



HAL
open science

Développement d'un dispositif pour l'étude in vitro de l'électroporation de structures cellulaires 3D de type sphéroïdes

Pauline Bregigeon

► **To cite this version:**

Pauline Bregigeon. Développement d'un dispositif pour l'étude in vitro de l'électroporation de structures cellulaires 3D de type sphéroïdes. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2023. Français. NNT : 2023ECDL0039 . tel-04475363

HAL Id: tel-04475363

<https://theses.hal.science/tel-04475363>

Submitted on 23 Feb 2024

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.



N° d'ordre NNT : 2023ECDL0039

THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉCOLE CENTRALE DE LYON
membre de l'Université de Lyon

École Doctorale N°160
Électronique, Électrotechnique, Automatique (EEA)

Spécialité de doctorat : Ingénierie pour le Vivant

Soutenance prévue le 19/10/2023, par :

Pauline Bregigeon

Développement d'un dispositif pour l'étude in vitro de l'électroporation de structures cellulaires 3D de type sphéroïdes

Devant le jury composé de :

Marie-Pierre ROLS, Directrice de Recherche CNRS, IPBS Université de Toulouse Rapporteuse
Vincent SENEZ, Directeur de Recherche CNRS, CANTHER Université de Lille Rapporteur

Lluis MIR, Directeur de Recherche CNRS, METSY Université Paris-Saclay Président
Tomás GARCIA-SANCHEZ, Docteur, BERG Universitat Pompeu Fabra Examineur

Christian VOLLAIRE, Professeur, Ampère Directeur de thèse
Marie FRENEA-ROBIN, Professeure, Ampère Co-encadrante de thèse
Charlotte RIVIERE, Maître de Conférences, ILM Co-encadrante de thèse
Julien MARCHALOT, Maître de Conférences, Ampère Co-encadrant de thèse

Laure FRANQUEVILLE, Ingénieure de Recherche CNRS, Ampère Invitée
Frédéric PRAT, Professeur, AP-HP Invité

Dans la recherche de nouveaux traitements contre le cancer, l'électrochimiothérapie (ECT) est apparue comme une alternative solide à la chimiothérapie classique, permettant de réduire les doses administrées et donc les effets indésirables. Cette méthode est basée sur le phénomène d'électroporation réversible (EPN), qui se produit lorsque des champs électriques pulsés de paramètres contrôlés sont appliqués à des cellules, entraînant une augmentation temporaire de leur perméabilité. L'intérêt grandissant pour ce type de traitement nécessite de développer des modèles tumoraux *in vitro* fiables. Les agrégats de cellules appelés sphéroïdes ont été identifiés comme pertinents pour étudier l'EPN, car ils reproduisent plus fidèlement la structure d'un micro-tissu, dans lequel les cellules interagissent entre elles, que les cellules cultivées en 2D. Les techniques les plus couramment utilisées pour l'EPN de sphéroïdes consistent d'abord à les fabriquer, avec des méthodes ne permettant pas toujours d'obtenir une taille régulière, puis à les introduire dans une cuvette d'EPN ou à les électroporer un à un avec des électrodes portatives. Cependant, ces techniques peuvent les endommager et conduire à une répartition inhomogène du champ. Notre approche, basée sur l'utilisation d'un microsystème, renfermant un hydrogel microstructuré où sont cultivés plusieurs centaines de sphéroïdes, vise à pallier ces inconvénients car, à notre connaissance, il n'existe pas de solution permettant la culture de sphéroïdes de taille, forme et emplacement contrôlés, leur suivi et leur EPN au sein d'un dispositif unique.

Après avoir caractérisé le microsystème du point de vue électrique et fluide, une preuve de concept de son utilisation en tant que plateforme de test de traitement ECT a été réalisée, en utilisant de la bléomycine. Les résultats, obtenus par marquage fluorescent révélé par microscopie, sont cohérents avec la littérature car ils montrent une efficacité sur la mortalité des cellules en seulement quelques jours induite uniquement lorsqu'elle est associée à l'EPN.

Dans un deuxième temps, les travaux ont porté sur la complexification de l'environnement tumoral (TME) des sphéroïdes avec l'ajout de fibroblastes, dans le cadre du projet Inter-Carnot Impulse, axé sur l'amélioration du traitement du cancer du pancréas par des méthodes physiques. En effet, ce TME a une grande importance *in vivo* sur la résistance au traitement, surtout dans le cas du pancréas. Deux anticancéreux ont été comparés, la bléomycine et la gemcitabine, classiquement utilisée en chimiothérapie. Les résultats montrent que l'effet de cette dernière est augmenté lorsqu'elle est combinée à l'EPN. De plus, des résultats préliminaires semblent montrer un effet plus important du traitement sur les sphéroïdes sans fibroblastes, traduisant l'impact du TME, même si des développements sont nécessaires pour le rendre encore plus complexe.

En parallèle, l'adaptation du microsystème à la mesure d'impédance a été réalisée, ce qui permet un suivi des sphéroïdes sans observation, basé sur la caractérisation de leurs propriétés électriques. Cela devrait à terme permettre l'étude d'autres applications telles que l'électrotransfert de gènes, qui nécessite des électrodes faites de matériaux non transparents. Les résultats obtenus montrent la possibilité du suivi par bio-impédance de la croissance et de l'effet de molécules chimiques perméabilisant les cellules, comme première étape vers le suivi de l'effet de l'EPN, et ce dans un milieu de faible conductivité, afin d'améliorer la sensibilité de la mesure. Une perspective envisagée est la structuration des électrodes en réseaux de microélectrodes (MEA), afin de passer d'une mesure d'impédance globale à un suivi individuel de chaque sphéroïde du réseau.

In the search for new cancer treatments, electrochemotherapy (ECT) has emerged as a solid alternative to conventional chemotherapy, reducing doses and hence side effects. This method is based on the phenomenon of reversible electroporation (EPN), which occurs when pulsed electric fields of controlled parameters are applied to cells, causing a temporary increase of their permeability. The growing interest in this type of treatment requires the development of reliable in vitro tumor models. Cell aggregates called spheroids have been identified as relevant, as they more closely mimic the structure of a micro-tissue, in which cells interact with each other, than cells grown in 2D. The most commonly used techniques to electroporate spheroids are first to fabricate them, using methods that do not always allow to obtain regular size, and then to introduce them into an EPN cuvette or electroporate them one by one with hand-held electrodes. However, these techniques can damage them and lead to inhomogeneous field distribution. Our approach, based on the use of a microsystem containing a microstructured hydrogel in which several hundred of spheroids are cultured, aims to overcome these drawbacks, since to our knowledge, there is no solution enabling culture of spheroids of controlled size, shape and location, their monitoring and their EPN in a single device.

After characterizing the microsystem from an electrical and fluidic point of view, a proof of concept for its use as an ECT treatment test platform was carried out, using bleomycin. The results, obtained by fluorescent labeling revealed by microscopy, are consistent with the literature, showing efficacy on cell mortality induced within a few days only when EPN and bleomycin treatment are combined.

In a second phase, research work was focused on the complexification of the tumor environment (TME) of spheroids with the addition of fibroblast cells, as part of the Inter-Carnot Impulse project aimed at improving the treatment of pancreatic cancer using physical methods. Indeed, this TME has a major impact in vivo on the resistance to cancer treatment, especially in the case of pancreatic cancer. Two anticancer drugs were compared : bleomycin and gemcitabine, a classic chemotherapy agent. The results show that the efficacy of the latter is increased when combined with EPN. Moreover, preliminary results seem to show a greater effect of the treatment on spheroids without fibroblasts, reflecting the reproduction of the impact of the TME, although further developments are still needed to make it even denser.

At the same time, the microsystem has been adapted for impedance measurement, enabling the monitoring of spheroids without observation, while characterizing their electrical properties. This should enable the study of other applications such as electro-gene therapy, which requires the use of electrodes made of non-transparent materials. The results obtained show the possibility to monitor growth and the effect of chemical molecules permeabilizing cells with bio-impedance, as a first step towards monitoring the effect of EPN, using a low-conductivity medium, in order to improve measurement sensitivity. Future work will tackle the structuration of the electrodes with microelectrode arrays (MEA), in order to move from global impedance measurement to individual monitoring of each spheroid.

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est le résultat de trois belles années de recherche, qu'il n'aurait pas été possible de mener à bien sans l'aide de nombreuses personnes, que je souhaite remercier ici.

En premier lieu, je souhaite remercier très chaleureusement mon équipe encadrante, qui est pluridisciplinaire, à l'image de ce sujet de thèse, et qui a donc su m'épauler à la perfection durant ces années de recherche : mon directeur de thèse, Christian Vollaire qui, bien qu'éloigné quelque peu du sujet, a toujours su relever des points intéressants lors de nos réunions, et mes co-encadrants pour leur disponibilité, leur bienveillance et la pertinence de leurs conseils : Marie Frénéa-Robin et Julien Marchalot côté Ampère, et Charlotte Rivière côté ILM, toujours au rendez-vous en visio ou en présence malgré la distance (même faible) qui sépare les deux laboratoires.

Je tiens ensuite à adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie mes rapporteurs, Marie-Pierre Rols et Vincent Senez pour leur lecture attentive et tous leurs conseils, et également Tomas Garcia-Sanchez, examinateur, pour les échanges très intéressants pendant la soutenance. Enfin, un grand merci à Lluís Mir pour avoir accepté d'être président du jury et pour tous les échanges captivants au cours de cette soutenance et même avant lors des conférences où nous nous sommes croisés, c'était un honneur !

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans soutien financier, aussi je souhaite remercier le LabEx iMUST de l'Université de Lyon (ANR-10-LABX-0064), créé dans le cadre du Plan France 2030 mis en place par l'État et géré par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), pour l'accompagnement financier au cours de ces trois années.

Je souhaite également m'adresser à tous ceux qui ont contribué à ce travail, que je n'aurais jamais pu réaliser seule. Tout d'abord merci aux gestionnaires, Edith Bergeroux et Michelle Santini, pour leur soutien administratif dans les nombreuses commandes et conférences réalisées pendant cette thèse. Un grand merci à tous les stagiaires et étudiants qui ont participé à ce travail, Marianne Le Meur et Joséphine Pelenc, Théo Régny, Robin Arquizan, leur aide a été précieuse ! Qui dit travail pluridisciplinaire dit collaborations. Je tiens aussi à remercier Frédéric Prat pour avoir lancé le projet Impulse, qui a permis de donner une application plus concrète au microsystème développé, et avoir pris du temps pour relire le chapitre découlant de ces travaux, mais également Simon Lambert et Jean-Lynce Gnanago pour les caractérisations par IRM des sphéroïdes, Tony Gerges pour la caractérisation des moules et moulages en hydrogel, et Radoslaw Mazurczyk de la plateforme NanoLyon pour la caractérisation des électrodes en ITO. Merci également à Sébastien Cécillon pour son aide au Fablab notamment, entre plein d'autres choses, et à Olivier Fabrègue pour avoir codé le logiciel permettant de ne plus avoir à utiliser des disquettes pour l'enregistrement des données d'impédance !

Enfin je tiens à remercier tout particulièrement Laure Franqueville, pour m'avoir tout appris en culture cellulaire et avoir participé d'aussi près au déroulement de cette thèse, et également Théo Le Berre, qui a commencé comme stagiaire puis est venu s'ajouter à l'équipe, c'était vraiment appréciable d'avoir enfin quelqu'un au quotidien qui travaille sur le même sujet, bon courage pour la suite de ta thèse !

Je me tourne maintenant vers les collègues qui m'ont entourés pendant ces trois années. Trop nombreux pour tous les citer, je tiens à remercier tous les collègues du bâtiment H9, pour leur accueil et pour rendre convivial cet espace de travail malgré l'ancienneté de ses locaux (!). En particulier, je souhaite remercier le groupe de sport du vendredi midi et notre prof Johann pour cette superbe parenthèse sportive dans la semaine, les doctorants et post-doctorants du labo, en particulier mes co-bureaux Jesus, Pauline et Felana, mais aussi Cécile, Paul, Mathieu... Une dédicace spéciale à tous les membres de l'association des doctorants d'Ampère (alias ADA), merci à vous Caroline, Clémentine, Adrien, Eva qui avez été là depuis le début, nous avons lancé tellement de projets, c'était une super expérience !

Enfin, comment ne pas remercier mes amis et ma famille, qui ont apporté tout le soutien moral nécessaire durant ces trois années, mes parents, mes grand-parents, mes frères, toujours intéressés pour que je leur raconte ce sur quoi je travaille, mais aussi mes amis, et notamment la team de Lyon, pour contribuer à m'aérer l'esprit lors de nos nombreux apéros, restos, sorties... Last but not least, un immense merci à Joffrey pour son soutien indéfectible au quotidien, ses précieux conseils sur l'organisation de la thèse et bien plus encore, sans qui la réalisation de ce projet aurait été bien plus difficile, j'ai tellement de chance de t'avoir dans ma vie !

