que l'on trouve dans la littérature [17]–[20], on peut estimer la conductivité moyenne intracellulaire des cellules cancéreuses issues de tumeurs solides des lignées commerciales à 0,65 S/m. Alors, en réinjectant cette valeur de conductivité intracellulaire dans l'équation (I.24), les permittivités qui correspondraient pour les fréquences de transition minimale 212 MHz et maximale 384 MHz seraient respectivement $73,3\epsilon_0$ F/m et $76,6\epsilon_0$ F/m. Par la suite, à partir du modèle cellulaire monocouche, on peut évaluer la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti à 600MHz pour les deux cellules ayant des fréquences de transition différentes. Les valeurs de l'épaisseur, de la conductivité et de la permittivité de la membrane plasmique que nous avons considérées sont extraites de [20] à partir d'une lignée tumorale de CCR de stade II les HT-29 pour être plus proches biologiquement de notre lignée SW620. L'épaisseur de la membrane est évaluée à 5 nm, sa conductivité à $5,02 \cdot 10^{-5}$ S/m et sa permittivité relative à $6,12\epsilon_0$ F/m.

A partir de ces approximations, pour les cellules SW620 NM ayant une fréquence de transition minimale de 212 MHz, la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est estimé à -0,0548. Tandis que pour les cellules ayant une f_{x02} de 384 MHz, le f_{cm} est calculé à -0,013. On peut donc émettre l'hypothèse que l'ensemble de la population cellulaire des SW620 possède un facteur CM compris entre ces deux valeurs pour une fréquence de travail de 600 MHz.



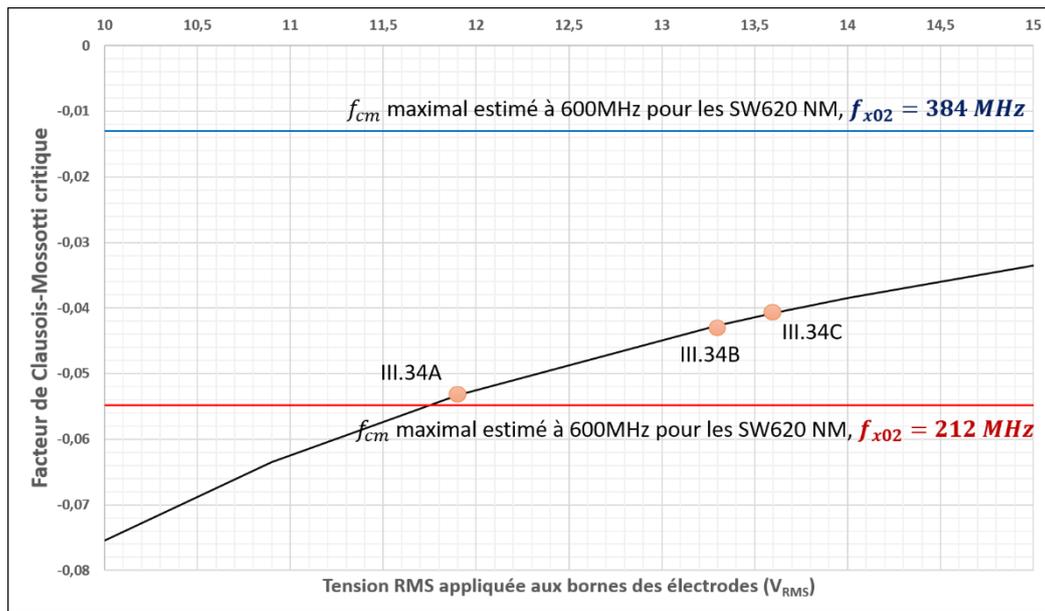


Figure III.35 : Impact de la tension appliquée aux électrodes sur le f_{cm} critique pour un angle $\theta = 10^\circ$, une vitesse de flux de 3,6 mm/s et un diamètre cellulaire de 12 μm . Les courbes rouges et bleues représentent le f_{cm} maximal estimé pour les cellules SW620 NM à la fréquence de 600MHz pour deux cellules ayant une fréquence de transition f_{x02} minimale ou maximale.

La Figure III.35 représente le facteur de Clausius-Mossotti critique en fonction de l'intensité du champ appliqué, pour la géométrie de l'électrode muni d'un angle θ de 10° , une vitesse de flux de 3,6mm/s et en considérant un diamètre cellulaire moyen de 12 μm . Les points marqués sur la courbe noire indiquent le facteur CM critique pour chaque condition de la Figure III.34. Pour rappel, si le f_{cm} d'une cellule se situe sous la courbe noire, alors la cellule est déviée. Les lignes rouge et bleue délimitent les valeurs possibles et estimées du facteur de Clausius-Mossotti de la population des SW620 NM pour une fréquence de tri de 600MHz. Avec les puissances de signal appliquées, on remarque que la courbe du f_{cm} critique est incluse dans cet intervalle. A 36,54dBm (cas de la Figure III.34A), on s'attend à avoir un faible ratio de cellules possédant un f_{cm} supérieur au f_{cm} critique.

Cette proportion augmente si l'on augmente la puissance du signal DEP appliqué au cytomètre. Le nombre de cellules possédant à la fréquence de tri $f_i = 600\text{MHz}$ une valeur de f_{cm} supérieur au f_{cm} critique en valeur absolue devient alors croissant, les rendant aptes à être alors repoussées par le champ électrique généré par les électrodes du cytomètre.



A la fin d'une expérience de tri cellulaire, il est possible de récupérer les deux sous populations cellulaires collectées en sortie du cytomètre afin de compter les cellules et de vérifier leur bonne viabilité. Ainsi au bout d'une heure, en polarisant les électrodes avec un signal DEP de fréquence 500MHz et de puissance réelle de 37,5 dBm, nous avons pu collecter 52 000 cellules dans la sortie n°2 et 40 000 cellules dans la sortie n°1. En première estimation, il est possible d'établir une cadence de tri approximative atteignable par notre cytomètre électromagnétique, à savoir que nous avons pu en moyenne à minima trier 25 cellules par seconde.

Il est important de noter qu'après le passage dans le cytomètre, la viabilité des cellules semble très peu dégradée. En effet, on observe un taux de mortalité de 5% (analyse menée au bleu trypan), ce qui reste faible et laisse la possibilité de mener à l'avenir des tests biologiques complémentaires sur les cellules triées par le cytomètre électromagnétique.

IV.3. Tri et isolation des CSCs à partir d'une population cellulaire mixte

Dans un deuxième temps, nous allons tester l'efficacité de tri de notre cytomètre électromagnétique avec une population cellulaire mixte composée d'un mélange de cellules SW620 NM et SW620 DM+ dans un ratio 50/50. Les deux cultures cellulaires sont préalablement marquées par fluorescence afin de pouvoir facilement évaluer le nombre de cellules déviées par le cytomètre dans chaque population. Les marqueurs fluorescents membranaires utilisés permettent de visualiser en rouge (PKH26+) les cellules SW620 NM et en vert (PKH67+) les cellules SW620 DM. Comme ces marqueurs ne vont s'attacher que sur la membrane plasmique de la cellule et non dans son cytoplasme, nous pouvons supposer qu'ils n'affectent pas les signatures électromagnétiques. L'objectif de cette partie est d'observer l'effet de la fréquence de tri sur l'isolation de la sous-population des CSCs et d'obtenir des résultats préliminaires pour une première preuve de concept. Les signatures électromagnétiques précédemment mesurées sont rappelées sur la Figure III.36.



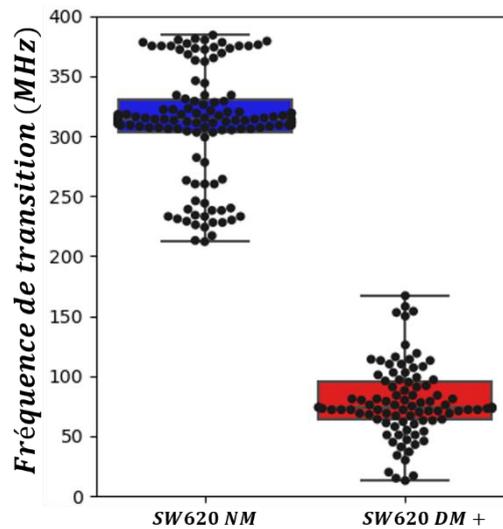


Figure III.36 : Signatures électromagnétiques UHF-DEP des populations SW620 NM et SW620 DM

Nous nous attendons à ce que la trajectoire des cellules cancéreuses différenciées SW620 NM dans le canal principal soit très peu affectée par la répulsion des électrodes et que ces cellules soient collectées en majorité dans la sortie n°1 du cytomètre électromagnétique. Au contraire, les CSCs SW620 DM seraient plus enclin à être soumises à une force DEP répulsive plus intense et leur trajectoire à s'infléchir pour suivre la pente des électrodes et au final être collectées dans la sortie n°2.

En effet, dans notre cas, nous souhaitons que les cellules SW620 NM ne soient pas déviées. Comme précédemment, nous pouvons calculer à partir de la géométrie des électrodes et des paramètres extérieurs (vitesse du flux et puissance du signal), une gamme de valeurs du facteur de Clausius-Mossotti critique. En effet, nous prévoyons de travailler avec une puissance délivrée du signal de 2 dBm et une vitesse de flux allant de 5 mm/s à 9 mm/s. Il en résulte alors une gamme de f_{cm} critique compris entre -0,0566 et -0,102. Notre objectif étant d'isoler une grande majorité de CSCs dans la sortie n°2, nous devons satisfaire les conditions suivantes avec f_t la fréquence de tri :

- $Re[f_{cm}]_{SW620 DM} < Re[f_{cm}^c] < 0 @ f_t$
- $Re[f_{cm}^c] < Re[f_{cm}]_{SW620 NM} < 0 @ f_t$



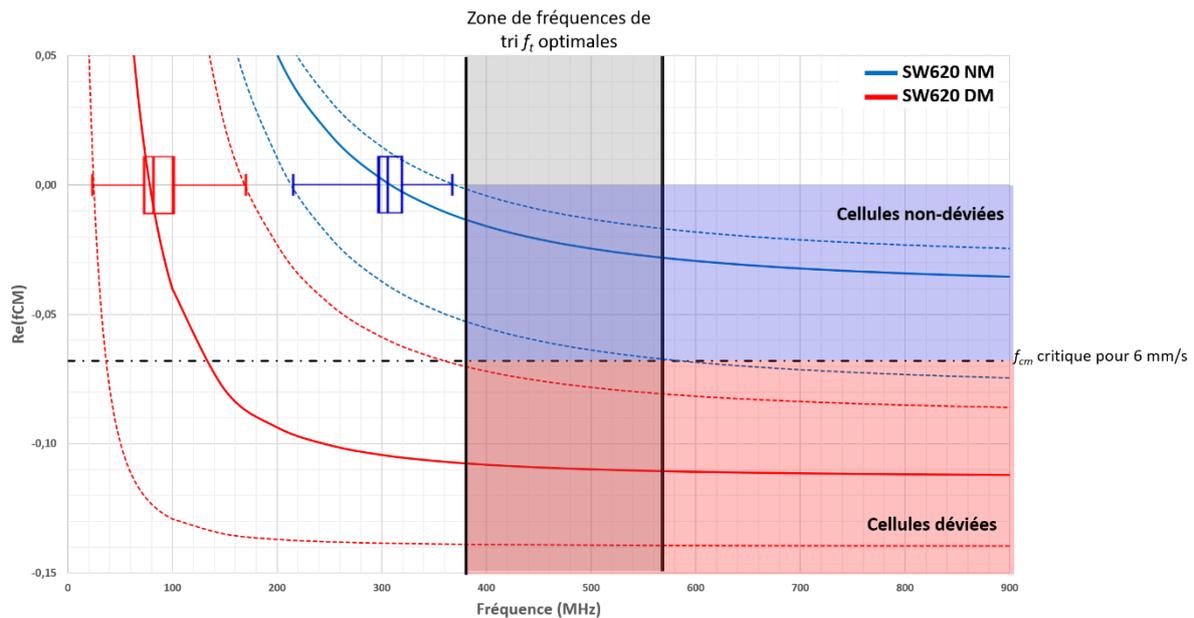


Figure III.37 : Evolution de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence et selon les signatures électromagnétiques mesurées pour les SW620 NM (courbes bleues) et SW620 DM (courbes rouges). Le f_{cm} critique est déterminé sur une plage de valeurs possibles pour un angle θ de 10° , une tension de $13,6 V_{RMS}$ et une vitesse de flux de 6 mm/s .