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	III
Abstract	IV
Remerciements	V
Table des matières	VIII
Table des acronymes	XIV
Introduction	1
1 Électroporation de sphéroïdes : l'intérêt des microsystemes	4
Introduction	5
1.1 Effet des champs électriques sur les cellules	5
1.2 Le mécanisme d'électroporation	6
1.3 Applications de l'électroporation	11
1.4 Culture cellulaire in vitro : des modèles 2D aux structures 3D	17
1.5 Les technologies pour l'étude de l'EPN in vitro	27
Conclusion	32
2 Méthodes de suivi et d'analyse des sphéroïdes : l'intérêt de la bio-impédance	33
Introduction	34
2.1 État de l'art des méthodes de suivi et d'analyse de sphéroïdes et de leur EPN . .	34
2.2 Impédance électrique des milieux biologiques	39
2.3 Principe de mesure de la bio-impédance	43
2.4 Applications de la mesure de bio-impédance sur modèles cellulaires	47
Conclusion	52
3 Microsystème pour la culture, le suivi et l'électroporation de sphéroïdes	53
Introduction	54
3.1 Méthode de production des sphéroïdes	54
3.2 Principe et fabrication du microsystème	56
3.3 Caractérisation du microsystème	60
3.4 Preuve de concept de l'efficacité d'électroporation	68
Conclusion	78

4	Effet de la complexification de l'environnement tumoral sur l'électrochimiothérapie : le cas du cancer du pancréas	79
4.1	Introduction : le cancer du pancréas	80
4.2	Mise au point d'un modèle de sphéroïde en co-culture	83
4.3	Application à l'électrochimiothérapie	88
	Conclusion	98
5	Vers une étude multimodale des sphéroïdes : l'apport de la mesure de bio-impédance	100
	Introduction	101
5.1	Démonstration de l'adaptabilité du microsysteme à la mesure d'impédance	101
5.2	Mesures sur modèle simplifié : cellules en suspension	114
5.3	Culture de sphéroïdes sous perfusion : application au suivi de croissance par impédance	121
5.4	Étude de l'effet de l'électroporation sur les sphéroïdes par suivi d'impédance	129
	Conclusion	132
6	Conclusion et perspectives : extension du microsysteme à l'étude du transfert de gènes par électroporation	135
6.1	Conclusion générale	136
6.2	Perspectives	138
	Annexes	144
A	Les techniques de micro-fabrication d'électrodes	145
B	Fabrication du moule en PDMS pour le moulage des micropuits en hydrogel	145
C	Caractérisation des moules et moulages au profilomètre optique	146
D	Double utilisation de l'iodure de propidium	147
E	Macro ImageJ pour la mesure de l'intensité de fluorescence de sphéroïdes	148
F	Tests statistiques	151
G	Routine Matlab pour analyser l'intensité de fluorescence à l'intérieur d'un sphéroïde	152
H	Protocole de marquage de la prolifération cellulaire	155
I	Routine Matlab pour évaluer la colocalisation de deux canaux de fluorescence	156
J	Protocole de la transduction des cellules MRC5	159
K	Protocole de l'immunomarquage de la fibronectine	159
L	Calcul de la constante d'électrodes pour une configuration interdigitée coplanaire	160
M	Mesures d'impédance pour le suivi de croissance	161
N	Mesures d'impédance après ajout de TritonX-100 sur suspensions cellulaires	162
O	Mesures d'impédance après EPN sans cellules et sur suspension cellulaire	163
	Liste des communications scientifiques	165
	Bibliographie	183

TABLE DES FIGURES

1.1	Schéma de la membrane plasmique et du fonctionnement des pompes à ions sodium et potassium (inspiré de Wikipedia).	5
1.2	Illustration schématique de l'électroporation réversible (RE) et irréversible (IRE).	6
1.3	Représentation schématique d'une cellule, soumise à un champ électrique uniforme, et des différences de potentiels de repos et induits, dans le sens décroissant.	7
1.4	Évolution du potentiel transmembranaire en fonction de l'angle entre la membrane et la direction du champ appliqué pour des cellules de différentes formes [KOTNIK, 2016].	8
1.5	Schéma de l'electroperméabilisation à l'échelle moléculaire.	9
1.6	Effets du champ électrique appliqué sur les cellules en fonction de l'intensité et de la durée des impulsions dans le cadre de l'EPN.	10
1.7	Influence des paramètres du champ électrique sur la perméabilisation de la membrane cellulaire.	11
1.8	Évolution de la température en fonction du temps lors du traitement d'un liquide par pasteurisation ou par PEF.	12
1.9	Schéma de l'application d'impulsion électrique (bleu) sur une tumeur (zone marron) à l'aide d'électrodes sous forme d'aiguilles, permettant le transport d'agent anticancéreux (losanges rouges) dans les cellules tumorales afin de les tuer.	14
1.10	Structure moléculaire 3D de la bléomycine (a), du cisplatine (b) et d'un fragment d'ADN (c).	15
1.11	Types de sondes utilisées in vivo pour l'électrochimiothérapie (ECT) et l'électroporation irréversible (IRE) [GEBOERS et al., 2020].	16
1.12	Schéma de la modification du micro-environnement (densification de la matrice extracellulaire) dans le cadre du développement d'une tumeur, par rapport à un tissu sain [GOUARDERES, MINGOTAUD et al., 2020]	18
1.13	Schéma du développement d'une tumeur cancéreuse détaillant le rôle des cellules et de leur environnement, adapté de [N. M. ANDERSON et al., 2020].	18
1.14	Les différents modèles d'étude des tumeurs, de la culture cellulaire aux essais cliniques (inspiré de [FITZGERALD et al., 2015]).	21
1.15	(a) Les principaux modèles 3D de tissus tumoraux in vitro, adapté de [PAPE et al., 2021]. (b) Composition et organisation d'un sphéroïde, adapté de [PINTO et al., 2020].	22
1.16	Exemples de techniques de production de sphéroïdes basées sur l'utilisation de micropuits en agarose ou PDMS.	26
1.17	(a) Schéma de principe d'une cuvette d'électroporateur commercial. (b) Exemple d'électroporateur commercial, le Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, États-Unis).	27

1.18	Exemples d'électrodes portatives.	28
1.19	Illustrations de différents microsystemes pour l'EPN de cellules adhérentes ou en suspension.	29
1.20	Étapes (a à f) de fabrication du microsysteme d'EPN de l'équipe de Zhu et al.	29
1.21	Photos d'électrodes illustrant les réactions électrochimiques lors de l'application d'impulsions électriques avec pour électrolyte une solution saline à 0.9% [MAHNIČ-KALAMIZA et al., 2020].	30
2.1	Schéma optique du principe de fonctionnement d'un microscope confocal (source : Zeiss).	36
2.2	Illustration des différentes méthodes optiques pour l'observation de sphéroïdes.	37
2.3	Permittivité et conductivité complexes de cellules et visualisation des dispersions en fonction de la fréquence [HEILEMAN et al., 2013].	40
2.4	Effet Maxwell-Wagner.	41
2.5	Trajet du courant dans une suspension de cellules en fonction de la fréquence.	41
2.6	Schéma simplifié d'une cellule et de son circuit électrique équivalent selon le modèle de Fricke.	42
2.7	Schéma simplifié d'une suspension de cellules et de sa modélisation.	43
2.8	Schéma de la double couche ionique à l'interface électrode-électrolyte.	44
2.9	Circuits électriques des configurations de mesure d'impédance.	45
2.10	Configurations d'électrodes les plus répandues pour la mesure d'impédance sur cellules [HEILEMAN et al., 2013].	46
2.11	Schéma des lignes de champ au-dessus d'électrodes interdigitées selon l'espace entre les peignes.	46
2.12	Exemples de systèmes de mesure d'impédance sur cellules adhérentes et sphéroïdes.	48
2.13	Application de la spectroscopie d'impédance sur des modèles cellulaires 3D.	49
2.14	Impact de molécules sur la viabilité de sphéroïdes mesuré par bio-impédance.	51
3.1	Étude de la distribution en taille des sphéroïdes formés dans les micropuits en hydrogel.	56
3.2	Conception, fabrication et utilisation du microsysteme comme plateforme de culture et d'électroporation de sphéroïdes.	57
3.3	(a) Moule métallique micro-fraisé. (b) Réplique négative en PDMS.	57
3.4	Explication de la prise de contact sur les électrodes dans le microsysteme.	59
3.5	Modélisation électrique du microsysteme et choix de la fréquence de travail.	61
3.6	Modélisation COMSOL du potentiel, du champ électrique et de la température lors de l'EPN dans le microsysteme.	64
3.7	Modélisation COMSOL de l'injection de milieu dans la chambre microfluidique.	65
3.8	Étude du changement de milieu dans la chambre microfluidique par microscopie.	66
3.9	Étude du changement de milieu dans la chambre microfluidique par impédance.	67
3.10	Électroporation dans le microsysteme.	69
3.11	Détermination du seuil de l'EPN par microscopie à épifluorescence.	72
3.12	Étude de l'efficacité de l'EPN à l'intérieur des sphéroïdes par microscopie confocale.	73
3.13	Comparaison de l'intensité d'IP pour des sphéroïdes morts et électroporés.	74
3.14	Étude de l'effet d'un traitement par EPN avec de la bléomycine sur la croissance de sphéroïdes de cellules HT29 et la prolifération cellulaire.	75
3.15	Étude de la co-localisation du marquage de la prolifération (EdU) et des noyaux (NucGreen) 3 jours après l'expérience avec et/ou sans EPN et/ou bléomycine, en fonction de la distance de la périphérie vers le cœur du sphéroïde.	76
3.16	Étude de l'effet de la bléomycine sur les sphéroïdes à long terme pour plusieurs tensions d'EPN.	77

4.1	Schéma indiquant la position du pancréas au sein du système digestif humain.	80
4.2	Illustration des principales méthodes physiques pouvant favoriser le passage de la barrière de l'environnement tumoral par les molécules de traitement anticancéreux.	82
4.3	Proportion de cellules MRC5 dans des sphéroïdes en co-culture de cellules PANC1 et MRC5 avec et sans facteur de croissance TGF- β	84
4.4	MIP d'images typiques réalisées au microscope confocal ($\times 25$) après immunomarquage de la fibronectine synthétisée après 7 jours de co-culture (PANC1+MRC5) sans (a) ou avec (b) TGF- β	85
4.5	Étude de la circularité moyenne de sphéroïdes de PANC1 ou en co-culture avec TGF- β au bout de 7 et 9 jours de culture.	86
4.6	Caractérisation de la prolifération de sphéroïdes de PANC1 seules ou en co-culture avec ou sans TGF- β	88
4.7	Étude de l'efficacité d'EPN d'impulsions sinusoïdales d'amplitudes croissantes sur des sphéroïdes de cellules PANC1.	89
4.8	Étude de la viabilité cellulaire 2h après EPN de sphéroïdes de cellules PANC1 avec des impulsions sinusoïdales d'amplitudes croissantes.	90
4.9	Étude de la viabilité de sphéroïdes de cellules PANC1 trois jours après EPN en présence de gemcitabine ou de bléomycine.	91
4.10	Étude de l'effet de la gemcitabine à long terme sur les sphéroïdes de cellules PANC1.	92
4.11	Effet de la gemcitabine et de la bléomycine sur la prolifération de sphéroïdes de cellules PANC1.	93
4.12	Étude de l'effet de la gemcitabine à long terme sur la viabilité de sphéroïdes de PANC1 pour différentes concentrations et temps d'incubation.	94
4.13	Étude de la prolifération de sphéroïdes en co-culture sans TGF- β un jour après EPN avec ou sans anticancéreux (gemcitabine ou bléomycine).	95
4.14	Étude de l'impact de la gemcitabine combinée à l'EPN sur des sphéroïdes en co-culture avec TGF- β au bout de 6 jours.	96
4.15	Étude d'impact de l'EPN en présence de bléomycine sur la mortalité de sphéroïdes de PANC1 et de sphéroïdes en co-culture avec TGF- β à 7 jours de culture.	97
5.1	Importance des paramètres expérimentaux sur la mesure d'impédance.	102
5.2	Représentation schématique des électrodes interdigitées en 2D (a) et principe en 3D (b).	103
5.3	Simulation du champ électrique pour les configurations de spectroscopie d'impédance et d'électroporation.	104
5.4	Étude paramétrique de la géométrie des IDE pour des largeurs allant de 200 à 500 μm	106
5.5	Images au microscope optique et photos des électrodes interdigitées fabriquées.	107
5.6	Étude de la répétabilité des mesures dans le microsystème avec IDE en or double chambre durant l'injection de milieu de conductivité 0.0343 S/m.	109
5.7	Étude de la répétabilité des mesures dans le microsystème avec IDE en or double chambre durant l'injection de milieu de conductivité 1.25 S/m.	110
5.8	Évolution avec le temps du module de l'impédance d'une solution KCl (0.0615 S/m) mesuré dans le microsystème avec les IDE-250 lors de sa montée en température de 23°C à 37°C avec un pas de temps de 1 min pendant 40 min.	112
5.9	Évolution du module de l'impédance à 30 kHz pour plusieurs solutions KCl de conductivités faibles (bleu, 300-900 $\mu\text{S}/\text{cm}$) et élevées (orange, 8-20 mS/cm) correspondant respectivement à des résistivités élevées (10-35 $\Omega\cdot\text{m}$) et faibles (0.4-1.2 $\Omega\cdot\text{m}$).	113

5.10	Justification du protocole de mesure d'impédance sur suspensions cellulaires. . .	115
5.11	Module de l'impédance d'une solution de tampon Hépès 0.03 S/m avec et sans cellules HT29 (1% en fraction volumique) pour des électrodes pleines plaques (PP) parallèles en ITO et des IDE en ITO et en or.	116
5.12	Mesures d'impédance sur des suspensions de cellules HT29 avec des électrodes pleines plaques parallèles en ITO et pour deux milieux de conductivités faible (milieu Hépès) et élevée (milieu de culture).	116
5.13	Mesures d'impédance sur des suspensions de cellules HT29 sur IDE en or de 200 μm de largeur et espacement pour deux milieux de conductivité faible ou élevée.	117
5.14	Comparaison des modules d'impédance avec cellules normalisés par rapport à ceux sans cellules pour les deux configurations d'électrodes dans le milieu Hépès (0.03 S/m) ou le milieu de culture (1.32 S/m).	118
5.15	Mesures d'impédance sur une suspension de 3% de cellules HT29 sur des électrodes pleines plaques en ITO dans un milieu de conductivité faible (0.0156 S/m).	119
5.16	Étude préliminaire du suivi de croissance de sphéroïdes sous perfusion dans le microsysteme.	121
5.17	Représentation schématique du protocole de culture sous perfusion dans le microsysteme après sa mise au point.	123
5.18	Suivi d'impédance pendant 3 jours avec les IDE-250 en or et mesure différentielle pour un hydrogel sans sphéroïdes.	124
5.19	Suivi de croissance des sphéroïdes avec mesure différentielle grâce aux IDE-250 en or.	125
5.20	Effet du TritonX-100 sur le suivi de sphéroïdes par impédance.	126
5.21	Suivi de l'impédance en basse fréquence avec les IDE en or (IDE-250) dans le microsysteme double chambre lors de l'injection d'une solution à 10% de TritonX-100.	128
5.22	Mesure d'impédance après EPN sur des sphéroïdes de cellules HT29 à 3 jours de culture avec les IDE-200 pour des expériences avec ou sans bléomycine (14 μM).	130
5.23	Comparaison du suivi optique et par impédance pour l'étude de l'impact de l'EPN avec et sans bléomycines sur des sphéroïdes de HT29.	132
6.1	Résultats préliminaires d'observation de sphéroïdes de cellules HT29 en IRM et OCT.	139
6.2	Évolution expérimentale et théorique de la conductivité d'une suspension de cellules dans du milieu Hépès (0.03 S/m).	140
6.3	Projection orthogonale de l'image au microscope confocal ($\times 25$) d'un sphéroïde de HT29 typique 48h après électrotransfert du plasmide GFP avec un protocole combinant impulsions de tension élevée et faible.	142
A.1	Micro-fabrication d'électrodes structurées avec une résine positive.	145
C.1	Images du logiciel du profilomètre optique Hirox NPS pour la caractérisation du moule positif en métal, moule négatif en PDMS et moulage en hydrogel d'agarose 2% hydraté et séché en surface pour les micropuits de diamètre 300 μm	146
D.2	Justification de la double utilisation de l'IP.	148
E.1	Illustration de la démarche de mesure de l'intensité rouge des sphéroïdes sur le logiciel ImageJ sur un exemple.	149
E.2	Code de la macro ImageJ permettant de faire les MIP des stacks acquis par le microscope à épifluorescence.	149
E.3	Code de la macro ImageJ permettant de combiner les canaux de fluorescence et de définir les ROI autour des sphéroïdes.	150

E.4	Code de la macro ImageJ permettant de mesurer l'intensité de fluorescence sur les ROI définies.	151
G.1	Illustration de la démarche de mesure de l'intensité rouge à l'intérieur des sphéroïdes électroporés, réalisée sur le logiciel Matlab.	152
H.1	Schémas de principe du protocole du marquage de la prolifération cellulaire basé sur l'EdU et de la réaction click permettant sa détection	155
L.1	Code Matlab permettant le calcul de la constante d'électrode des IDE-200.	160
M.1	Expérience 1 : suivi de croissance de sphéroïdes de HT29 par impédance dans le milieu de culture sans Hépès et le milieu 0.03 S/m.	161
M.2	Expérience 2 : suivi de croissance de sphéroïdes de HT29 par impédance dans le milieu de culture avec 25 mM d'Hépès et le milieu 0.03 S/m.	162
N.1	Module de l'impédance mesuré avec les IDE-200 sur une suspension de 3% de cellules HT29 avant et après ajout de 10% de TritonX-100.	163
O.1	Évolution du module de l'impédance moyen, mesuré dans le microsystème avec les IDE-200 contenant du milieu Hépès 0.03 S/m sans cellules, à un temps t (Z_t) après EPN, normalisé par rapport à celui avant EPN (Z_0) (a) en basse fréquence et (b) sur le plateau.	164
O.2	Évolution de l'impédance après EPN dans le microsystème avec les IDE-200 en configuration EPN contenant du milieu Hépès 0.03 S/m avec 3% de cellules HT29.	164

TABLE DES ACRONYMES

ATP : Adénosine TriPhosphate

CPE : Constant Phase Element

DMEM : Milieu Eagle modifié de Dulbecco

ECT : Électrochimiothérapie

EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

EPN : Électroporation

ETG : Électrotransfert de gènes

FDA : Diacétate de fluorescéine ("Fluorescein Di-Acetate" en anglais)

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine ("Fluorescein IsoThioCyanate" en anglais)

IC : Indice Cellulaire

IDE : Électrodes interdigitées ("InterDigitated Electrodes" en anglais)

IP : Iodure de Propidium

IRE : Électroporation irréversible ("IRreversible Electroporation" en anglais)

ITO : Oxyde d'indium-étain ("Indium-Tin Oxide" en anglais)

MCTS : Sphéroïde tumoral multicellulaire ("MultiCellular Tumor Spheroid" en anglais)

MEA : Réseau de micro-électrodes ("Micro Electrode Array" en anglais)

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MIP : Projection de l'intensité maximale ("Maximum Intensity Projection" en anglais)

NA : Ouverture numérique ("Numerical Aperture" en anglais)

PBS : Tampon phosphate salin ("Phosphate Buffered Saline" en anglais)

PCB : Circuit imprimé ("Printed Circuit Board" en anglais)

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PEF : Champ électrique pulsé ("Pulsed Electric Field" en anglais)

PFA : Ablation par champ pulsé ("Pulsed Field Ablation" en anglais)

PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle) (Plexiglas®)

RE : Électroporation réversible ("Reversible Electroporation" en anglais)

ROI : Région d'intérêt ("Region Of Interest" en anglais)

SEM : Erreur type de la moyenne ("Standard Error of the Mean" en anglais)

STD : Écart-type standard ("STandard Deviation" en anglais)

TME : Micro-environnement tumoral ("Tumor Micro-Environment" en anglais)

TMP : Potentiel transmembranaire ("TransMembrane Potential" en anglais)

TX : TritonX-100

Contexte général

Les champs électromagnétiques nous entourent, et ce à différentes échelles, en partant du champ électrique naturel présent sur Terre issu de la différence de potentiel entre la haute atmosphère (ionosphère, chargée positivement) et la surface de la terre (chargée négativement), et jusqu'à l'échelle de la cellule, avec la différence de potentiel existant à l'interface de la membrane cellulaire peu conductrice séparant les milieux intra et extracellulaire, conducteurs. Plus largement, de l'électricité peut être produite et utilisée par les êtres vivants, ce qui permet de définir le concept de bioélectricité, avec par exemple certaines espèces marines utilisant l'électricité comme mécanisme de défense, comme les anguilles, et en revenant à l'échelle cellulaire, on peut penser au fonctionnement des neurones, basé sur le flux ionique comme système de communication d'informations. Même si cette bioélectricité a été observée très tôt dans la nature, il a fallu attendre le 18^{ème} siècle pour que les effets des champs électriques sur les êtres vivants commencent à être caractérisés, avec les travaux de l'Abbé Nollet et de L. Galvani, observant des lésions et des contractions sur les tissus soumis à une décharge électrique. Plus tard, au cours du 20^{ème} siècle, de nombreux chercheurs se sont penchés sur l'étude des effets des champs électriques à l'échelle cellulaire, mettant en avant différents phénomènes selon la nature des champs électriques appliqués, allant de mouvements causés par des forces appelées électrophorétiques pour des champs de faible intensité, à des dommages liés à un échauffement par effet Joule pour des champs longs et intenses, en passant par des modifications de la perméabilité des membranes pour des champs courts mais intenses. Ces derniers peuvent entraîner des effets réversibles ou irréversibles sur la membrane des cellules, lié à un phénomène appelé électroporation (EPN) et utilisé dans de nombreuses applications notamment dans le domaine biomédical. D'un autre côté, les champs électriques (AC) sont aussi utilisés dans ce domaine pour manipuler les cellules (diélectrophorèse) mais également pour caractériser leur propriétés électriques grâce à la mesure de ce qui est appelé la bio-impédance électrique.

Parmi les nombreuses applications de l'EPN dans le domaine médical, cette thèse se concentre sur celles visant à améliorer le traitement contre le cancer. Dans la recherche d'un traitement plus sûr et plus efficace que la chimiothérapie classique, l'électrochimiothérapie (ECT), basée sur l'EPN réversible, est apparue comme une alternative solide, capable d'augmenter d'un facteur 1000 l'efficacité de certaines molécules cytotoxiques comme la bléomycine. Elle permet d'augmenter la perméabilité des cellules aux anticancéreux et donc de réduire les doses à administrer et les effets secondaires indésirables de la chimiothérapie. Plus récemment, les recherches tendent à étudier l'internalisation d'autres molécules dans les cellules afin d'ouvrir les perspectives de traitement, avec notamment l'utilisation de fragments d'ADN pour aller vers des applications comme la thérapie génique basée sur l'EPN réversible, appelée électrotransfert de gènes (ETG). L'intérêt pour ce type de traitements étant croissant, la nécessité de disposer de modèles tumoraux fiables pour étudier l'effet de l'EPN *in vitro* s'accroît. Les agrégats de cellules appelés sphéroïdes ont été identifiés comme un modèle pertinent pour étudier l'EPN

in vitro, car ils peuvent imiter diverses situations normales et pathologiques. Par rapport aux cellules cultivées en 2D sur des surfaces planes, les sphéroïdes multicellulaires reproduisent plus fidèlement la structure d'un micro-tissu, en particulier des tissus tumoraux, dans lequel chaque cellule interagit avec ses voisines par la formation de jonctions assurant la cohésion et la communication cellulaires. En outre, ces agrégats peuvent être produits directement à partir de cellules de patients. Ils sont alors appelés tumorôïdes dans le cas de cellules cancéreuses, et cela permet des applications pour la médecine personnalisée tout en réduisant le besoin d'expériences sur les animaux.

Au cours des dernières décennies, de nombreuses techniques ont été développées pour produire de tels sphéroïdes. Elles peuvent être basées sur des gouttes suspendues qui permettent aux cellules de s'agrèger grâce à la gravité, sur des surfaces très peu adhésives, sur l'agitation ou la lévitation magnétique, et plus récemment sur des micropuits dans des hydrogels ou sur l'encapsulation dans des biomatériaux. Cependant, toutes ne permettent pas d'obtenir des sphéroïdes de taille régulière. De plus, elles sont parfois très coûteuses et ne sont pas toutes adaptées à l'analyse des sphéroïdes par les techniques biologiques classiques. Pour réaliser des tests d'EPN in vitro sur des sphéroïdes, les techniques les plus courantes exposées dans la littérature consistent d'abord à fabriquer les sphéroïdes selon les méthodes précédentes, puis à les introduire dans une cuvette d'EPN reliée à un générateur d'impulsions. Elles impliquent donc plusieurs étapes de manipulation, qui peuvent potentiellement endommager les sphéroïdes, et peuvent conduire à leur distribution aléatoire dans la cuvette, ce qui peut induire des différences de champ électrique perçu d'un sphéroïde à l'autre. Une autre méthode consiste à utiliser des électrodes portables pour réaliser l'EPN directement dans les puits d'une plaque multi-puits où sont cultivés les sphéroïdes, mais le protocole est très chronophage. Il y a donc un fort besoin de développement de nouveaux outils technologiques offrant une facilité d'utilisation, un grand nombre de données statistiques et une bonne reproductibilité des résultats.

Cadre de la thèse et acteurs du projet

L'approche développée dans cette thèse se positionne dans ce contexte car, à notre connaissance, il n'existe pas de solution permettant la culture de sphéroïdes de taille et de forme contrôlées, l'introduction aisée de milieu frais et l'EPN au sein d'un dispositif unique. Ainsi, le microsystème développé permet d'obtenir des données sur les sphéroïdes permettant de contribuer à combler le manque d'informations entre les échelles cellulaire et tissulaire au niveau de la compréhension de l'EPN, et constitue un outil précieux pour l'évaluation in vitro de l'efficacité de traitements reposant sur l'EPN. Cette thèse vise à améliorer le prototype de ce dispositif, déjà fabriqué et étudié par l'équipe Bio-Ingénierie du laboratoire Ampère, par les chercheurs Marie Frénéa-Robin et Julien Marchalot, spécialisés en microsystèmes et étude des interactions entre les champs électromagnétiques et le vivant. Ces premiers travaux ont été permis par le projet Troposphère mené en collaboration avec l'Institut Lumière Matière (ILM) de Lyon et l'INRIA de Bordeaux, soutenu par le CNRS (Appel à Projet MITI Modélisation du Vivant), et notamment par le travail de plusieurs stagiaires de master avant cette thèse (Martin Guillemaud et Victor Perrin). Dans le cadre de ce projet et de la collaboration avec l'ILM, ce dispositif intègre un hydrogel d'agarose structuré permettant de cultiver des sphéroïdes dans des micropuits, technique développée et brevetée par l'équipe Biophysique de l'ILM et notamment par Charlotte Rivière, spécialisée dans la caractérisation mécanique et optique de modèles cellulaires 3D. Cette matrice en hydrogel permet de suivre les sphéroïdes in situ sans les endommager avec l'injection de milieu dans le système, tout en reproduisant un environnement propice pour le développement des cellules grâce à ses propriétés mécaniques proches du vivant.