Tableau III.4 : Paramètres diélectriques internes utilisés au calcul des tracés du facteur CM de la Figure III.37

| <i>Conductivité interne</i> | <i>Permittivité interne</i> | <i>Fréquence de transition</i> |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 0,1 S/m | 49,7 ϵ_0 F/m | 20 MHz |
| 0,3 S/m | 54,68 ϵ_0 F/m | 74 MHz |
| 0,6 S/m | 59,3 ϵ_0 F/m | 167 MHz |
| 0,72 S/m | 61,34 ϵ_0 F/m | 212 MHz |
| 0,77 S/m | 69,62 ϵ_0 F/m | 314 MHz |
| 0,8 S/m | 72,01 ϵ_0 F/m | 384 MHz |

Par la suite, nous avons approximé l'évolution du facteur CM pour les deux populations SW620, en faisant le lien entre les signatures UHF-DEP mesurées et des valeurs de f_{cm} possibles. Il est nécessaire de noter qu'à la vue du manque important de données sur les valeurs des paramètres diélectriques des cellules biologiques, nous avons émis plusieurs hypothèses. Comme précédemment, nous avons imposé une valeur de la conductivité du milieu interne et à partir des fréquences de transition mesurées, nous avons calculé la permittivité relative correspondante (cf Tableau III.4). Nous avons également repris les



mêmes valeurs des propriétés membranaires à savoir une épaisseur de la membrane de 5 nm, une conductivité de $5,02 \cdot 10^{-5}$ S/m et une permittivité relative de $6,12\epsilon_0$ F/m. Le tracé des courbes est visible sur la Figure III.37. Ce tracé est valable pour une taille de cellule donnée et pour les paramètres diélectriques membranaires et intracellulaires fixés. Il peut être amené à être plus ou moins translaté si l'on voulait en toute rigueur tenir compte de la dispersion des propriétés naturelles des cellules.

On remarque qu'à partir de 360 MHz, il est possible de dévier un maximum de cellules SW620 DM avec le facteur CM critique adéquat. Cependant, une majorité de cellules différenciées sont en régime pDEP dans cette gamme de fréquence et pourrait adhérer aux électrodes, perturbant le tri. La plage de fréquence de tri optimale se situe entre 390 MHz et 560 MHz. En effet, on s'attend à ce qu'une large partie de la population SW620 DM soit déviée dans la sortie n°2 en évitant de dévier les cellules différenciées.

Nous avons pu mener une toute première expérience de tri de mélange de populations de cellules SW620 différenciées et indifférenciées durant laquelle nous avons fait varier la fréquence du signal DEP afin d'évaluer le niveau de sélectivité de la séparation du cytomètre électromagnétique. Pour cela, nous avons choisi trois fréquences : 480 MHz, 550 MHz et 700 MHz pour le signal DEP appliqué aux électrodes avec une puissance délivrée par le générateur RF de 2 dBm. Nous avons ajusté les pressions du réseau microfluidique pour assurer aux cellules une vitesse stabilisée de l'ordre de 6 mm/s durant leur traversée du canal principal du cytomètre. A la fin de l'expérience, nous avons récupéré les suspensions cellulaires à chaque sortie et évalué les proportions de cellules vertes et rouges sous un microscope entre lame et lamelle.



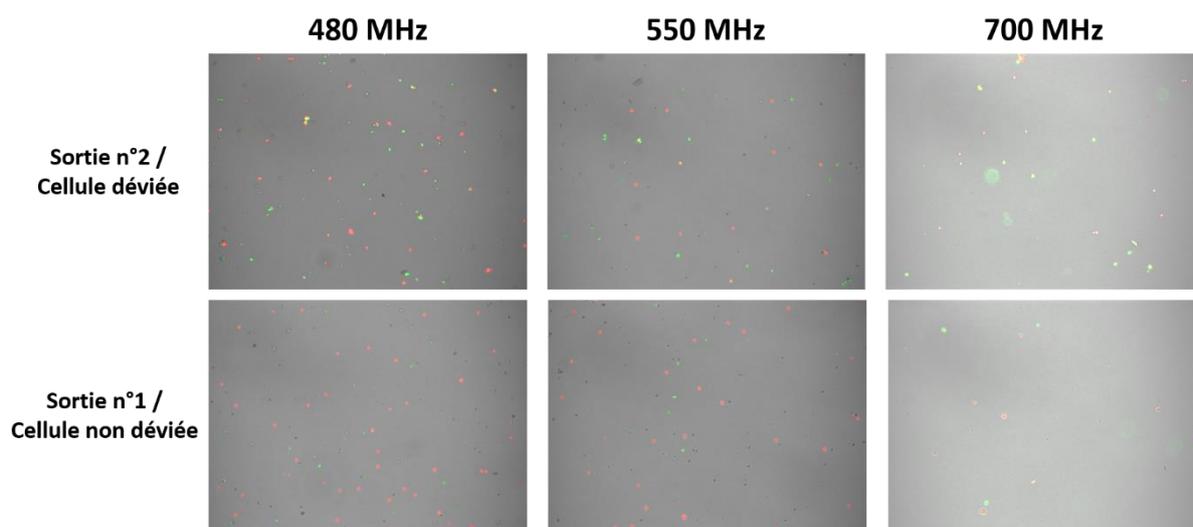


Figure III.38 : Photos des cellules collectées en fin de tri aux deux sorties du cytomètre DEP pour différentes fréquences du signal. Les cellules vertes sont les SW620 DM et les cellules rouges sont les SW620 NM.

La Figure III.38 montre des images prises des suspensions cellulaires collectées à chaque sortie à la fin de tri selon différentes fréquences du signal DEP utilisé pour polariser les électrodes du microsysteme. Aux deux fréquences les plus basses (480 et 550 MHz), on peut voir une disproportion entre les cellules rouges et vertes entre les deux sorties. En effet, on peut distinguer un plus grand nombre de cellules rouges dans la sortie n°1 et un plus grand nombre de cellules vertes dans la sortie n°2, confirmant que le cytomètre électromagnétique permet effectivement de séparer les cellules avec un assez bon taux de confiance. En revanche, à plus haute fréquence, il est difficile d'interpréter les images obtenues, rendant les calculs de proportion relative assez imprécis.

Tableau III.5 : Proportion de cellules colorées rouges et vertes par rapport au nombre total de cellules collectées à la sortie n°1 du cytomètre pour différentes fréquences du signal DEP

| | | 480 MHz | 550 MHz | 700 MHz |
|--|----------|---------|---------|---------|
| <i>Sortie n°1 / Cellules non déviées</i> | SW620 NM | 60% | 70% | 55% |
| | SW620 DM | 40% | 30% | 45% |



Tableau III.6 : Proportion de cellules colorées rouges et vertes par rapport au nombre total de cellules collectées à la sortie n°2 du cytomètre pour différentes fréquences du signal DEP

| | | 480 MHz | 550 MHz | 700 MHz |
|----------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| Sortie n°2 / Cellules déviées | SW620 NM | 30% | 30% | 50% |
| | SW620 DM | 70% | 70% | 50% |

En comptant le nombre de cellules de chaque couleur, nous avons pu établir des ratios entre populations d'origine. Les résultats sont reportés dans le Tableau III.5 et 6. Notons que les pourcentages présentés ont été calculés à partir d'une seule photo d'un petit échantillon de cellules (Figure III.38) pour le moment, considérée comme étant représentative. L'erreur estimée reste aux alentours de +/- 10%. On peut voir qu'à 480 MHz et 550 MHz, les cellules déviées sont en majorité des SW620 DM, c'est-à-dire des cellules majoritairement au profil de CSCs tandis que les trajectoires d'une majorité de cellules différenciées ont été faiblement affectées par l'influence répulsive des électrodes et se sont retrouvées en grand nombre collectées par la sortie n°1 du cytomètre. Lorsque la fréquence du signal DEP augmente, alors un plus grand nombre de cellules cancéreuses différenciées sont déviées et le tri devient moins sélectif. En effet, à de plus fortes fréquences de travail, certaines cellules SW620 NM voient leur facteur de Clausius-Mossotti suffisamment augmenter pour dépasser la valeur du f_{cm} critique du cytomètre. Elles parviennent alors à suivre l'inclinaison des électrodes.

Notons qu'au moment de l'écriture de ce manuscrit, cette expérience de tri n'a été réalisée qu'une seule fois par point de fréquence à cause de problèmes rencontrés d'adhésion des cellules sur les électrodes. Il sera nécessaire de les reproduire et d'affiner les réglages du cytomètre : fréquence du signal et intensité du champ électrique ainsi que la vitesse du fluide pour chercher à cibler des paramètres de tri plus optimaux et chercher à accroître la sélectivité du tri.

Ces résultats préliminaires sont très encourageants pour la poursuite du développement du cytomètre électromagnétique et permettent de valider notre approche. Il est bien entendu que des améliorations peuvent être entreprises et que les expériences doivent être réitérées afin de vérifier la répétabilité de notre système de tri.



V. Conclusion du Chapitre III

A partir des fréquences de transition UHF-DEP mesurées dans le chapitre II, il est possible de discriminer les cellules cancéreuses ayant un phénotype différencié et indifférencié. Dans l'objectif d'isoler la sous-population des CSCs, nous avons donc cherché à exploiter les signatures électromagnétiques au cours de ce dernier chapitre en développant un cytomètre électromagnétique, fonctionnant en flux continu et mettant à profit le potentiel de déflexion de trajectoire de forces répulsives induites par un signal nDEP aux fréquences UHF.