Les travaux de recherche liés à cette thèse ont donc été menés entre ces deux laboratoires,

principalement à Ampère pour la fabrication, caractérisation et le test du microsystème, et à l'ILM pour l'analyse des sphéroïdes par méthode optique. En plus du financement par une bourse ministérielle, et afin de faciliter la mise en œuvre de ce projet, un financement complémentaire d'une durée de trois ans et associé à cette thèse a été obtenu en répondant à l'appel à projet du Laboratoire d'Excellence (LabEx) iMUST de l'Université de Lyon (ANR-10-LABX-0064), créé dans le cadre du Plan France 2030 mis en place par l'État et géré par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Au cours de cette thèse, le champ d'applications s'est élargi avec le début d'une collaboration avec le professeur Frédéric Prat de l'AP-HP dans le cadre du projet Inter-Carnot Impulse, centré sur les méthodes physiques permettant d'améliorer le traitement du cancer du pancréas, et donc notamment autour de l'intérêt de l'EPN.

Objectifs et organisation du manuscrit

La problématique soulevée et traitée dans cette thèse concerne l'amélioration du microsystème pour démontrer la pertinence de son utilisation comme plateforme d'étude des effets de l'EPN et de test de traitements basés sur ce phénomène sur des structures cellulaires 3D.

Les différents objectifs à remplir pendant ces trois années de recherche ont donc été les suivants :

- La mise au point de ce microsystème permettant la culture, la caractérisation et l'EPN de nombreux sphéroïdes en parallèle de manière reproductible, avec comme verrous technologiques l'intégration microfluidique de la matrice en hydrogel contenant les sphéroïdes et la modélisation multiphysique du champ effectivement perçu par les sphéroïdes produits.
- L'adaptation du microsystème pour permettre une caractérisation multimodale des sphéroïdes in situ, en étendant les fonctionnalités du dispositif à la caractérisation par mesure de bio-impédance électrique en plus des méthodes optiques, ce qui pose la question de la modélisation électrique des cellules et des sphéroïdes.
- L'application à l'évaluation in vitro de l'efficacité de traitements anticancéreux reposant sur l'EPN, sur des modèles cellulaires de plus en plus complexes.

Pour répondre à ces objectifs, le manuscrit est organisé en six chapitres en plus de cette introduction générale. Le sujet étant fortement pluridisciplinaire, l'état de l'art est exposé dans les chapitres 1 et 2, avec un focus sur l'EPN et l'intérêt des microsystèmes et des modèles cellulaires 3D pour l'étudier dans le premier, et les méthodes de suivi et d'analyse des sphéroïdes, en particulier la mesure de bio-impédance, dans le deuxième. Une preuve de concept du microsystème est ensuite présentée dans le chapitre 3, après avoir détaillé sa fabrication, son fonctionnement et sa caractérisation électrique et fluidique. Cette première application du dispositif en tant que plateforme de test de traitement ECT sur sphéroïdes dans un cas classique est ensuite poursuivie dans le chapitre 4, en se penchant sur une application concrète nécessitant de nouvelles approches thérapeutiques, le traitement du cancer du pancréas. Pour cela, le modèle de sphéroïdes est complexifié pour se rapprocher un peu plus de la structure tumorale in vivo et plusieurs molécules anticancéreuses combinées à l'EPN sont évaluées. Le chapitre 5 permet ensuite d'ouvrir les perspectives d'application du microsystème en étudiant l'intégration de la mesure de bio-impédance, permettant de mettre en avant le lien entre les propriétés électriques caractérisées par cette méthode et l'état physiologique des modèles cellulaires étudiés. Enfin, le chapitre 6 propose une conclusion générale permettant de revenir sur les principaux résultats obtenus, et évoque également plusieurs pistes de recherches prometteuses à développer dans le futur.

CHAPITRE 1

ÉLECTROPORATION DE SPHÉROÏDES : L'INTÉRÊT DES MICROSYSTÈMES

Sommaire

Introduction	5
1.1 Effet des champs électriques sur les cellules	5
1.2 Le mécanisme d'électroporation	6
1.2.1 Description du phénomène et historique	6
1.2.2 Effet sur les membranes cellulaires : le potentiel transmembranaire induit	7
1.2.3 Principaux paramètres influençant l'électroporation	10
1.3 Applications de l'électroporation	11
1.3.1 Industrie agroalimentaire et biotechnologie	12
1.3.2 Applications biomédicales	12
1.3.2.1 Électroporation irréversible	12
1.3.2.2 Électroporation réversible	13
1.4 Culture cellulaire in vitro : des modèles 2D aux structures 3D	17
1.4.1 Composition d'une tumeur et de son environnement in vivo	17
1.4.2 Culture cellulaire : les modèles 2D	19
1.4.3 Intérêt de la modélisation de tumeurs par des structures cellulaires 3D	20
1.4.4 Méthodes de production de sphéroïdes	22
1.4.4.1 Méthode de la goutte pendante	24
1.4.4.2 Formation spontanée	24
1.4.4.3 Agrégation par agitation	24
1.4.4.4 Agrégation par méthode physique	24
1.4.4.5 Systèmes microfluidiques	25
1.4.4.6 Micropuits et encapsulation dans des biomatériaux	25
1.5 Les technologies pour l'étude de l'EPN in vitro	27
1.5.1 Électroporateurs commerciaux	27
1.5.2 Systèmes d'électrodes portatives	27
1.5.3 Dispositifs microfluidiques : approche « laboratoire sur puce »	28
1.5.3.1 Microsystèmes pour cellules adhérentes ou en suspension	28
1.5.3.2 Microsystèmes pour les sphéroïdes	29
1.5.4 La problématique du choix des électrodes dans le cadre de l'EPN	30
Conclusion	32

Introduction

Le principal objectif de cette thèse est le développement d'un microsystème permettant la culture, le suivi et l'électroporation de structures cellulaires 3D appelées sphéroïdes.

Ce premier chapitre a donc pour but de définir les concepts nécessaires à la compréhension des travaux effectués : l'électroporation (EPN) et ses applications, ainsi que les sphéroïdes et leurs méthodes de production. L'application visée étant le traitement du cancer grâce à l'électroporation, appelé électrochimiothérapie (ECT), ce chapitre permettra également d'introduire la structure d'une tumeur cancéreuse et l'intérêt des modèles 3D tels que les sphéroïdes pour les reproduire *in vitro*. Enfin, les différentes techniques permettant l'électroporation de cellules et de sphéroïdes seront détaillées, et plus particulièrement les microsystèmes et les avantages qu'ils présentent.

1.1 Effet des champs électriques sur les cellules

Du point de vue électrique, une cellule peut être considérée comme un électrolyte conducteur, le cytoplasme, entouré par une couche isolante, la membrane plasmique. Cette membrane, qui est une bicouche lipidique amphiphile dans laquelle sont présentes des protéines, sépare les milieux intra et extracellulaires, tous deux conducteurs. La présence de cette membrane isolante empêche les molécules rendant ce milieu conducteur, à savoir les ions principalement, de circuler librement. En particulier, les pompes à ions sodium (Na^+) et potassium (K^+), composées de protéines et fonctionnant grâce à l'énergie de la cellule (adénosine triphosphate ou ATP), créent un déficit d'une charge positive à l'intérieur de la cellule puisqu'elles expulsent 3 ions Na^+ durant un cycle, mais font rentrer seulement deux ions K^+ dans le même temps (figure 1.1). De plus, les ions K^+ sont les seuls qui peuvent être transportés passivement à travers la membrane. Ces deux phénomènes entraînent un équilibre des gradients de concentration des ions qui détermine un potentiel transmembranaire ("TransMembrane Potential" en anglais ou TMP) de repos, présent en permanence autour de la membrane. Il dépend du type de cellule et pour des cellules eucaryotes, sa valeur s'étend typiquement entre - 70 mV et - 40 mV [Kotnik, Rems et al., 2019] pour des cellules qui ne se divisent pas, et peut aller jusqu'à - 10 mV pour des cellules en prolifération [Abdul Kadir et al., 2018]. La membrane apparaît donc comme un condensateur chargé, même si le cytoplasme reste lui globalement électriquement neutre, du fait du très large ratio entre l'épaisseur de la membrane (5 nm) et le rayon de la cellule (5 à 10 μm).

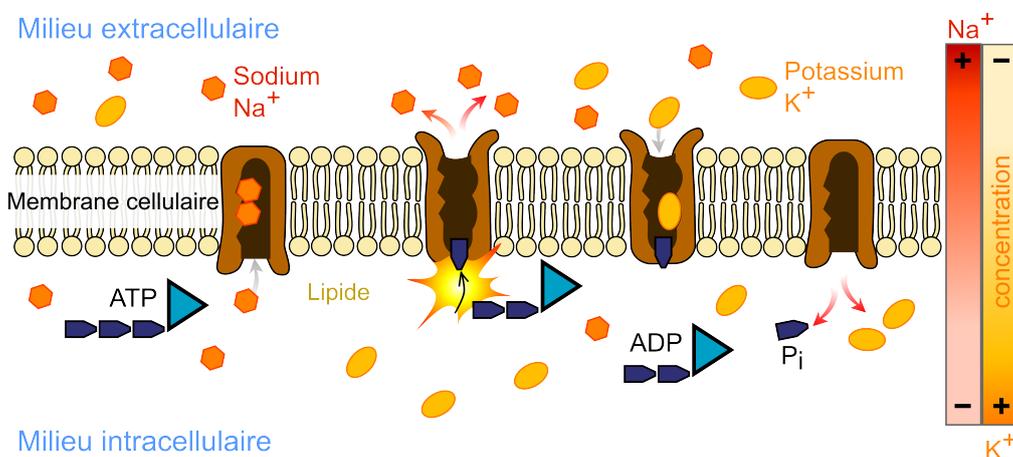


FIGURE 1.1 – Schéma de la membrane plasmique et du fonctionnement des pompes à ions sodium et potassium (inspiré de Wikipedia).

Les principaux effets du champ électrique sur le vivant sont l'échauffement par effet Joule, dû au passage d'un courant électrique ; les effets électrophorétiques de déplacement des particules chargées ; et les effets liés aux impulsions, qui dépendent des paramètres de ces impulsions (intensité, fréquence...). De ces trois effets découlent respectivement de nombreuses applications dans le domaine biomédical, telles que l'ablation par hyperthermie, la délivrance de molécules à travers la peau par iontophorèse, ou encore l'électroporation.

1.2 Le mécanisme d'électroporation

1.2.1 Description du phénomène et historique

Le phénomène d'EPN repose sur la modification du TMP par l'application d'un champ électrique pulsé externe, qui est amplifié au niveau de la cellule à cause du ratio épaisseur de membrane/rayon de la cellule. En effet, si l'on calcule le rapport entre le TMP de repos et l'épaisseur de la membrane, cela donne une valeur de l'ordre du MV/m. Lorsque ce TMP induit dépasse un certain seuil, entre 200 mV et 1 V [Teissié et al., 1993], la membrane est déstabilisée, ce qui la rend perméable à des molécules extracellulaires ne pouvant pas rentrer dans les cellules naturellement. Cela peut mener à deux conséquences pour la cellule, selon les paramètres du champ appliqué (figure 1.2) : soit la membrane parvient à se refermer et la cellule survit, c'est l'électroporation réversible ("Reversible Electroporation" en anglais ou RE) ; soit elle n'y parvient pas et la cellule meurt, c'est l'électroporation irréversible ("IRreversible Electroporation" en anglais ou IRE).

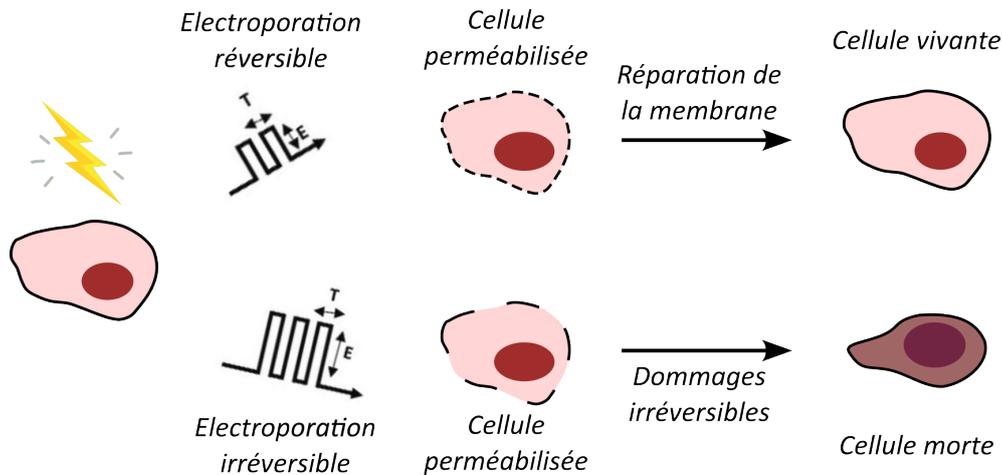


FIGURE 1.2 – Illustration schématique de l'électroporation réversible (RE), avec des impulsions électriques courtes (T) mais intenses (E), mais en dessous d'un certain seuil pour garantir la réparation de la membrane ; et irréversible (IRE), qui exige que les impulsions électriques dépassent un certain seuil (champ électrique très élevé, impulsions très longues ou très nombreuses) afin que les cellules ne puissent pas récupérer (inspiré de [Geboers et al., 2020]).