Ainsi, en partant d'un concept de cytomètre développé par Thomas Provent durant sa thèse, nous avons adapté sa géométrie pour nos besoins et redessiné complètement son réseau microfluidique. A cet effet, un logiciel de conception de canaux microfluidiques en langage python a été développé et codé. Ce dernier permet de calculer les résistances hydrauliques de chaque section d'un réseau microfluidique et de prédire les pressions à appliquer pour obtenir les débits désirés ainsi que les temps de parcours de cellules injectées dans ces réseaux. Les prédictions du logiciel ont été éprouvées à partir de canaux de référence.

Dans un deuxième temps, nous avons conçu le réseau microfluidique d'un cytomètre électromagnétique muni de deux sorties indépendantes et non pressurisées. Nous avons en particulier optimisé son système d'injection et de focalisation de cellules biologiques dans le canal principal. Opérant sur le principe d'une déviation de trajectoires induite par une paire d'électrodes parallèles inclinées par rapport à la direction de parcours des cellules dans le canal principal du microsystème, nous avons remarqué au travers de simulations numériques, la présence de non uniformité du gradient de champ électrique au voisinage d'une des parois de ce canal. Risquant d'entraîner des perturbations et des artéfacts lors du tri cellulaire, nous avons donc astucieusement modifié la géométrie du réseau microfluidique du cytomètre en y introduisant un module de focalisation des cellules à flux pincé.

Nous avons ainsi réalisé une étude paramétrique selon l'angle d'inclinaison du canal du buffer au niveau de la zone d'injection des cellules dans le canal principal du cytomètre. Nous avons choisi l'angle faible de 15° afin d'obtenir une focalisation efficace tout en limitant les perturbations de l'écoulement. Nous avons introduit une seconde branche de fluide buffer bien plus étroite et nous avons relié cette dernière au canal buffer principal pour n'avoir qu'une pression globale à gérer. Ce second canal buffer qui vient prélever une partie du fluide du canal du buffer et le réinjecter dans le canal des cellules juste en amont de la zone d'injection, permet ainsi de dévier la trajectoire de cellules qui auraient pu circuler trop proches de la paroi du canal principal. Sur la base de cette géométrie optimisée du cytomètre, nous avons fabriqué par nous-même de nouveaux prototypes à partir d'un procédé de fabrication simple qui a été détaillé également dans ce chapitre.



Cette nouvelle génération de cytomètre électromagnétique a été testé et éprouvé. Le réseau microfluidique a été validé en nous affranchissant des contre-pressions de sortie. Cela nous permet de réduire le nombre de voies de pression à gérer mais aussi de pouvoir récupérer très simplement les sous populations de cellules triées en sortie du cytomètre. Le module de focalisation cellulaire ainsi que la stabilité du fluide dans le réseau hydraulique ont pu également être validés, en utilisant une solution de levures très concentrée afin de mieux visualiser les trajectoires au sein du canal principal des particules en suspension.

Nous avons pu également valider l'efficacité de tri du cytomètre électromagnétique à partir d'expérimentations menées avec la lignée cellulaire des SW620. Nous avons vérifié l'aptitude du microsystème à dévier en répulsion les cellules d'une population plus ou moins homogène de manière sélective en fonction de leurs spécificités diélectriques propres et de pouvoir moduler la quantité de cellules triées, en ajustant plusieurs paramètres dont l'intensité du champ électrique et la fréquence du signal appliqué. Nous avons vu qu'une intensité importante permet de dévier plus de cellules biologiques, abaissant le seuil de facteur de Clausius-Mossotti critique du cytomètre. De plus, nous avons pu collecter pour la première fois les cellules dans chaque sortie à la fin du procédé de tri. Il nous a été ainsi possible de les compter et de vérifier leur bonne viabilité. Nous avons pu valider le fait que le cytomètre électromagnétique (réseau microfluidique et champ électrique) n'endommage pas les cellules ce qui permet d'envisager la possibilité de mener des tests biologiques complémentaires à l'avenir sur les cellules collectées. Finalement, nous avons mené une première expérience de tri à partir d'un mélange de cellules composé de CSCs et de cellules différenciées au préalable marquées avec un marqueur membranaire fluorescent pour faciliter la reconnaissance de chaque phénotype cellulaire et la validation de la séparation UHF-DEP. Après avoir identifié une plage de fréquences de tri optimale, nous avons montré que notre cytomètre sépare relativement efficacement les cellules selon leurs différences de signatures électromagnétiques. Nous avons pu également voir que lorsque la fréquence de tri est supérieure à la gamme suggérée, la séparation devient moins sélective. Ces tous premiers résultats restent préliminaires mais très prometteurs pour la suite de nos travaux et représentent une première preuve de concept de la faisabilité d'un tri et d'une isolation de la sous-population des cellules souches cancéreuses par une nouvelle génération de cytomètre « électromagnétique ».



VI. Référence bibliographique du Chapitre III

- [1] T. Provent, « Développement et caractérisation de capteurs électromagnétiques utilisant la diélectrophorèse haute fréquence pour l'isolation rapide de cellules souches cancéreuses sur puce », Thèse de doctorat, Limoges, 2022. Consulté le : 14 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.theses.fr/2022LIMO0039>
- [2] M. Lahmani et P. Houdy, *Les nanosciences (Tome 3) - Nanobiotechnologies et nanobiologie : Nanobiotechnologies et nanobiologie*. Humensis, 2015.
- [3] N. Rott, « Note on the History of the Reynolds Number », p. 13.
- [4] J. C. Schönfeld, « Analogy of hydraulic, mechanical, acoustic and electric systems », *Appl. Sci. Res. Sect. A*, vol. 3, n° 1, p. 417-450, déc. 1954, doi: 10.1007/BF02123920.
- [5] R. V. Giles, *Mécanique des fluides et hydraulique: cours et problèmes, 475 exercices résolus*. Ediscience, 1978.
- [6] *Hydraulique générale - Armando Lencastre - Librairie Eyrolles*. Consulté le: 15 janvier 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.eyrolles.com/BTP/Livre/hydraulique-generale-9782212018943/>
- [7] *Mémento des pertes de charges - I.E. Idel'cik - 3ème édition - Librairie Eyrolles*. Consulté le: 15 janvier 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.eyrolles.com/BTP/Livre/memento-des-pertes-de-charges-9782212059007/>
- [8] A. M. G. Lopes, « Implementation of the Hardy-Cross method for the solution of piping networks », *Comput. Appl. Eng. Educ.*, vol. 12, n° 2, p. 117-125, 2004, doi: 10.1002/cae.20006.
- [9] J. Zhang, W. Li, M. Li, G. Alici, et N.-T. Nguyen, « Particle inertial focusing and its mechanism in a serpentine microchannel », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, n° 2, p. 305-316, août 2014, doi: 10.1007/s10404-013-1306-6.
- [10] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, et I. Papautsky, « Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration », *Lab. Chip*, vol. 8, n° 11, p. 1906-1914, 2008, doi: 10.1039/B807107A.
- [11] L.-L. Fan, Y. Han, X.-K. He, L. Zhao, et J. Zhe, « High-throughput, single-stream microparticle focusing using a microchannel with asymmetric sharp corners », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, n° 4, p. 639-646, oct. 2014, doi: 10.1007/s10404-014-1344-8.
- [12] R. Aoki, M. Yamada, M. Yasuda, et M. Seki, « In-channel focusing of flowing microparticles utilizing hydrodynamic filtration », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 6, n° 4, p. 571, août 2008, doi: 10.1007/s10404-008-0334-0.
- [13] M. Yamada et M. Seki, « Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics », *Lab. Chip*, vol. 5, n° 11, p. 1233-1239, 2005, doi: 10.1039/B509386D.
- [14] U. Kim, J. Qian, S. A. Kenrick, P. S. Daugherty, et H. T. Soh, « Multitarget dielectrophoresis activated cell sorter », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 22, p. 8656-8661, 2008.
- [15] K. Lee, S. S. Kim, et K. Lee, « Adjustable Particle Separation in Pinched Flow Fractionation with Optical Force », juin 2010.
- [16] G.-B. Lee, C.-C. Chang, S.-B. Huang, et R.-J. Yang, « The hydrodynamic focusing effect inside rectangular microchannels », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 16, n° 5, p. 1024-1032, avr. 2006, doi: 10.1088/0960-1317/16/5/020.
- [17] X. B. Wang, Y. Huang, X. Wang, F. F. Becker, et P. R. Gascoyne, « Dielectrophoretic manipulation of cells with spiral electrodes », *Biophys. J.*, vol. 72, n° 4, p. 1887-1899, avr. 1997, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78834-9.
- [18] C.-P. Jen et T.-W. Chen, « Selective trapping of live and dead mammalian cells using insulator-based dielectrophoresis within open-top microstructures », *Biomed. Microdevices*, vol. 11, n° 3, p. 597-607, juin 2009, doi: 10.1007/s10544-008-9269-1.



[19] T. Lannin *et al.*, « Automated electrorotation shows electrokinetic separation of pancreatic cancer cells is robust to acquired chemotherapy resistance, serum starvation, and EMT », *Biomicrofluidics*, vol. 10, n° 6, p. 064109, nov. 2016, doi: 10.1063/1.4964929.

[20] L. Wu, L.-Y. Lanry Yung, et K.-M. Lim, « Dielectrophoretic capture voltage spectrum for measurement of dielectric properties and separation of cancer cells », *Biomicrofluidics*, vol. 6, n° 1, p. 014113, mars 2012, doi: 10.1063/1.3690470.



Conclusion et Perspectives



I. Conclusion

Lors des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, nous avons exploité un système de caractérisation cellulaire basé sur la diélectrophorèse haute fréquence pour évaluer le potentiel de transformation oncogénique d'EVs. Ce biocapteur a permis d'identifier le phénotype indifférencié de la sous-population de cellules souches cancéreuses en interrogeant les propriétés diélectriques du contenu intracellulaire. En cherchant à exploiter les spécificités de la signature UHF-DEP obtenue, nous avons développé et optimisé un laboratoire-sur-puce microfluidique pour trier et isoler la population cellulaire ciblée à l'aide d'un champ électrique Ultra Haute Fréquence.