Si la description des effets des champs électriques pulsés de forte intensité sur les membranes cellulaires a été publiée pour la première fois en 1954 [Stämpfli, 1954], ce n'est qu'en 1972 que Neumann et Rosenheck ont rapporté la réversibilité de ce phénomène et la possibilité de l'utiliser pour l'internalisation de molécules dans les cellules [Neumann, Rosenheck, 1972]. Les premiers modèles tentant d'apporter une explication à ce phénomène, proposant l'apparition de pores dans les membranes, datent de 1977 aux États-Unis [Kinosita et al., 1977] et 1979 en Union Soviétique [Abidor et al., 1979]. En 1982, le terme électroporation est proposé pour la première fois, dans une étude s'intéressant à une nouvelle application du phénomène : l'internalisation de fragment d'ADN dans les cellules [Neumann, Schaefer-Ridder et al., 1982]. Dès lors, de

nombreuses équipes à travers le monde se sont intéressées à ce phénomène et à ses potentielles applications, dans des domaines aussi variés que le biomédical, l'agro-alimentaire ou encore la microbiologie. Cela a notamment permis de mieux décrire le phénomène, qui va au-delà de la formation de pores dans les membranes. Le terme électro-perméabilisation est notamment apparu, pour mettre en avant le fait que les cellules restent perméables même après l'arrêt de l'application du champ, et donc après la fermeture des pores [Teissie, M. P. Rols, 1988].

1.2.2 Effet sur les membranes cellulaires : le potentiel transmembranaire induit

Le potentiel transmembranaire $\Delta\Psi_m$, induit par une impulsion électrique, peut être calculé en résolvant l'équation de Laplace sur un modèle de cellule constitué d'une enveloppe diélectrique (la membrane) séparant les milieux intra et extracellulaire, considérés comme purement conducteurs (figure 1.3) [André et al., 2004]. Il est décrit par l'équation de Schwan suivante [Schwan, 1957] :

$$\Delta\Psi_m = f_s g E R \cos(\theta) \exp^{-\frac{t}{\tau_m}}, \text{ avec } \tau_m = \frac{R \frac{\varepsilon_m}{d}}{\frac{2\sigma_{cyt}\sigma_e}{\sigma_{cyt}+2\sigma_e} + \frac{R}{d}\sigma_m} \quad (1.1)$$

où R est le rayon de la cellule (m), f_s un facteur lié aux propriétés géométriques de la cellule, qui vaut 1.5 pour une cellule parfaitement sphérique, g un facteur dépendant de la perméabilité électrique de la membrane cellulaire, E l'intensité du champ électrique appliqué (V/m), θ l'angle entre la membrane de la cellule et la direction du champ électrique appliqué (degré), τ_m le temps de chargement de la membrane (s), ε_m la permittivité de la membrane, d l'épaisseur de la membrane (m), σ_{cyt} la conductivité du cytoplasme (S/m), σ_e la conductivité du milieu extérieur (S/m) et σ_m la conductivité de la membrane (S/m).

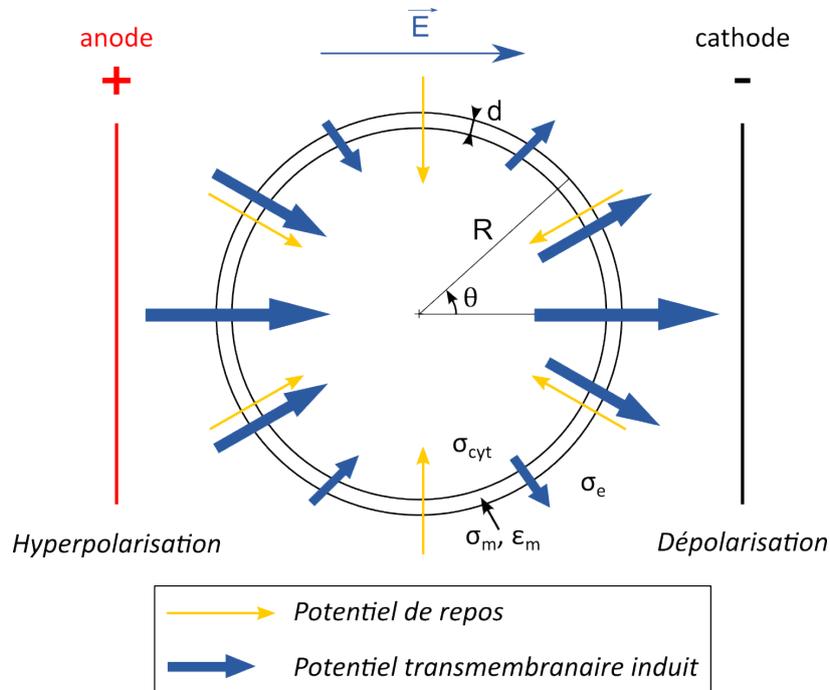


FIGURE 1.3 – Représentation schématique d'une cellule, soumise à un champ électrique uniforme, et des différences de potentiels de repos et induit, dans le sens décroissant. Adapté de [André et al., 2004].

En faisant l'approximation que la conductivité de la membrane est très faible devant celle des milieux intra et extracellulaires, et que le temps de chargement de la membrane ($\sim \mu\text{s}$)

est très faible devant la longueur des impulsions appliquées ($>100 \mu\text{s}$) [Rosazza et al., 2016], le potentiel transmembranaire induit peut être approximé par l'équation quasi-statique de Schwan suivante :

$$\Delta\Psi_m = f_s E R \cos(\theta). \quad (1.2)$$

D'après la relation 1.2, $\Delta\Psi_m$ dépend de la forme des cellules, et est proportionnel à leur taille ainsi qu'à l'intensité du champ appliqué. De plus, il est asymétrique (figure 1.4) : du côté faisant face à l'anode ($\theta=180^\circ$), la membrane est hyperpolarisée car les potentiels au repos et induit sont tous deux négatifs, tandis que du côté de la cathode ($\theta=0^\circ$), elle est dépolarisée. La valeur du potentiel transmembranaire total est donc minimale aux pôles de la cellule ($\theta=90$ ou 270°), là où le champ est orthogonal à cette dernière. Cela signifie que l'aire de la membrane affectée par le champ électrique dépend de la forme et de l'orientation des cellules par rapport aux lignes de champ [Valic et al., 2003].

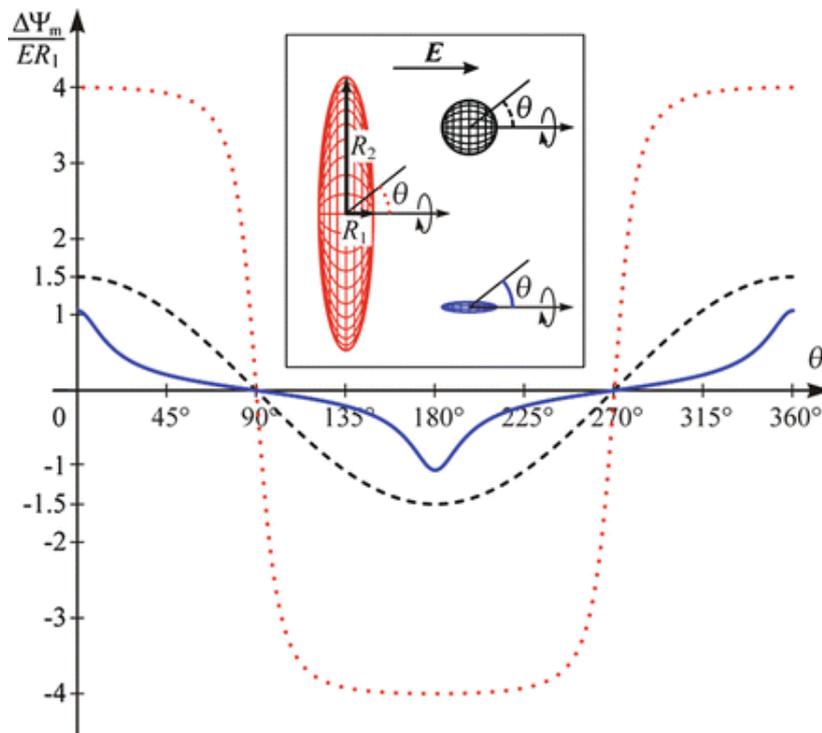


FIGURE 1.4 – Évolution du potentiel transmembranaire en fonction de l'angle entre la membrane et la direction du champ appliqué pour des cellules de différentes formes [Kotnik, 2016]. Trait en pointillés larges noirs : cellule sphérique ($R_1 = R_2$), Trait en pointillés fins rouges : cellule oblongue ($R_2 = 5R_1$), Trait plein bleu : cellule prolata ($R_2 = 0.2R_1$).

Lorsque $\Delta\Psi_m$ atteint une valeur seuil, typiquement entre 200 mV et 1 V [Teissié et al., 1993], les phospholipides de la membrane plasmique, qui sont mobiles, ont une énergie suffisante pour se réarranger et former des pores (1-20 nm) hydrophobes instables, qui deviennent ensuite hydrophiles et métastables [Rosazza et al., 2016] au passage des molécules d'eau, puisque les lipides orientent leur tête hydrophile vers les molécules d'eau (figure 1.5,a). Cela favorise le transport de molécules vers l'espace intracellulaire. Ces pores peuvent être réversibles, si leur taille ne dépasse pas une taille critique, ou irréversibles selon l'intensité et la durée de l'impulsion électrique appliquée, et selon le type de cellule. Toutefois, selon ce modèle, les pores devraient avoir une durée de vie très courte, de l'ordre de celle du mouvement des lipides ($\sim 1 \text{ ms}$), or expérimentalement, la membrane ne semble pas se refermer si rapidement. Et cette théorie ne permet pas non plus d'expliquer la transfection de molécules plus volumineuses que la taille des pores.

Plus récemment, d'autres mécanismes électriquement induits, se produisant à l'échelle moléculaire et pouvant expliquer les phénomènes mis en jeu, ont été mis en avant [Rosazza et al., 2016], et ont donné naissance au terme d'électro-perméabilisation, plutôt qu'électroporation, voire même le terme d'électropulsion. Des modifications chimiques comme la peroxydation (oxydation des lipides insaturés par des radicaux de l'oxygène) peuvent déformer les lipides et augmenter la perméabilité aux ions et petites molécules (figure 1.5,b). Des modulations de certaines protéines membranaires peuvent également survenir, notamment sur des protéines impliquées dans les canaux de transport membranaire, dont le comportement dépend du champ, et qui permettent le transport d'ions dans l'espace intracellulaire à travers la membrane (figure 1.5,c).

Par ailleurs, selon le type de molécule que l'on veut insérer dans les cellules, le comportement n'est pas le même. Si pour les petites molécules, le phénomène de diffusion joue un rôle important, pour les molécules plus volumineuses comme les fragments d'ADN, la transfection repose presque essentiellement sur la force électrophorétique engendrée par l'impulsion électrique, permettant de faire migrer ces molécules vers les cellules [Geng et al., 2013].

Les constantes de temps impliquées dans ces phénomènes survenant aux membranes après l'application de champ électrique pulsé varient de la microseconde à la minute selon les études et les conditions considérées. Il semble que deux populations de pores soient créées : des pores larges (> 2 nm de diamètre) et peu nombreux localisés sur la moitié dépolarisée, avec une durée de vie courte (< 1 ms) [Pavlin, Miklavčič, 2008]; et des pores plus petits, formés avec une densité plus importante sur la moitié hyperpolarisée [Geng et al., 2013].

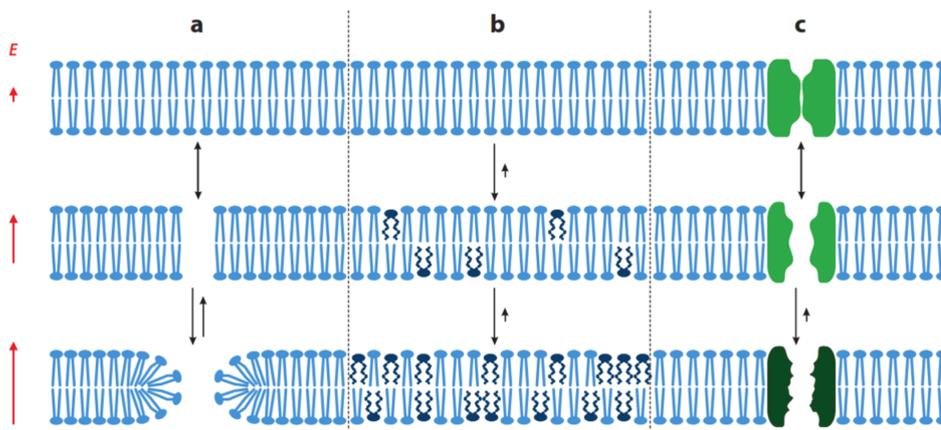


FIGURE 1.5 – Schéma de l'électroperméabilisation à l'échelle moléculaire : (a) Formation de pores hydrophiles sous l'action d'un champ électrique d'intensité suffisante. (b) Modifications chimiques électriquement induites, telles que la peroxydation, augmentant la perméabilité de la membrane aux molécules d'eau, ions et petites molécules. (c) Modulation des protéines membranaires. La longueur des flèches rouges est proportionnelle à l'intensité du champ appliqué. Flèches noires = transition entre les différents états de la membrane (flèche courte = transition plus lente, échelles différentes pour les 3 mécanismes a, b et c) [Geboers et al., 2020].