Au cours de notre étude bibliographique, nous avons souligné les enjeux et les difficultés actuelles des biologistes pour détecter la sous-population des cellules souches cancéreuses au sein d'une tumeur. En effet, en raison de leur quiescence et de leur caractère indifférencié, elles échappent aux traitements conventionnels qui ciblent les cellules avec un taux de division élevé, pouvant ainsi entraîner une rechute de la tumeur. Nous avons mis en avant la méthode de la diélectrophorèse qui pourrait permettre d'apporter une solution pour pallier à l'absence sur le marché d'immuno-marqueurs véritablement spécifiques aux CSCs. En effet, une caractérisation cellulaire par DEP pourrait contourner ces problèmes en étant une technique alternative sans marquage. Reposant sur la génération d'une force d'électromanipulation créée par un champ électrique externe dans un environnement microfluidique, elle permet de réduire le coût et le temps d'analyse avec la possibilité de parallélisation et de réduction du volume d'échantillon puisque seuls des volumes de suspensions cellulaires de quelques μL sont nécessaires. Les approches conventionnelles pour caractériser les CSCs sont l'immunofluorescence couplée à la cytométrie en flux ou bien à l'analyse de protéines de référence. Ces différentes méthodologies nécessitent un marquage immunologique systématique pour identifier les CSCs et un panel de plusieurs biomarqueurs est généralement nécessaire, nécessitant donc de multiples étapes de marquage. En effet, ces méthodologies prennent au préalable du temps de préparation des échantillons et peuvent rapidement devenir couteuses vis à vis de l'achat des kits d'anticorps génériques pour les CSCs. En revanche, la caractérisation par DEP ne requière que de mettre les cellules en suspension dans le milieu adapté DEP et la mesure de la signature électromagnétique ne nécessite aucune coloration ni greffage d'un agent de contraste ce qui peut drastiquement réduire le coût global de l'analyse. Elle prévient de plus des éventuels dommages cellulaires en limitant les contraintes mécaniques que subissent les cellules lors de l'analyse.



La caractérisation DEP permet d'obtenir deux signatures électromagnétiques : une à basse fréquence (10kHz – 1MHz) appelée f_{x01} et une à haute fréquence (50MHz – 1GHz) appelée f_{x02} . Nous avons vu que théoriquement, à basse fréquence, l'onde électromagnétique est plus sensible à la forme de la cellule, à sa morphologie et aux propriétés de la membrane cellulaire. En augmentant la fréquence du champ électrique, l'onde électromagnétique peut interagir et sonder le contenu intracellulaire. Elle peut ainsi être utilisée pour reconnaître un phénotype indifférencié. Nous avons ainsi pu évaluer les capacités de discrimination de notre dispositif microfluidique dans le cas de la lignée cellulaire de cancer colorectal SW620. Ces cellules ont été cultivées dans deux conditions distinctes : l'une induisant une différenciation et la seconde sélectionnant très majoritairement les cellules indifférenciées. Nos résultats suggèrent que l'expression des marqueurs biologiques des CSCs et la mesure de la fréquence de transition f_{x02} sont étroitement liées. Par conséquent, l'UHF-DEP apparaît être une approche discriminante significative et pertinente grâce à sa capacité à sonder le contenu interne de la cellule et à détecter les caractéristiques diélectriques des cellules souches cancéreuses.

Par la suite, nous avons pu évaluer le pouvoir de transformation oncogénique d'oncosomes sécrétés par les cellules cancéreuses différenciées et indifférenciées de lignées commerciales et de cultures primaires issues de patients. Seule, l'incubation d'EVs sécrétées par des CSCs avec des cellules cancéreuses différenciées a révélé une diminution des fréquences de transition, corrélée à un changement phénotypique. Certaines cellules se sont avérées être plus sensibles que d'autres à l'exposition aux EVs des CSCs, montrant le pouvoir oncogénique des nano vésicules sécrétées par les lignées commerciales indifférenciées. Concernant les cultures primaires, le phénomène semble moins marqué et les analyses biologiques n'ont rien pu révéler encore à ce jour de probant. Cependant, ces premières expériences pré-cliniques démontrent un intérêt à poursuivre les investigations en testant d'autres protocoles d'incubation par exemple ou en recherchant la modification d'autres marqueurs. La problématique tout au long du manuscrit a été et est quels sont les mécanismes biologiques et de signalisations cellulaires impliqués dans le changement fréquentiel ? Avec les outils biologiques qui ont été utilisés, de nombreuses zones d'ombres demeurent.

Enfin, nous avons exploité les différences de signatures UHF-DEP à partir d'un autre laboratoire-sur-puce, de type cytomètre électromagnétique en flux, pour trier une population hétérogène de cellules cancéreuses selon leur degré d'indifférenciation et leur degré d'agressivité. Pour ce faire, nous avons développé et optimisé le réseau microfluidique de ce cytomètre diélectrophorétique. Grâce à une étude paramétrique, nous avons conçu un module de focalisation cellulaire par flux pincé en optimisant astucieusement sa géométrie. Nous avons également dimensionné de manière adéquate le microsystème afin de pouvoir collecter et analyser les sous populations de cellules triées à la sortie du



cytomètre sans que ces dernières aient besoin d'être pressurisées. Nous avons réalisé plusieurs prototypes à partir d'un procédé de fabrication que nous avons développé en s'appuyant sur la technologie de photolithographie UV par écriture laser.

Après avoir validé expérimentalement le bon fonctionnement du module de focalisation cellulaire du réseau microfluidique, nous avons testé l'influence de la puissance du champ électrique sur l'efficacité de déviation du cytomètre sur les cellules d'une culture de lignée cellulaire SW620 NM. Nous avons pu collecter pour la première fois les cellules de chaque sortie à la fin du tri afin de les compter et de vérifier leur bonne viabilité. Notre cytomètre diélectrophorétique s'est avéré non destructif rendant possible à l'avenir de mener plusieurs analyses biologiques complémentaires sur les cellules triées ou de les remettre en culture. Par la suite, nous avons réalisé un premier test de tri et d'isolation d'une population de SW620 DM au phénotype de CSCs mélangées à des cellules SW620 NM différenciées. Nous avons déterminé une plage de fréquences optimale afin d'isoler de manière sélective la sous-population des CSCs.

Le cytomètre s'est avéré fonctionnel, il a permis de séparer efficacement en deux sous-populations une suspension cellulaire sur la base de la différence de leurs facteurs de Clausius-Mossotti à une fréquence donnée. Les résultats préliminaires obtenus témoignent d'une première preuve de concept de tri et d'isolation de la sous-population des cellules souches cancéreuses par le cytomètre électromagnétique.

Néanmoins, quelques optimisations pourraient lui être apportées pour faciliter son bon fonctionnement en routine. En effet, au cours des expériences menées avec le cytomètre DEP, il s'est avéré que certaines cellules adhéraient sur les électrodes lorsque le champ électrique était activé. En effet, lors d'expériences menées avec le cytomètre durant les tests de tri cellulaire, les cellules en suspension sont généralement entraînées par le fluide et n'ont pas le temps d'adhérer au substrat. Cependant, il a été remarqué que lorsque le champ électrique est allumé, des phénomènes d'adhésion et d'agglomération sont observés sur des surfaces du substrat au voisinage des électrodes même à très haute fréquence quand les cellules sont en nDEP. On peut s'interroger sur les effets de charges électrostatiques de surfaces aux interfaces et sur de potentielles stimulations surfaciques. Lorsque ces cellules s'arrêtent sur le substrat de silicium le long de la pente de l'électrode malgré la poussée continue exercée par le flux, on observe un effet boule de neige : les cellules adhèrent entre elles (Figure IV.1). Cela crée des amas et vient perturber le tri en empêchant les cellules de suivre correctement la pente des électrodes. Nos résultats de séparation et d'isolation deviennent faussés.



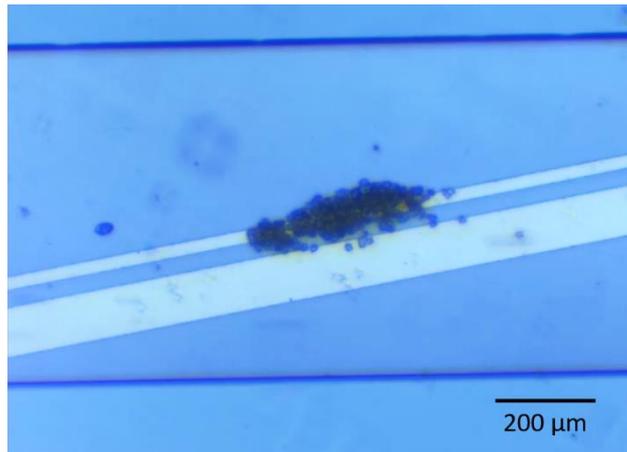


Figure IV.9 : Cellules adhérentes sur les électrodes formant un amas

Il a été montré dans [1] qu'il est possible de faire de la culture cellulaire avec un substrat de silicium sur lequel les cellules peuvent se fixer. Cependant, il est possible de faire un traitement de surface en recouvrant la puce électronique d'une couche antiadhésive qui repousse les cellules. Une des pistes possibles de traitement de surface serait la poly(L-lysine) – grafted – poly(éthylène glycol) (PLL-g-PEG), qui est très utilisé pour limiter l'adhésion cellulaire dans certaines zones dans le cas de micropatterning [2]–[4]. Le PLL-g-PEG est un copolymère greffé avec un squelette de poly(L-lysine) et des chaînes latérales de poly(éthylène glycol). Le squelette de PLL interagit de manière électrostatique avec le substrat, tandis que les chaînes latérales s'étendent à partir de la surface et forment une brosse polymère très dense. Les revêtements qui en résultent offrent un faible niveau de liaison non spécifique des protéines et des macromolécules.

II. Perspectives

II.1. Création d'une banque de signatures électromagnétiques

Au cours des travaux de cette thèse, le biocapteur électromagnétique a principalement été utilisé pour identifier le phénotype différencié ou indifférencié au sein d'une population de cellules cancéreuses du côlon. Ce dispositif basé sur l'UHF-DEP exploite les différences de propriétés diélectrophorétiques du contenu intracellulaire entre cellules présentant des différences de phénotypes. Mais il est également possible de tirer profit de ce phénomène pour d'autres applications que celle de la détection de CSCs.

En effet, au cours de nos recherches nous avons également eu l'opportunité de caractériser de nombreuses lignées cellulaires, modèles d'autres pathologies que le CCR, avec le capteur quadripolaire.



L'ensemble des signatures électromagnétiques ainsi mesurées sur des lignées commerciales peuvent faire l'objet de la constitution d'une banque de données préliminaires de signatures de références. Ainsi, quelques lignées caractérisées durant cette thèse et les travaux de post doctorat de Rémi Manczak sont répertoriées dans le Tableau IV.1 avec leurs fréquences de transition respectives résumées dans la Figure IV.2.