Ainsi, le phénomène d'électro-perméabilisation est défini par [Teissie, Golzio et al., 2005] et [Rosazza et al., 2016] de la manière suivante :

- Création (ns) : perméabilisation de la membrane avec la formation de pores immédiatement après le dépassement d'un potentiel transmembranaire seuil.
- Expansion (μ s) : augmentation du nombre et de la taille des pores tant que le champ électrique est appliqué, formation de pores hydrophiles.
- Stabilisation (ms) : certains pores restent ouverts donnant ainsi une conformation per-

- méable plus stable.
- Régénération (min) : dans des conditions réversibles, la membrane recouvre son état imperméable.
- Mémoire (h) : certains effets dérivés de la formation des pores peuvent modifier le comportement de la membrane une fois ces derniers refermés.

1.2.3 Principaux paramètres influençant l'électroporation

Un des paramètres les plus importants est l'intensité du champ électrique appliqué, puisque de celle-ci découle l'apparition même du phénomène d'EPN. En effet, comme vu précédemment, il faut que le potentiel transmembranaire induit dépasse une certaine valeur seuil pour que l'EPN ait lieu. Mais il faut également prendre en compte le temps d'exposition au champ électrique, la durée de chaque impulsion et leur nombre, qui influencent l'intensité de perméabilisation des cellules [Weaver et al., 2012], comme on peut le voir sur la figure 1.6. Des valeurs classiques pour une EPN réversible pour des cellules mammifères sont un champ de 100 à 1000 V/cm et une durée d'impulsion allant de la μs à la ms [Rosazza et al., 2016].

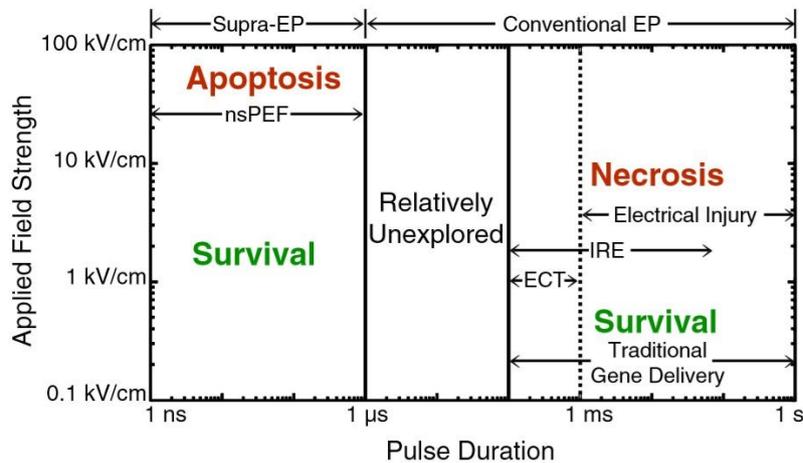


FIGURE 1.6 – Effets du champ électrique appliqué sur les cellules en fonction de l'intensité et de la durée des impulsions dans le cadre de l'EPN [Weaver et al., 2012].

Lorsque plusieurs impulsions sont appliquées, la fréquence de répétition peut également influencer l'efficacité d'EPN, une faible fréquence de répétition (< 1 Hz) étant considérée comme plus efficace. Le fait que la membrane des cellules se referme, même très partiellement, entre les impulsions serait bénéfique pour l'efficacité de perméabilisation [Silve et al., 2014]. La pénétration d'une molécule dans une cellule par EPN dépend donc de l'intensité du champ électrique appliqué, qui influence la surface perméabilisée, ainsi que du nombre et de la fréquence des impulsions appliquées, qui influencent la concentration de pores sur la surface de la membrane [M.-P. Rols et al., 1998] (figure 1.7).

Un autre paramètre du champ électrique qui influence l'EPN est la forme de l'impulsion appliquée. Classiquement, des impulsions unipolaires carrées ou des signaux en exponentielle décroissante sont utilisés, mais il a été montré que l'utilisation d'impulsions bipolaires peut permettre d'augmenter l'efficacité d'EPN tout en diminuant de 20% la tension nécessaire. L'utilisation d'impulsions bipolaires permet aussi de réduire les réactions d'électrolyse pouvant avoir lieu en surface des électrodes [Kotnik, Mir et al., 2001] (voir partie 1.5.4). D'autres caractéristiques comme les temps de montée et de descente n'ont pas montré d'impact sur l'EPN [Kotnik, Pucihar et al., 2003]. Plus récemment, l'équipe de [García-Sánchez et al., 2018] a utilisé des impulsions sinusoïdales afin de pouvoir étudier la réponse en fréquence des cellules grâce à ces formes d'ondes simples, et qui ont également l'avantage d'être bipolaires.

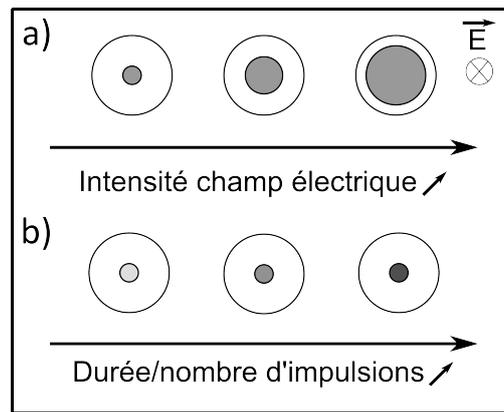


FIGURE 1.7 – Influence des paramètres du champ électrique sur la perméabilisation de la membrane cellulaire [Rosazza et al., 2016]. (a) Pour une durée et un nombre d’impulsions fixés, la surface perméabilisée de la cellule (en gris) augmente avec le champ. (b) Pour un champ donné, la densité des structures perméables (gris clair à gris foncé) augmente avec le nombre d’impulsions et/ou leur durée.

Si on reprend l’équation de Schwan (1.2), un autre facteur qui peut influencer l’efficacité d’EPN est la géométrie des cellules (taille et forme). Des cellules volumineuses sont plus sensibles à l’EPN que des plus petites, et le potentiel transmembranaire peut également être influencé par d’autres caractéristiques comme la densité de cellules et la conformation de l’échantillon [Pavlin, Pavselj et al., 2002]. Cela explique notamment pourquoi des cellules adhérentes sont perméabilisées avec un champ électrique plus faible que des cellules en suspension [M. P. Rols et al., 1990].

Les conditions externes comme la température, la conductivité du tampon d’EPN, la pression osmotique et le pH, peuvent aussi influencer l’efficacité d’EPN. Concernant la température, l’effet Joule peut entraîner une variation de température, mais celle-ci peut être considérée comme négligeable si le temps d’application du champ électrique pulsé est court (μs), et une variation locale et courte de quelques degrés n’a pas d’influence sur l’efficacité de cette dernière et la viabilité des cellules [Weaver et al., 2012]. Toutefois, pour des durées d’application plus longues (ms), il peut être nécessaire de réduire la conductivité du milieu dans lequel l’électroporation est réalisée afin de limiter cet échauffement. D’autre part, l’augmentation de la taille des cellules produite par un gonflement dû à une modification de la pression osmotique lors de l’EPN pourrait avoir un impact positif sur l’efficacité d’EPN [García-Sánchez, 2015]. Concernant le pH, il doit être maintenu autour de la valeur physiologique de 7 à 7.4 pour assurer une viabilité acceptable des cellules.

1.3 Applications de l’électroporation

Les applications de l’EPN sont diverses et dépendent du type d’EPN étudié :

- L’EPN irréversible qui a des applications en industrie agroalimentaire, comme la lyse cellulaire, pour l’extraction de jus par exemple, et dans le domaine biomédical, où cette méthode est utilisée pour réaliser l’ablation de tissus tumoraux [Rubinsky et al., 2007].
- L’EPN réversible, qui a principalement des applications dans le domaine biomédical, notamment en cancérologie.
- Et l’électrofusion par EPN, avec des applications à la synthèse d’anticorps ou de vaccins [Tanaka et al., 2002].

1.3.1 Industrie agroalimentaire et biotechnologie

Dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, l'utilisation de champs électriques pulsés (PEF, μs à ms , 10 à 80 kV/cm) permet diverses applications et a plusieurs avantages, comme la réduction des coûts énergétiques ou encore la préservation de la qualité nutritive des aliments [Nowosad et al., 2021]. En effet, une des principales applications est la stérilisation d'aliments tels que des jus de fruits ou du lait avec une méthode "froide", en comparaison avec la pasteurisation traditionnelle. Même si l'ordre de grandeur du champ qu'il faut pour électroporer de manière irréversible les bactéries et champignons, et donc stériliser le liquide, est élevé (plusieurs dizaines de kV/cm), l'application est courte (ms) donc l'échauffement est limité et beaucoup moins long que lors de la pasteurisation (figure 1.8). Cela permet de garder certaines propriétés nutritives, comme les vitamines par exemple, tout en augmentant la durée de conservation par rapport à un jus de fruit frais. Il existe déjà des produits commerciaux utilisant cette technique, comme ceux de l'entreprise Elea par exemple (site web Elea). Les PEF permettent aussi d'extraire plus efficacement certaines molécules des cellules de plantes en les électroporant, par exemple le sucre de betterave ou le jus de raisin pour la production de vin. Cela a pour avantage d'améliorer le rendement, ce qui est particulièrement intéressant pour une industrie aussi répandue et nécessaire que l'agroalimentaire, et donc de rendre cette méthode compétitive. D'autres mécanismes utiles dans cette industrie peuvent être facilités par l'application de PEF de plus faible intensité (350 à 5000 V/cm), comme la déshydratation, la surgélation ou encore la lyophilisation, en entraînant un meilleur transfert de chaleur [Arshad et al., 2021].

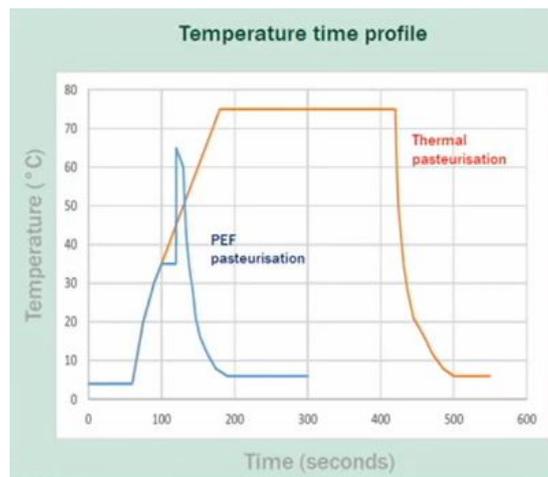


FIGURE 1.8 – Évolution de la température en fonction du temps lors du traitement d'un liquide par pasteurisation ou par PEF [extrait de la présentation de J. Raso à "l'Electroporation-Based Technologies and Treatments (EBTT) international scientific workshop", 2022]

Dans le domaine des biotechnologies, les PEF ont également plusieurs applications. Ils sont notamment utilisés pour effectuer des transformations génétiques de micro-organismes (extraction/transfection de gènes), ou pour leur inactivation, permettant par exemple le traitement d'eaux usées [Nowosad et al., 2021] ou encore pour tuer des bactéries résistantes aux antibiotiques.

1.3.2 Applications biomédicales

1.3.2.1 Électroporation irréversible

L'électroporation irréversible est utilisée principalement pour réaliser l'ablation de tissus, dans deux domaines de la médecine : l'ablation de tissus tumoraux en oncologie et le traitement

des arythmies en cardiologie. La première présente l'avantage d'être presque sans effet thermique (échauffement uniquement très localement autour des électrodes utilisées pour l'EPN), et donc d'entraîner moins de dommages pour les tissus environnants de la tumeur par rapport aux méthodes classiques comme l'ablation radio-fréquence ou la cryo-ablation [Geboers et al., 2020]. L'application en cardiologie est quant à elle plus récente et en pleine expansion, avec de nombreuses entreprises qui se lancent sur ce marché. Appelée PFA ("Pulsed Field Ablation") pour "ablation par champ pulsé", cette technique permet de traiter la zone du tissu cardiaque responsable de l'activité électrique anormale entraînant l'arythmie, en limitant les effets secondaires dus aux ablations thermiques (sténose de la veine pulmonaire notamment) [Reddy et al., 2018].

1.3.2.2 Électroporation réversible

L'électroporation réversible a deux principales applications dans le domaine biomédical : la transfection de fragments d'ADN ou plasmides et les vaccins à ADN d'une part, et l'électrochimiothérapie d'autre part. L'électrochimiothérapie (ECT) consiste à utiliser l'EPN pour augmenter l'efficacité d'internalisation de molécules anticancéreuses dans les cellules, et donc leur cytotoxicité, dans le cadre de traitement de tumeurs cancéreuses. Dans les deux cas, il s'agit d'utiliser une méthode physique pour améliorer la capacité de pénétration d'une biomolécule dans les cellules.