Tableau IV.1 : Description des lignées tumorales commerciales caractérisées ainsi que la valeur médiane de la fréquence de transition UHF

| <i>Lignée tumorale</i> | Description | Valeur médiane de la f_{x02} |
|------------------------|---|--|
| <i>MEC-1</i> | Lignée dérivée à partir d'une leucémie lymphocytaire chronique B | 155 MHz |
| <i>OCI-LY3</i> | Lignée de lymphocytes B dérivée de la moelle osseuse d'un lymphome adulte | 378 MHz |
| <i>THP-1</i> | Lignée de monocytes dérivée d'une leucémie infantile | 226 MHz |
| <i>Jurkat</i> | Lignée de lymphocytes T dérivée d'une leucémie infantile | 370 MHz |
| <i>A549</i> | Lignée dérivée d'un cancer du poumon adulte | 101 MHz |
| <i>H1975</i> | Lignée dérivée d'un cancer du poumon adulte (non-fumeur) | 157 MHz |
| <i>SW480</i> | Lignée dérivée d'un cancer du côlon adulte de stade II. | 236 MHz |
| <i>SW620</i> | Lignée dérivée de la métastase du ganglion lymphatique de la même tumeur dont SW480 a été dérivée | 314 MHz |
| <i>LN18</i> | Lignée d'un gliome dérivée d'une tumeur cérébrale adulte | 98 MHz |
| <i>U87-MG</i> | Lignée de glioblastome dérivée d'une tumeur cérébrale adulte de stade IV | 111 MHz |
| <i>D341</i> | Lignée de médulloblastome dérivée d'une tumeur cérébrale infantile | 216 MHz |
| <i>D283</i> | Lignée de médulloblastome dérivée de la métastase d'une tumeur cérébrale infantile | 126 MHz |
| <i>DAOY</i> | Lignée de médulloblastome dérivée d'une tumeur cérébrale infantile | 91 MHz |



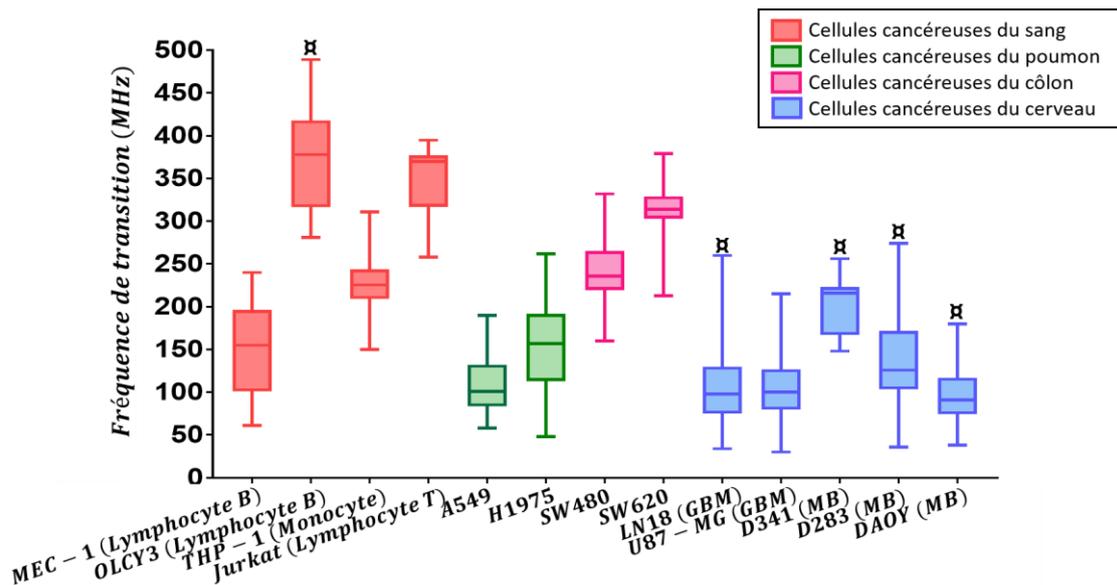


Figure IV.2 : Banque de données des signatures électromagnétiques pour différentes lignées tumorales commerciales (x indique que les données proviennent de travaux de Rémi Manczak; GBM : glioblastome ; MB : médulloblastome)

Dans la Figure IV.2, les lignées de cellules tumorales sont représentatives de divers types de tumeurs (cérébrale, pulmonaire, colorectale et leucémie). Il est difficile pour le moment d'expliquer les différences que l'on voit apparaître entre les signatures électromagnétiques établies.

De plus, dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons fait des tests pré-cliniques avec différentes campagnes d'expérimentations menées avec les cellules de cultures primaires. Nous avons ainsi eu l'opportunité de caractériser différentes populations provenant de tumeurs de plusieurs patients atteints de cancer colorectal à différents stades, dont des tumeurs métastatiques du foie, pour lesquelles il est établi que la tumeur primaire est d'origine du côlon.



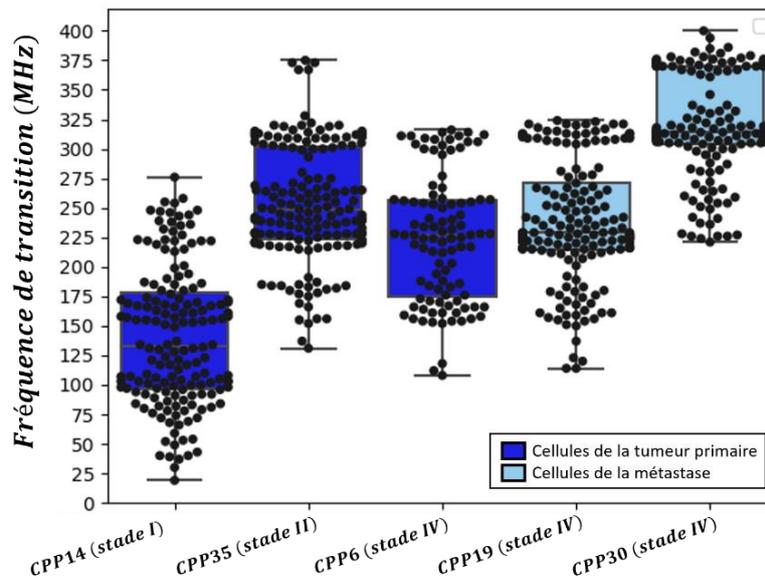


Figure IV.3 : Banque de données des signatures électromagnétiques pour les patients atteints d’une tumeur colorectale de différents stades (en bleu foncé) ou de métastases du foie (en bleu clair)

Il serait intéressant de poursuivre ces investigations pour étendre la banque de données à un plus grand nombre de lignées. Les différences dans les signatures électromagnétiques mesurées par l’outil de diagnostic signifie a priori des différences de propriétés diélectriques au niveau du contenu intracellulaire.

II.2. Le biocapteur comme outil d’analyse biologique en single-cell

Au cours de nos recherches en complément des expériences présentées dans le Chapitre II, nous avons voulu également évaluer le pouvoir transformant des EVs sécrétées par des cellules de la culture primaire de CPP6 DM (CSCs de stade IV) sur les CPP14 NM différenciées (cellules de stade I). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure IV.4.

Tableau IV.2 : Synthèse du plan d’expérience

| Type de cellules | CPP14 NM | CPP6 NM | CPP6 DM |
|-------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| Rôle expérimental | Cellules cibles | Cellules sécrétrices d’EVs | Cellules sécrétrices d’EVs |



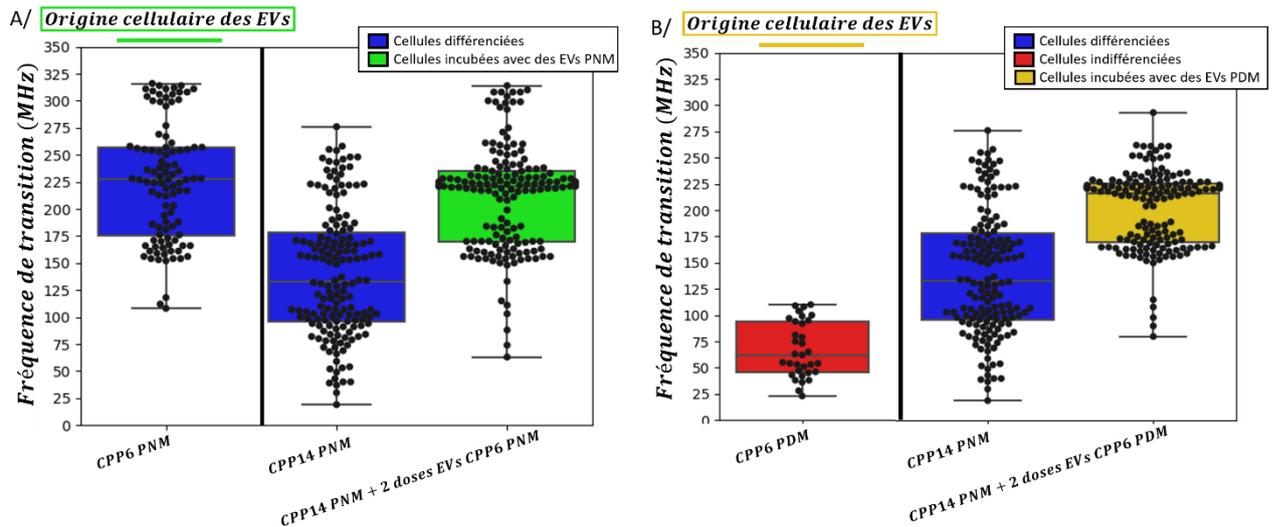


Figure IV.4 : Représentation graphique par box plot des fréquences de transition mesurées des cellules CPP14 NM incubées avec des EVs sécrétées par (A) des CPP6 NM et (B) par des CPP6 DM. Les cellules sont exposées pendant 72h avec deux doses d'EVs.

A la première observation, on peut remarquer qu'après exposition que ce soit aux EVs de CPP6 NM ou à ceux de CPP6 DM, la signature UHF-DEP des cellules CPP14 a été modifiée. Étonnamment, les valeurs médianes des signatures électromagnétiques ont augmenté dans les deux cas : 221MHz avec les EVs CPP6 NM et 217MHz avec les EVs CPP6 DM. En effet, on pouvait s'attendre à ce que comme pour les résultats obtenus dans le chapitre II, la signature électromagnétique des cellules incubées diminue. Au final, il y a très peu de cellules avec une fréquence de transition basse, à part quelques événements apparaissant à basse fréquence, inférieure à 150MHz, cependant ces occurrences peuvent être considérées comme peu représentatives.

Le Tableau IV.3 résume la répartition des fréquences de transition mesurées pour chaque condition d'exposition aux EVs sécrétées par les CPP6 NM/DM selon les zones suivantes :

- Cellules CPP14 NM basse fréquence : un premier groupe de signature UHF-DEP se détache à basse fréquence inférieure à 140MHz
- Cellules CPP14 NM haute fréquence : un deuxième groupe de cellules ayant leur fréquence de transition comprise entre 140MHz et 280MHz.
- Cellules différenciées haute fréquence : lorsque les fréquences de transition mesurées sont supérieures à 280MHz.



Tableau IV.3 : Répartition des fréquences de transition mesurées selon les zones prédéfinies (Cellules CPP14 NM basse fréquence, cellules CPP14 NM haute fréquence, cellules différenciées haute fréquence) en fonction des différentes expositions des EVs de CPP6 NM/DM

| | CPP6 NM | CPP6 DM | CPP14 NM | EVs NM | EVs DM |
|-------------------------------------|---------|---------|----------|--------|--------|
| $f < 140\text{MHz}$ | 3% | 100% | 52,5% | 4,3% | 3,2% |
| $140\text{MHz} < f < 280\text{MHz}$ | 78% | 0% | 47,5% | 87% | 96,2% |
| $280\text{MHz} < f$ | 19% | 0% | 0% | 8,7% | 0,6% |

La répartition des fréquences de transition est globalement la même quel que soit le type d'EVs. Quasiment toute la population des cellules incubées avec les EVs se trouve dans la gamme de fréquences intermédiaires entre 140MHz et 280MHz.