D'autres méthodes existent pour la délivrance intracellulaire de biomolécules : des méthodes chimiques, avec utilisation d'un vecteur pouvant franchir la barrière cellulaire, ou des méthodes physiques. Les premières reposent par exemple sur l'utilisation de vecteurs viraux, de nanoparticules, ou encore de vésicules comme les exosomes. Ces vecteurs chimiques sont très prometteurs mais ont certains inconvénients, puisque leur mécanisme d'action est encore méconnu, et qu'il existe des problématiques de toxicité liées à leur utilisation. L'altération de la membrane plasmique par des méthodes physiques comprend quant à elle des méthodes de pénétration mécanique, comme la micro et nano-injection ou le pistolet à gènes. Dans ce cas, une force externe est appliquée sur les cellules. Il existe aussi des méthodes de perméabilisation optiques, basées sur l'utilisation de laser, ou encore des méthodes basées sur l'utilisation d'ultrasons avec la sonoporation [García-Sánchez, 2015]. Parmi ces méthodes physiques, il existe également l'utilisation de champs électriques pulsés pour perméabiliser les cellules, c'est-à-dire l'EPN.

Avant de détailler les intérêts de l'ECT et de la transfection d'ADN dans le cadre des traitements anticancéreux, sur lesquels se concentre cette thèse, il est important de remettre brièvement ces traitements dans un contexte clinique plus global.

Traitements classiques en oncologie La principale stratégie thérapeutique pour traiter une tumeur est la chirurgie ou résection, qui consiste en une ablation de la tumeur ou à son retrait. Elle est utilisée dans environ 80% des cas (selon la fondation ARC). Mais elle ne permet pas toujours d'enlever l'intégralité de la tumeur et n'est pas possible dans tous les cas, notamment pour les tumeurs des organes profonds, difficilement accessibles.

Une autre stratégie de traitement est la radiothérapie, reposant sur l'utilisation de rayons ionisants dont l'énergie permet de tuer les cellules tumorales. Elle permet un traitement plus ou moins local, mais est souvent associée à d'autres traitements pour parvenir à éliminer toute la tumeur.

Selon le site de la Ligue contre de Cancer, un troisième axe thérapeutique concerne les traitements médicaux comme la chimiothérapie. Ce traitement a recours à des molécules cy-

totoxiques, dont le mécanisme peut être basé sur une inhibition de la synthèse d'ADN (antimétabolites), une intercalation dans les chaînes d'ADN (agents intercalants) ou encore un blocage de la division des cellules. Cependant, cette technique entraîne des effets secondaires lourds car elle n'est pas ciblée, les cellules saines comme cancéreuses sont affectées. En effet, le traitement est généralement administré par voie intraveineuse, ce qui affecte plus particulièrement les cellules de la peau, des cheveux, du sang ou encore des muqueuses digestives, qui sont celles qui se multiplient le plus. D'autres traitements médicaux plus ciblés ont donc vu le jour, comme l'immunothérapie, permettant d'activer les cellules immunitaires, les traitements anti-angiogéniques, permettant d'inhiber la vascularisation des tumeurs, ou encore les traitements hormonaux, pour les cancers du sein et de la prostate.

Électrochimiothérapie Dans le cadre des traitements médicaux des tumeurs cancéreuses, l'ECT dispose de l'avantage d'être un traitement localisé, puisque seule la zone électroporée se trouvant autour des électrodes est traitée, ce qui permet la réduction des effets secondaires. De plus, l'EPN permet de faciliter le transport des anticancéreux dans les cellules, ce qui peut permettre de pallier une des raisons du manque d'efficacité des chimiothérapies classiques, à savoir un manque d'accessibilité des anticancéreux dans les cellules tumorales (figure 1.9).

À l'origine, l'ECT a été testée sur des tumeurs cutanées dans des cas où la chirurgie et la radiothérapie n'étaient pas possibles, et particulièrement dans le cadre de la présence de métastases, aussi bien chez l'Homme qu'en vétérinaire. Depuis le début des années 1990, des études cliniques ont été menées, suite aux études précliniques *in vitro* et *in vivo* des années précédentes, ce qui a abouti à la proposition d'un protocole standard nommé ESOPE (European Standard Operating Procedures of ECT) [Marty et al., 2006]. Les principales caractéristiques de ce protocole sont l'application d'un champ électrique d'environ 1000 V/cm (8 impulsions carrées de 100 μ s avec une fréquence de répétition de 1 Hz) avec des électrodes plates ou sous forme d'aiguille placées autour de la tumeur, après l'injection intratumorale ou intraveineuse de la molécule anticancéreuse.

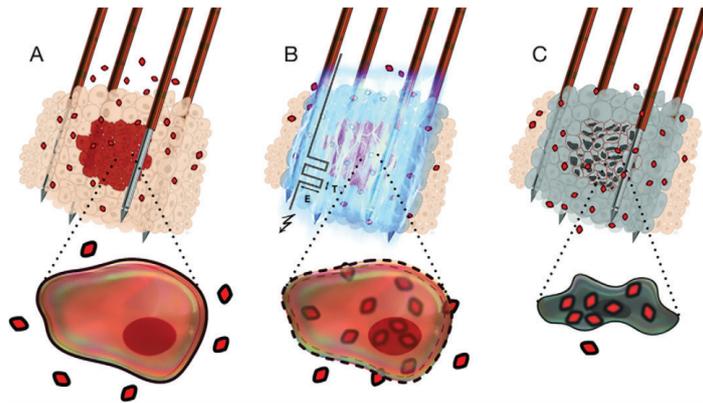


FIGURE 1.9 – Schéma de l'application d'impulsion électrique (bleu) sur une tumeur (zone marron) à l'aide d'électrodes sous forme d'aiguilles, permettant le transport d'agent anticancéreux (losanges rouges) dans les cellules tumorales afin de les tuer [Geboers et al., 2020].

En ce qui concerne les molécules utilisées, le choix s'est porté sur des molécules qui ne peuvent que très peu pénétrer dans les cellules naturellement, la bléomycine et le cisplatine. La première a la capacité d'entraîner des coupures simple et double brin de l'ADN inhibant la division cellulaire, et la deuxième se lie à l'ADN pour inhiber la synthèse de l'ARN. À l'inverse des chimiothérapies classiques, qui atteignent toutes les cellules y compris les cellules saines, l'ECT utilise des molécules qui pénètrent peu dans les cellules, ce qui permet de réduire les effets secondaires systémiques et offre également la possibilité de diminuer les doses administrées. En effet, le transport de ces molécules dans les cellules de manière naturelle est très limité à cause

de leur caractère hydrophile, mais l'utilisation de l'EPN pour faciliter leur internalisation s'avère très efficace, notamment grâce à leur affinité avec les pores hydrophiles créés et à leur petite taille en comparaison avec des plasmides par exemple (figure 1.10). Dans le cas de la bléomycine, l'utilisation de l'EPN permet de multiplier par plus de 1000 sa cytotoxicité [Edhemovic et al., 2011].

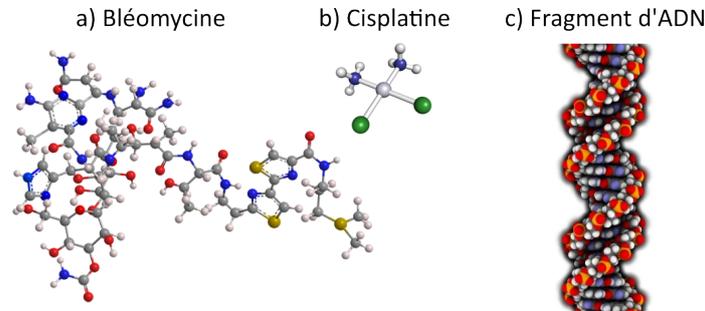


FIGURE 1.10 – Structure moléculaire 3D de la bléomycine (a), du cisplatine (b) et d'un fragment d'ADN (c).

Les études cliniques rapportent un taux de réponse de 85% et peu d'effets secondaires sur les tissus environnants [Geboers et al., 2020], ce qui démontre le fort potentiel de ce traitement. Cette méthode est déjà utilisée en clinique dans plus de 150 centres en Europe [Calvet et al., 2016], notamment sur des tumeurs cutanées, facilement accessibles, du fait que les électrodes doivent être placées au voisinage direct de la tumeur. Au Royaume-Uni, elle fait même partie des recommandations émises par le "National Institute for Health and Care Excellence" (NICE, IPG446) pour les métastases cutanées de tumeurs d'origine non cutanée et de mélanomes [Pirc et al., 2020]. Plus récemment, d'autres dispositifs d'électrodes ont été développés, comme on peut le voir sur la figure 1.11, pour aller vers des utilisations en laparoscopie ou en endoscopie afin d'atteindre des tumeurs plus profondes [Campana, Edhemovic et al., 2019, Geboers et al., 2020]. En effet, l'efficacité démontrée sur les tumeurs superficielles a permis d'ouvrir la voie aux recherches pour le traitement de tumeurs solides des organes profonds, pour lesquels les solutions curatives manquent parfois, comme c'est le cas pour le cancer du pancréas.

En plus de l'amélioration du transport des molécules anticancéreuses dans les cellules grâce à leur perméabilisation, d'autres mécanismes ont été mis en avant pour expliquer l'efficacité de l'ECT [Campana, Miklavčič et al., 2019]. Parmi eux, on retrouve un phénomène nommé "vascular lock", qui est une réduction du flux sanguin de manière réversible durant l'application du champ électrique pulsé. Cela a pour conséquence de piéger les molécules anticancéreuses autour de la tumeur, dans la région où le champ est appliqué, permettant à la molécule d'être disponible plus de temps autour de la tumeur pour agir. Ce phénomène a aussi des effets à plus long terme sur la viabilité des cellules des vaisseaux sanguins de la tumeur. Il a également été montré que l'ECT pouvait avoir des effets sur la réponse immunitaire, avec par exemple le relargage de molécules associées au danger (DAMPs) en réponse des cellules immunitaires à ce traitement.

Une autre molécule prometteuse pour les traitements d'ECT est le calcium, car elle est peu coûteuse, efficace et entraîne peu d'effets secondaires. L'internalisation de calcium dans les cellules par électroporation entraîne une importante chute de la quantité d'ATP, source d'énergie de la cellule, menant à la mort cellulaire. Les premiers résultats précliniques et cliniques montrent son fort potentiel et mettent en avant une réponse immunitaire induite [Calvet et al., 2016]. De plus, des effets moins importants sur les cellules saines que sur les cellules cancéreuses ont été rapportés [Frandsen, Gibot et al., 2015]. Il est donc important d'avoir les outils nécessaires pour étudier ces traitements *in vitro* et *in vivo* afin de mieux comprendre leur fonctionnement.

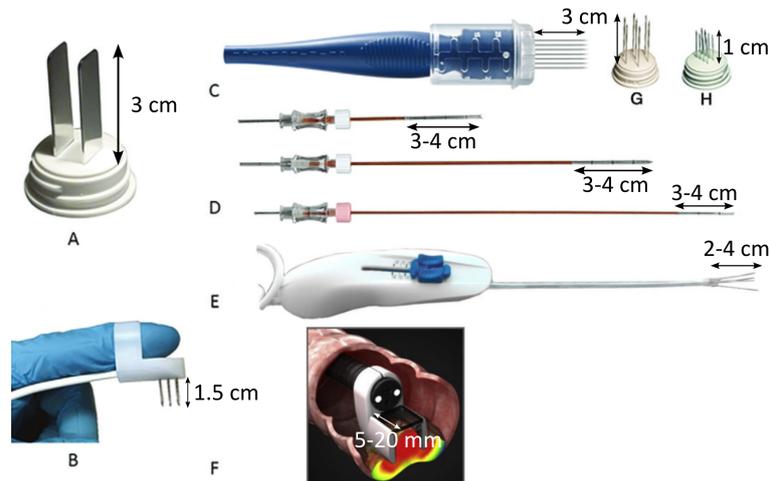


FIGURE 1.11 – Types de sondes utilisées in vivo pour l'électrochimiothérapie (ECT) et l'électroporation irréversible (IRE) [Geboers et al., 2020]. (A) Électrodes plates non invasives utilisées pour les tumeurs superficielles (IGEA medical). (B) Électrodes à doigt utilisées pour les tumeurs situées dans des endroits difficiles à atteindre (IGEA medical). (C) Sonde réglable avec des électrodes à aiguilles : configuration hexagonale (G) ou configuration linéaire (H) (IGEA medical). (D) Électrodes à aiguilles utilisées pour les tumeurs profondes. (E) Sonde ECT mini-invasive avec électrodes à aiguilles extensibles à l'extrémité [Izzo et al., 2020], utilisée en laparoscopie (foie) ou en endoscopie (cerveau). (F) Système EndoVE en endoscopie avec un système sous vide pour capturer la tumeur [Campana, Edhemovic et al., 2019].

D'autres pistes d'amélioration de l'ECT sont d'aller vers une personnalisation des paramètres d'EPN pour chaque patient, en utilisant des modélisations de la répartition du champ autour de la tumeur en fonction du placement des électrodes ([site visifield.com](http://site.visifield.com)), et en adaptant les paramètres en fonction des propriétés des tissus mesurées in situ. Il peut être intéressant également de travailler sur une manipulation de l'environnement tumoral pour mieux faire pénétrer les anticancéreux au sein de la tumeur [Gouarderes, Mingotaud et al., 2020], notamment pour les tumeurs très fibreuses comme le cancer du pancréas par exemple [Sarvepalli et al., 2019]. Enfin, une autre piste est la combinaison de l'ECT et de l'ETG, détaillée ci-après, pour booster l'immunité en plus du traitement chimiothérapeutique local [Ursic et al., 2021].