On peut en conclure que les EVs sécrétées par des cellules de cultures primaires d'un stade métastatique ont tout de même un impact global majeur sur la signature des cellules, en induisant des modifications de la valeur médiane et de la répartition des fréquences de transition mesurées, mais de manière différente aux tendances que nous avons pu observer jusqu'alors. Ces changements des signatures électromagnétiques suggèrent tout de même une modification du milieu interne de ces cellules. L'exposition aux EVs issues de cellules cancéreuses d'un stade métastatique semblerait donc avoir un impact sur les cellules cancéreuses différenciées d'un stade précoce et être capables de potentiellement modifier les caractéristiques diélectriques de leur contenu cellulaire. Cependant, nous avons pu nous apercevoir que quel que soit le phénotype biologique des cellules sécrétant les EVs (différenciées (NM) vs indifférenciées (DM)), les médianes de la signature UHF-DEP des cellules exposées semblent très similaires tout comme la distribution des fréquences de transition.

Les résultats obtenus sur l'exposition d'une culture primaire aux EVs des cellules d'une autre culture primaire (issue de la tumeur d'un autre patient) diffèrent des résultats que nous avons obtenus à partir des lignées commerciales SW620 et SW480 toutes deux issues du même patient mais à un an d'intervalle. En effet, on observe pour les lignées SW620 et SW480 uniquement un changement dans la signature électromagnétique dans le cas où les EVs incubées étaient sécrétées par des CSCs. L'origine différente de patient entre CPP14 et CPP6, pourrait induire d'autres phénomènes biologiques non contrôlés et par conséquent un biais dans l'interprétation des résultats. Il serait intéressant de mener des tests complémentaires, avec d'autres cultures primaires pour voir si ce phénomène est reproductible. Une analyse biologique poussée des changements potentiels induits au niveau des gènes et protéines seraient également très instructive.



Au cours de nos travaux de thèse, afin de corrélérer l'évolution des signatures électromagnétiques à des phénomènes biologiques, nous avons employé l'analyse comparative du transcriptome pour étudier l'expression des immuno-marqueurs souches. Tandis que notre biocapteur fait de l'analyse en single-cell, c'est-à-dire que la caractérisation se fait cellule par cellule, les niveaux d'expression des marqueurs biologiques sont mesurés à l'échelle de la population entière souvent hétérogène et donc le résultat obtenu est moyenné.

Or nous avons constaté cette limitation d'une approche d'analyse biologique globale des populations tumorales. En effet, nous avons vu lors des expériences sur les cultures primaires dans le Chapitre II (cf Figure II.26), que le capteur quadripolaire a détecté quelques événements à basse fréquence alors que le niveau des marqueurs de CSCs n'ont rien révélé. Cependant il existe des méthodes d'analyses de séquençage de l'ADN et de l'ARN de cellules uniques [5]. Ces techniques sont très coûteuses, 7 à 15 fois plus que des méthodes classiques⁹ en raison de l'augmentation du nombre de réactifs nécessaires et du temps d'utilisation des appareils et de lectures des séquençages. De ce fait, le coût élevé du séquençage en single-cell entrave son application clinique.

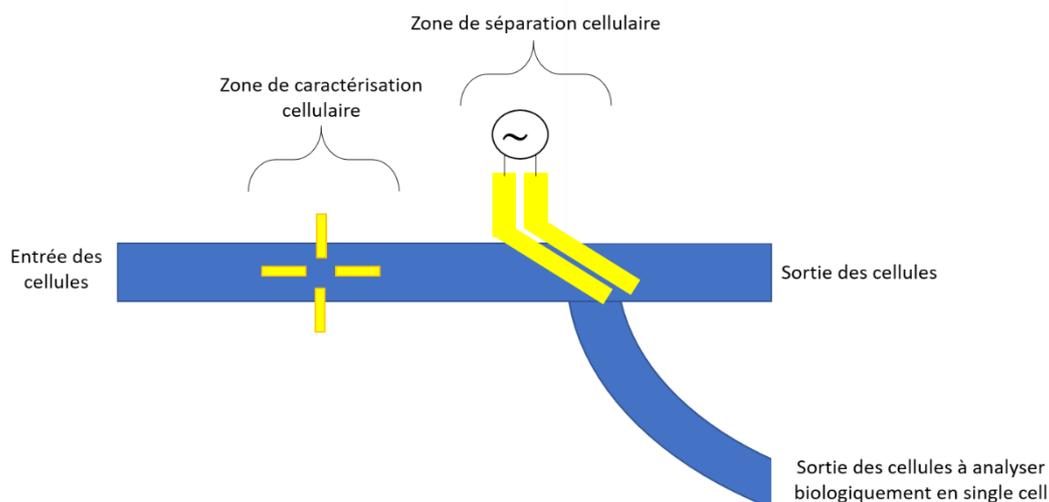


Figure IV.5 : Concept de système basé sur un principe de caractérisation et de séparation de cellules d'intérêt pour une future analyse biologique en single-cell

Notre outil de caractérisation peut mesurer individuellement les signatures électromagnétiques. Il pourrait servir d'aide à la décision pour les biologistes en sélectionnant les cellules d'intérêt. En améliorant le système quadripolaire existant, il serait possible de mesurer la fréquence de transition d'une cellule et si celle-ci est considérée comme « cible » alors elle sera déviée dans une sortie adaptée (Figure IV.5). La zone de caractérisation DEP fonctionne sur le même principe que celui décrit dans le Chapitre II. Lorsqu'une cellule caractérisée présente une fréquence de transition f_{x02} d'intérêt alors la

⁹ Source : <https://www.scdiscoveries.com/blog/knowledge/cost-of-single-cell-sequencing/>



vitesse du fluide est augmentée et le signal du champ de l'électrode de séparation est activé à fréquence élevée (environ 700 MHz) afin de dévier la cellule dans une autre sortie. Dans cette dernière, seront récupérées les cellules présentant un intérêt à poursuivre des analyses biologiques complémentaires et pouvant s'avérer plus coûteuses. Ce laboratoire-sur-puce pourrait ainsi sélectionner seulement certaines cellules pertinentes à étudier biologiquement.

II.3. A la recherche de la valeur du facteur de Clausius-Mossotti aux fréquences d'intérêt

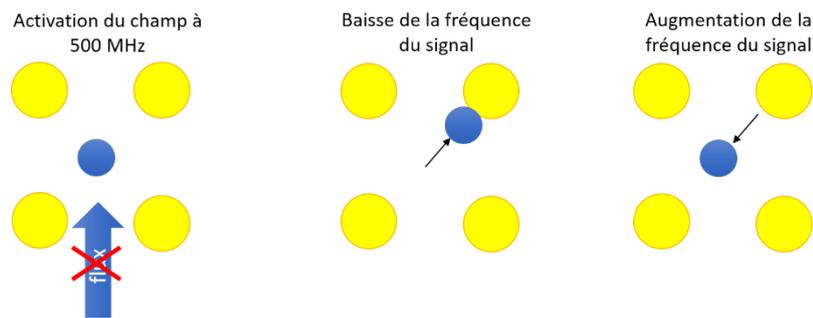
Au cours des travaux du Chapitre III, lors du design des électrodes de tri, nous avons mis en exergue le facteur de Clausius-Mossotti critique, déterminant le facteur CM minimal pour que la cellule puisse être déviée. Afin de choisir les fréquences de tri optimales et d'étudier l'impact de la puissance du signal DEP sur la déviation de cellule, nous avons dû faire des hypothèses et des approximations concernant la partie réelle du facteur CM de la population cellulaire SW620 NM et DM.

A une fréquence donnée, il serait utile de connaître la distribution des valeurs du facteur de Clausius-Mossotti d'une population. Nous pourrions alors estimer une gamme de f_{cm} critique à cibler pour que la population cellulaire soit déviée par le cytomètre. Il est possible d'exploiter de manière astucieuse la compétition de forces qu'il existe entre la force DEP et la force de trainée (générée par le flux). En effet dans [6], Voldman *et al* utilisent un système de quatre électrodes similaire au notre, si ce n'est que ses électrodes sont extrudées jusqu'à une hauteur de 50 μm . L'objectif recherché avec ces plots est de capturer des particules (dans [6] ce sont des billes de polystyrène), puis de mesurer l'efficacité de la force DEP à maintenir capturée une particule en fonction du débit fluidique.

Or pour nos applications, nous pourrions tirer profit de cette approche d'électromanipulation pour compléter nos mesures de la fréquence de transition f_{x02} . En effet, l'idée serait de pouvoir en premier lieu, déterminer la seconde fréquence de transition comme ce que nous avons fait jusqu'alors, puis pour la même cellule d'identifier la partie réelle de son facteur de Clausius-Mossotti à une fréquence donnée où la cellule réagirait en mode nDEP, par exemple à 500 MHz (Figure IV.6). Pour ce faire, le champ électrique est activé avec un signal de fréquence de 500 MHz polarisant le quadripôle, de telle sorte que la cellule biologique soit repoussée au centre des électrodes. Puis, un flux est progressivement rétabli dans le canal par palier jusqu'à ce que la cellule s'échappe du système de caractérisation. A ce moment-là, il suffit de mesurer la vitesse du flux correspondante.



1/ Caractérisation de la fréquence de transition f_{x02}



2/ Caractérisation de la vitesse de flux de libération pour déterminer $Re[f_{CM}]$ à 700 MHz

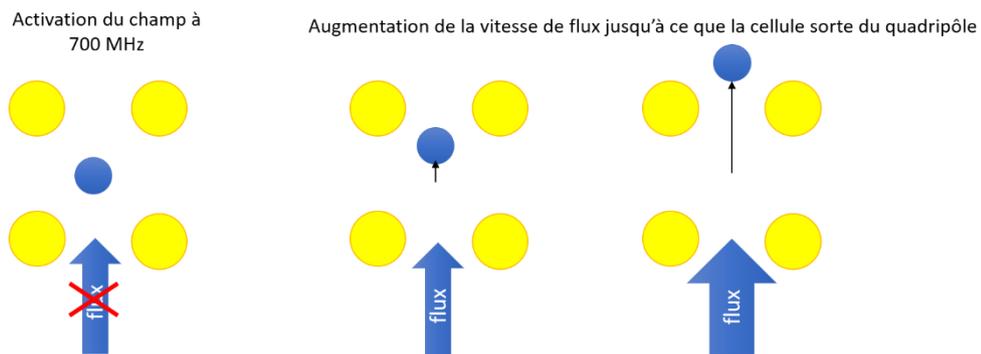


Figure IV.6 : Principe de fonctionnement d'un système de caractérisation cellulaire 2-en-1

Le moment où la cellule commence à se déplacer dans le sens du flux, correspond alors juste à la rupture de la condition d'équilibre pour laquelle la force DEP et la force de trainée s'annulent. En effet, sur la Figure IV.7, on note que lorsque la force DEP est supérieure à la force de trainée, la cellule reste bien piégée au centre du le quadripôle (cage électrique). Mais pour un flux donné et constant, dès lors que l'on baisse la tension et donc l'intensité du champ électrique, la force DEP devient moins intense et la cellule s'échappe du système. Cette modélisation a été réalisée sous COMSOL Multiphysics à l'aide du module « particle tracing » permettant de prédire le déplacement de la cellule dans le quadripôle. Le même principe s'applique en maintenant la force DEP constante mais en faisant varier la vitesse du flux dans le canal.



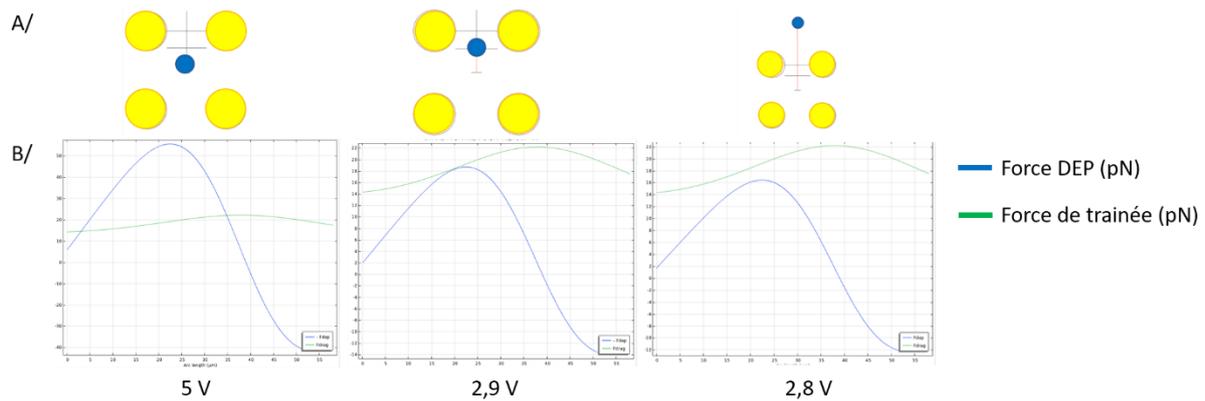


Figure IV.7 : Simulation numérique de la compétition des forces DEP et de trainée sur le piégeage d'une cellule biologique en fonction de la tension appliquée aux électrodes. (A) Déplacement de la cellule au sein du quadripôle, (B) Norme des forces DEP et de trainée sur l'axe de déplacement possible de la cellule

L'équilibre entre les deux forces nous permet d'écrire la formule suivante d'après les équations (I.18) et (III.19) :

$$\text{Re}[f_{cm}] = \frac{3\mu U_f}{\epsilon_m r \nabla E^2} \quad (\text{IV.1})$$

Ainsi, en connaissant la vitesse du fluide lorsque la cellule s'échappe du quadripôle, il est possible d'estimer la valeur du facteur de Clausius-Mossotti à une fréquence donnée. La connaissance du facteur CM de la population cellulaire d'intérêt permettrait de mieux calibrer le f_{cm} critique lié au cytomètre et de déterminer les paramètres de vitesse du fluide, de puissance du signal DEP et de fréquence de tri.

III. Références bibliographiques

- [1] M. K. Bhuyan, J. I. Rodriguez-Devora, K. Fraser, et T.-L. B. Tseng, « Silicon substrate as a novel cell culture device for myoblast cells », *J. Biomed. Sci.*, vol. 21, n° 1, p. 47, mai 2014, doi: 10.1186/1423-0127-21-47.
- [2] Q. Tseng *et al.*, « Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell–cell junction positioning », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, n° 5, p. 1506-1511, janv. 2012, doi: 10.1073/pnas.1106377109.
- [3] Q. Tseng *et al.*, « A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels », *Lab. Chip*, vol. 11, n° 13, p. 2231-2240, juin 2011, doi: 10.1039/C0LC00641F.
- [4] A. Azioune, N. Carpi, Q. Tseng, M. Théry, et M. Piel, « Protein Micropatterns », in *Methods in Cell Biology*, vol. 97, Elsevier, 2010, p. 133-146. doi: 10.1016/S0091-679X(10)97008-8.
- [5] Wang, Jian, et Yuanlin Song. « Single cell sequencing: a distinct new field ». *Clinical and Translational Medicine* 6, n° 1 (20 février 2017): 10. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0139-4>.
- [6] J. Voldman, M. Toner, M. L. Gray, et M. A. Schmidt, « Design and analysis of extruded quadrupolar dielectrophoretic traps », *J. Electrostat.*, vol. 57, n° 1, p. 69-90, janv. 2003, doi: 10.1016/S0304-3886(02)00120-1.



Annexes

| | |
|--|-----|
| Annexe 1. Répétabilité des campagnes de mesures des fréquences de transition | 219 |
| Annexe 1.1. Répétabilité au sein d'une même campagne | 219 |
| Annexe 1.2. Répétabilité sur plusieurs campagnes | 219 |
| Annexe 2. Agrandissement des fenêtres du logiciel python..... | 220 |



Annexe 1. Répétabilité des campagnes de mesures des fréquences de transition

Dans cette annexe, sont présentés les preuves de la répétabilité de la méthode de mesure des fréquences de transition des cellules.

Annexe 1.1. Répétabilité au sein d'une même campagne

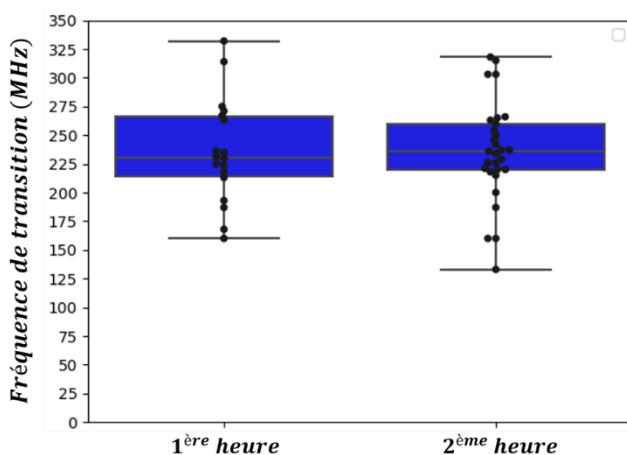
Dans un premier temps, lors d'une même campagne de mesure de la seconde fréquence de transition, nous caractérisons les cellules cancéreuses SW480 NM pendant 2 heures. Ensuite nous comparons les f_{x02} obtenues pendant la première heure et la deuxième heure afin d'éliminer les biais sur la viabilité des cellules dans les expériences de caractérisation électromagnétique.

Dans la figure présentée ci-dessous, les fréquences de transition mesurées pendant la première et la deuxième heure sont globalement les mêmes, démontrant ainsi que le milieu DEP permet de maintenir une bonne viabilité pendant le temps de la caractérisation. Cela ne perturbe pas les valeurs des fréquences de transition obtenues.

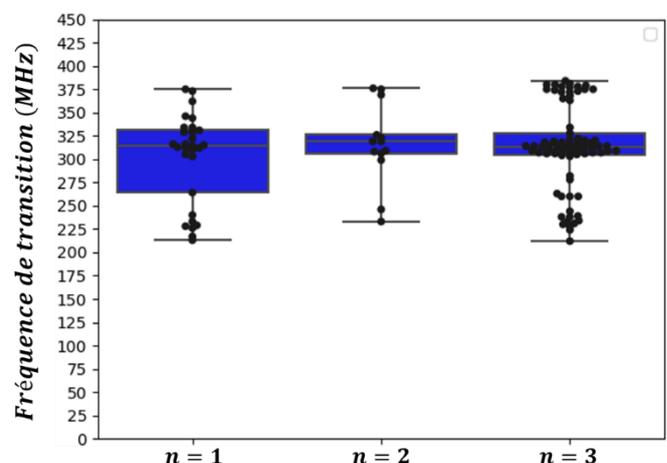
Annexe 1.2. Répétabilité sur plusieurs campagnes

Dans un deuxième temps, afin de consolider les données et de prendre en compte l'hétérogénéité naturelle au sein d'une population cellulaire, les mesures de la signature électromagnétique sont réalisées en triplicat. Nous caractérisons les cellules cancéreuses SW620 NM avec trois campagnes de mesure. Ensuite nous comparons les f_{x02} obtenues à chaque expérience.

Dans la figure présentée ci-dessous, les fréquences de transition mesurées pendant chaque campagne sont globalement les mêmes à quelques exceptions près, permettant ainsi d'intégrer l'hétérogénéité des cellules.



Annexe 1.1



Annexe 1.2



Annexe 2. Agrandissement des fenêtres du logiciel python

Menu Principal

Calcul canal microfluidique | Calcul rapide | Paramètres | Quitter

Design de canaux microfluidiques

Géométrie du système

Suivant > | Aide

Nombre de capillaires : 0

Nombre d entrées : 0

Nombre de sorties : 0

Les sorties sont liées par un seul et même capillaire

Exemple de circuit :



Nombre de capillaires : 3

Nombre d entrées : 2

Nombre de sorties : 4

Les sorties sont liées par un seul et même capillaire

Equilibrage des sorties

Calculer | Suivant > | Aide

Capillaire sortie n° 1

Largeur section 0.0 μm

Hauteur section 0.0 μm

Longueur 0.0 mm

Capillaire sortie n° 2

Diamètre section 0.0 μm

Longueur 0.0 mm

Résistance microfluidique

0.0 e+12 Pa.s/m³

Sorties équilibrées ?

Entrées et résultats

Calculer résistances | Afficher résultats | Equilibrer les sorties | Nouvelle saisie | Retour menu principal | Quitter | Aide

Entrée des cellules

Largeur section 0.0 μm

Hauteur section 0.0 μm

Longueur 0.0 mm

Résistance microfluidique

0.0 e+12 Pa.s/m³

Volume du canal 0 μL

Volume total 0 μL

Temps d arrivée des cellules dans le canal principal 0 s

Temps de traversée des cellules dans le canal principal 0 s

Vitesse moyenne des cellules dans le canal principal 0 mm/s

Force de trainée moyenne 0 pN

Temps de collecte dans la sortie n° 1 0.0 s

Temps de collecte dans la sortie n° 2 0.0 s

Nouveaux temps de collecte des cellules

Temps de collecte dans la sortie n° 1 0.0 s

Temps de collecte dans la sortie n° 2 0.0 s

Capillaire des cellules

Diamètre 0.0 μm

Longueur 0.0 mm

Débit 0.0 μL/min

Résistance microfluidique

0.0 e+12 Pa.s/m³

Différence de pression entre l entrée des cellules

Sortie n°1 0.0 mbar

Sortie n°2 0.0 mbar

Nouvelles pressions pour l'équilibrage des sorties

Différence de pression entre l entrée des cellules

Sortie n°1 0.0 mbar

Sortie n°2 0.0 mbar

Entrée buffer n° 1

Largeur section 0.0 μm

Hauteur section 0.0 μm

Longueur 0.0 mm

Résistance microfluidique

0.0 e+12 Pa.s/m³

Capillaire buffer n° 1

Diamètre 0.0 μm

Longueur 0.0 mm

Débit 0.0 μL/min

Résistance microfluidique

0.0 e+12 Pa.s/m³

Canal principal

Largeur section 1.0 μm

Hauteur section 1.0 μm

Longueur 0.0 mm



Canal unique avec zone d'observation au microscope

Calculer résistances | Afficher résultats | Nouvelle saisie | Retour menu principal | Quitter | Aide

| | | |
|-------------------|---|---------------|
| Largeur du canal | 0 | μm |
| Hauteur du canal | 0 | μm |
| Longueur du canal | 0 | mm |

| | | |
|--------------------------------------|---|--------------------------------|
| Résistance de la puce microfluidique | 0 | $\text{e}+12 \text{ Pa.s/m}^3$ |
| Résistance du système complet | 0 | $\text{e}+12 \text{ Pa.s/m}^3$ |

| | | |
|--------------------------------|---|---------------|
| Différence de pression | 0 | mbar |
| Volume du canal | 0 | μL |
| Volume du système | 0 | μL |
| Temps d'arrivée dans la zone | 0 | s |
| Temps de traversée de la zone | 0 | s |
| Temps de collecte des cellules | 0 | s |
| Vitesse moyenne des cellules | 0 | mm/s |
| Force de trainée moyenne | 0 | pN |

Dimension du capillaire en entrée

| | | |
|---------------------|---|-------------------|
| Diamètre capillaire | 0 | μm |
| Longueur capillaire | 0 | mm |
| Débit | 0 | $\mu\text{L/min}$ |

Dimension du capillaire en sortie

| | | |
|---------------------|---|---------------|
| Diamètre capillaire | 0 | μm |
| Longueur capillaire | 0 | mm |

Définition de la zone d'observation

| | | |
|---------------------|-----|----|
| Longueur de la zone | 3.0 | mm |
| Distance L_entrée | 0 | mm |
| Distance L_sortie | 3.0 | mm |

Calcul rapide de résistance microfluidique

Calculer | Retour menu principal | Quitter

Sélectionner la forme de la section du canal microfluidique : section rectangulaire section carrée section circulaire

Entrées de la géométrie du canal microfluidique

| | | |
|-------------------|-----|---------------|
| Largeur du canal | 0.0 | μm |
| Hauteur du canal | 0.0 | μm |
| Longueur du canal | 0.0 | mm |
| Diamètre du canal | 0.0 | μm |

Résistance microfluidique 0.0 $\text{e}+12 \text{ Pa.s/m}^3$

Modification des paramètres

Réinitialiser les paramètres | Retour menu principal | Quitter

| | | |
|-----------------------------------|-------|--------------------------------|
| Viscosité dynamique | 0.001 | Pa.s |
| Rayon de la cellule | 7.5 | μm |
| Précision décimale | 2 | |
| Précision équilibrage des sorties | 1 | $\text{e}+11 \text{ Pa.s/m}^3$ |



Productions scientifiques

- **Publication dans des revues internationales à comité de lecture :**

Lambert, E.; Manczak, R.; Barthout, E.; Saada, S.; Porcù, E.; Maule, F.; Bessette, B.; Viola, G.; Persano, L.; Dalmay, C.; Lalloué, F.; Pothier, A. Microfluidic Lab-on-a-Chip Based on UHF-Dielectrophoresis for Stemness Phenotype Characterization and Discrimination among Glioblastoma Cells. *Biosensors* 2021, *11*, 388. <https://doi.org/10.3390/bios11100388>

- **Communications dans des congrès internationaux à comité de lecture :**

Elisa Lambert, Elodie Barthout, Rémi Manczak, Sofiane Sadaa, Barbara Bessette, Muriel Mathonnet, Fabrice Lalloué, Claire Dalmay, et Arnaud Pothier. « UHF-Dielectrophoresis Signatures as a Relevant Discriminant Electromagnetic Biomarker of Colorectal Cancer Stem Cells ». In *2022 IEEE/MTT-S International Microwave Symposium - IMS 2022*, 947-50, 2022. <https://doi.org/10.1109/IMS37962.2022.9865336>.

E. Lambert, E. Barthout, R. Manczak, S. Saada, M. Mathonet, B. Bessette, C. Dalmay, F. Lalloué, A. Pothier, "Ultra High Frequency Dielectrophoresis Manipulation to Monitor the Kinetics of Glioblastoma Cells Stemness Phenotype Acquirement," 2022 IEEE MTT-S International Microwave Biomedical Conference (IMBioC), 2022, pp. 19-21, doi: 10.1109/IMBioC52515.2022.9790189.

E. Lambert, E. Barthout, R. Manczak, S. Saada, L. Ikhlef, R. Formento, M. Verdier, C. Dalmay, B. Bessette, F. Lalloué, A. Pothier, "Biological Cell Characterization and Discrimination Based on UHF-Dielectrophoresis for Next Generation of Liquid Biopsy Analysis," 2021 IEEE MTT-S International Microwave and RF Conference (IMARC), 2021, pp. 1-4, doi: 10.1109/IMaRC49196.2021.9714586. Prix et distinction : Best Student Paper Award

Elisa Lambert, Elodie Barthout, Thomas Provent, Rémi Manczak, Sofiane Saada, Claire Dalmay, Barbara Bessette, Fabrice Lalloué, Arnaud Pothier, « Microfluidic device for high-frequency dielectrophoresis characterization and single-cell discrimination », Présentation Orale, TECH DAYS Online Conference: Microfluidics Solutions for Single-Cell Analysis, Apr 2021

- **Communications dans des congrès nationaux à comité de lecture :**

E. Lambert, E. Barthout, R. Manczak, S. Saada, L. Ikhlef, R. Formento, M. Verdier, B. Bessette, C. Dalmay, F. Lalloué, A. Pothier, « Caractérisation et Discrimination de Cellules Biologiques Cancéreuses par Diélectrophorèse Ultra-Haute Fréquence : Emergence de Nouveaux Outils Diagnostiques », Présentation Orale, 22^{èmes} Journées Nationales Microondes (JNM 2022), Juin 2022, Limoges

Elisa Lambert, Elodie Barthout, Thomas Provent, Rémi Manczak, Sofiane Saada, Claire Dalmay, Barbara Bessette, Fabrice Lalloué, Arnaud Pothier, « Microfluidic Lab-On-Chip for UHF-Dielectrophoresis Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells », Présentation Poster & Orale, 17^{èmes} Journées de l'Oncosphère Grand-Sud Ouest, Novembre 2021, Carcassonne.



Conclusion et Perspectives

A. Pothier, **E. Lambert**, R. Manczak, T. Provent, C. Dalmay, E. Barthout, S ; Saada, T. Sayde, B. Bessette, S. Battu, M. Mathonet, F. Lalloué, « Champs électromagnétiques et diélectrophorèse haute fréquence : des nouvelles approches permettant de discriminer et isoler les cellules souches cancéreuses », 1^{ères} journées de l'Oncosphère Nouvelle Aquitaine, Septembre 2021, La Rochelle

Arnaud Pothier, Rémi Manczak, Thomas Provent, **Elisa Lambert**, Elodie Barthout, Barbara Bessette, Claire Dalmay, Serge Battu, Fabrice Lalloué, « Discriminer et isoler les cellules souches cancéreuses et les cellules immatures d'une population hétérogène de glioblastomes grâce à des champs électromagnétiques et à la diélectrophorèse haute fréquence avec un laboratoire sur puce », Présentation Invitée, Workshop Organ-On-Chip & Cancer, Juin 2021



Développement de laboratoires sur puce à ondes électromagnétiques pour l'étude du potentiel cancérigène de nano vésicules

Résumé : Le terme d'agressivité tumorale englobe plusieurs notions telles que la capacité à proliférer rapidement, migrer et former des métastases mais aussi la résistance aux traitements conventionnels. Une des hypothèses pour expliquer les rechutes, réside dans la présence de cellules souches cancéreuses (CSCs) au sein du tissu tumoral. Leur phénotype indifférencié leur confère des capacités d'auto-renouveau, permettant de régénérer une tumeur. L'absence de biomarqueurs antigéniques spécifiques aux CSCs complexifie le problème. Ces travaux de thèse consistent à développer un outil de diagnostic novateur pour identifier et isoler ces cellules. L'approche proposée consiste à électromanipuler les cellules biologiques par diélectrophorèse à un système microfluidique implémenté sur un laboratoire-sur-puce. Nous exploitons spécifiquement des ondes hautes fréquences (supérieures à 50MHz), pouvant interroger les propriétés diélectriques internes de chaque cellule, reconnaître les caractéristiques du contenu intracellulaire des CSCs, et ainsi de mesurer la signature électromagnétique des cellules. L'existence de différences significatives entre les signatures de populations cellulaires différenciées et indifférenciées exerce les capacités discriminatoires de l'UHF-DEP et d'isolation d'une population cible grâce à un cytomètre électromagnétique.

Mots-clés : Diélectrophorèse Haute Fréquence, Dispositif Microfluidique de Diagnostic, Electromanipulation, Caractérisation et Tri Cellulaire, Cellules du Cancer Colorectal, Cellules Souches Cancéreuses, Signature Electromagnétique

Development of original electromagnetic wave microfluidic Lab-On-Chips for cancerous nanovesicle study: setting innovative diagnosis tools for liquid biopsy analysis in cancerology

Abstract : The tumor aggressiveness refers to several concepts such as the ability to proliferate rapidly, to migrate and to metastasize but also resistance to conventional treatments. One of the hypotheses to explain relapse is the presence of cancer stem cells (CSCs) within the tumor tissue. Their undifferentiated phenotype gives them self-renewal ability, allowing the regeneration of a tumor. However, there is a lack of specific immunofluorescent biomarkers to CSCs. This thesis work consists of developing a novel diagnostic tool to identify and isolate these cells. The proposed approach consists in electro-manipulating biological cells by dielectrophoresis with a microfluidic system implemented on a lab-on-a-chip. We specifically exploit high frequency range (above 50MHz), which can interrogate the internal dielectric properties of each cell, recognize the characteristics of the CSCs intracellular content, and thus measure the electromagnetic signature of the cells. The significant differences between the signatures of differentiated and undifferentiated cell populations highlight the discriminatory capabilities of UHF-DEP technic and the isolation of a target population using an electromagnetic cytometer.

Keywords : High Frequency Dielectrophoresis, Microfluidic Point-of-Care Device, Single Cell Manipulation, Biological Cell Characterization and Sorting, Colorectal Cancer Cells, Cancer Stem Cells, Electromagnetic Signature