Électrotransfert de gènes Une autre application de l'EPN réversible est l'électrotransfert de gènes (ETG), à savoir la transfection de fragments d'ADN dans les cellules par le biais de l'EPN. De nombreuses méthodes ont été développées durant les dernières décennies [Verma et al., 2005], mais aucune n'a réussi à s'imposer comme gold standard, et l'EPN reste l'une des méthodes les plus prometteuses pour la transfection de gènes. Le procédé est réalisé en plusieurs étapes [Chopin et al., 2012, Rosazza et al., 2016] :

- Perméabilisation de la membrane (échelle de la μs).
- Migration de l'ADN vers le cytoplasme sous l'action des impulsions électriques (force électrophorétique, ms).
- Formation de complexes membrane-ADN (s).
- Stabilisation de ce complexe puis translocation de l'ADN principalement par endocytose (min-h).
- Migration de l'ADN du cytoplasme vers le noyau (jour).

L'objectif est notamment de transférer des cellules saines périphériques de la tumeur afin de stimuler le système immunitaire [Heller et al., 2000]. Le principal gène étudié est l'interleukine-12 (IL-12) qui permet notamment de stimuler les lymphocytes T et donc de déclencher une

réponse immunitaire interne. Sa combinaison avec l'ECT est d'ailleurs déjà utilisée dans le domaine vétérinaire et fait l'objet d'une étude clinique en cours (projet SmartGene). Cela peut permettre d'avoir des effets sur la tumeur principale avec l'ECT, et aussi sur des métastases n'ayant pas été traitées par ECT, grâce à l'action de l'ETG [Cemazar et al., 2010].

La transfection de fragments d'ADN permet aussi d'ouvrir la voie à des traitements innovants et prometteurs tels que l'immunothérapie, la thérapie par les cellules souches, la régénération tissulaire ou encore l'extinction de gènes [Devi, 2006]. Ce dernier consiste à introduire des fragments d'ARN dits interférants (small interfering RNA ou siRNA) pour désactiver des gènes spécifiques sur les cellules cancéreuses en empêchant la synthèse de l'ARN messenger associé à ces gènes [Ahmadzadeh et al., 2018]. Cela pourrait permettre d'évoluer vers des traitements de médecine personnalisée. L'intérêt d'utiliser l'EPN comme méthode de transfection est qu'elle est efficace sur certaines lignées cellulaires difficiles à transférer par les autres méthodes existantes, comme les neurones, les cellules souches mésenchymateuses ou embryonnaires [Jordan et al., 2008, Liew et al., 2013], ou encore sur certaines cellules tumorales [Luft et al., 2015]. L'administration de siRNA par voie électrique et l'extinction des gènes qui y est associée ont également été démontrées dans des tumeurs solides [Paganin-Gioanni et al., 2020], et dans des sphéroïdes [Pelofy et al., 2021]. De nombreux défis subsistent encore pour ce type d'application, avec des paramètres à prendre en compte et à optimiser comme la dose, le dispositif de délivrance des impulsions, ou encore le design des plasmides, afin de permettre une meilleure efficacité.

Cette thèse se concentre sur l'EPN réversible et ses applications en cancérologie, et principalement l'ECT. Bien que ce traitement soit déjà utilisé en clinique, l'exploitation complète de l'EPN pour le traitement du cancer nécessite une compréhension approfondie de l'effet des impulsions électriques sur les cellules, ce qui implique la prise en compte de leur organisation et de leurs interactions qui existent *in vivo*. Alors que de nombreuses études théoriques et expérimentales ont été réalisées *in vitro* pour comprendre l'impact des champs électriques sur les suspensions cellulaires [Golzio et al., 2002], des études récentes se sont concentrées sur des objets plus complexes tels que les agrégats de cellules nommés sphéroïdes [Chopin et al., 2012, Gibot, M.-P. Rols, 2013, Frandsen, Gibot et al., 2015, Laperrousaz et al., 2018]. Les intérêts de l'utilisation de modèles cellulaires 3D pour étudier l'EPN *in vitro* sont multiples. Tout d'abord, l'application de l'ECT aux tumeurs situées dans des organes profonds nécessite d'étudier *in vitro* l'efficacité de l'ECT sur ces types de cellules. De plus, ces modèles cellulaires peuvent s'avérer utiles pour la translation de l'*in vitro* vers l'*in vivo* de l'ETG [Wasungu et al., 2009]. D'un point de vue plus théorique, l'obtention d'un grand nombre de données statistiques sur des modèles 3D pourrait permettre la modélisation des effets de l'EPN en 3D [Michel et al., 2018] et ainsi combler le manque de connaissances entre les échelles 2D et tissulaire.

1.4 Culture cellulaire *in vitro* : des modèles 2D aux structures 3D

1.4.1 Composition d'une tumeur et de son environnement *in vivo*

Il existe des différences entre la structure et la composition d'un tissu tumoral et celle d'un tissu sain. En effet, une tumeur n'est pas juste un amas de cellules cancéreuses, celles-ci interagissent avec les cellules saines, notamment les cellules stromales, et la matrice extracellulaire (MEC) afin de transformer leur environnement pour favoriser la croissance de la tumeur (figure 1.12).

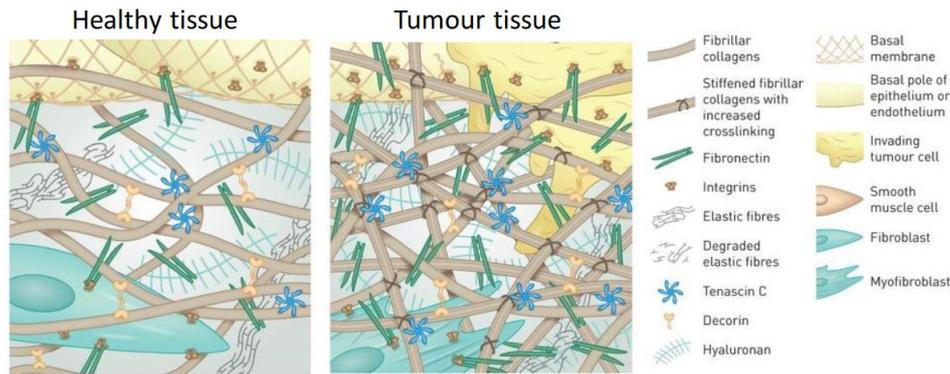


FIGURE 1.12 – Schéma de la modification du micro-environnement (densification de la matrice extracellulaire) dans le cadre du développement d'une tumeur, par rapport à un tissu sain [Gouarderes, Mingotaud et al., 2020]

Ce micro-environnement tumoral ("Tumor Micro-Environment" en anglais ou TME) joue un rôle très important dans le développement de la tumeur par le biais de la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines, et participe ainsi aux différentes étapes du développement d'une tumeur qui sont l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion et la métastase [N. M. Anderson et al., 2020] (figure 1.13). Il est également une des principales causes de la chimiorésistance de certaines tumeurs, puisqu'il fait obstacle aux anticancéreux, qui ne parviennent pas à atteindre les cellules tumorales [Gouarderes, Mingotaud et al., 2020]. Il est composé d'éléments cellulaires et non cellulaires.

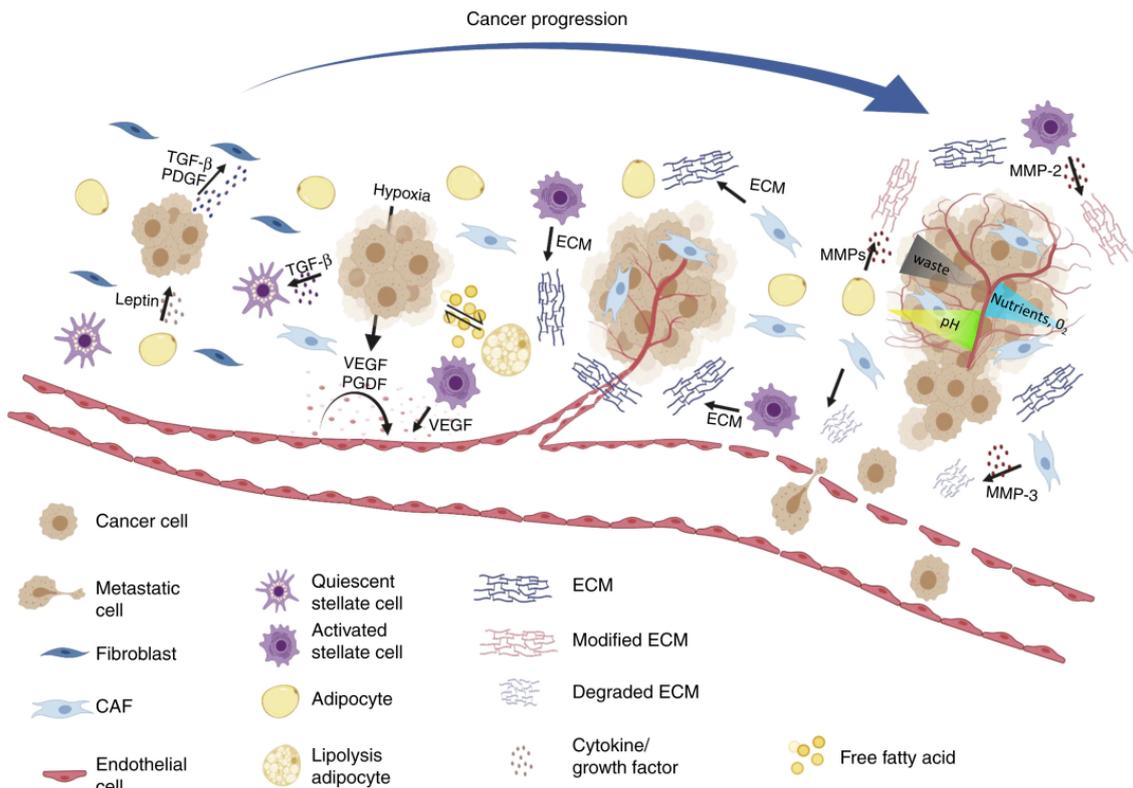


FIGURE 1.13 – Schéma du développement d'une tumeur cancéreuse détaillant le rôle des cellules et de leur environnement, adapté de [N. M. Anderson et al., 2020].

La composition de ce TME en cellules dites stromales varie selon les types de tumeurs mais comprend des cellules endothéliales, des fibroblastes, des adipocytes et des cellules stellaires. Le développement du cancer peut, sur certains points, se rapprocher du processus d'inflammation

et de réparation des tissus, durant lesquels les fibroblastes ont tendance à se différencier en myofibroblastes. Cela favorise la fibrose des tissus avec la synthèse de facteurs de croissance et de protéines composant la MEC, entraînant un remodelage et une densification de celle-ci [Balkwill et al., 2012]. Parmi ces facteurs de croissance, le TGF- β contribue à la transition épithélio-mésenchymateuse qui a une action immunosuppressive au sein du TME, empêchant les cellules de l'immunité d'exercer leur action de surveillance sur les cellules cancéreuses. On peut également citer l'impact important des macrophages immunosuppresseurs, dont la sélection est accrue à cause de l'hypoxie du TME. Ils participent à l'angiogenèse et leur présence abondante est souvent synonyme de faible taux de survie pour de nombreux types de cancers [N. M. Anderson et al., 2020].

Deux autres aspects importants dans le développement tumoral sont la vascularisation et le réseau lymphatique qui, comme pour tout tissu, doivent respectivement permettre l'apport d'oxygène et de nutriments, et l'élimination des déchets. Leur développement est favorisé par la présence de facteurs de croissance appelés VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) dans le TME, sécrétés notamment par les macrophages. Cependant, ces réseaux sont anormaux et chaotiques, ce qui entraîne une répartition inhomogène des nutriments et de l'oxygène, avec notamment une hypoxie, une acidification du milieu et une accumulation des déchets dans les zones de la tumeur éloignées des vaisseaux [Lyssiotis et al., 2017]. Cela entraîne également une élévation de la pression fluide interstitielle dans la tumeur, limitant par exemple la distribution de médicaments dans le TME, ce qui contribue à l'auto-entretien du développement de la tumeur.

Les cellules endothéliales composant le réseau vasculaire joueront ensuite un rôle dans la migration des cellules métastatiques dans la circulation globale, en particulier grâce au mauvais développement du tissu endothélial de la tumeur, qui se caractérise par un manque de connexion entre les cellules.

Les éléments non cellulaires du TME, principalement la MEC, sont également un point important dans le développement de la tumeur. Celle-ci est notamment composée de collagène, fibronectine, élastine et laminine, autant d'éléments permettant de donner une structure dans laquelle les cellules peuvent se développer, et sécréter des molécules permettant en retour son remodelage et sa densification, comme les protéases MMP (Matrix MetalloProteinase) par exemple. Dans les tumeurs solides, la MEC peut même représenter jusqu'à 60% de la masse totale [N. M. Anderson et al., 2020].

En résumé, le tissu tumoral est un tissu complexe dans lequel communiquent de nombreux éléments cellulaires et non cellulaires. Il est principalement caractérisé par une importante présence de MEC rendant le tissu très fibreux, et une mauvaise vascularisation, tous deux entraînant l'apparition de gradients métaboliques et une hypoxie, ce qui favorise d'autant plus son développement. Cette complexité se traduit par une difficulté à mimer son fonctionnement *in vitro*. Les chercheurs se sont d'abord concentrés sur des modèles 2D très simplifiés afin d'accroître leurs connaissances des mécanismes cellulaires, et se sont plus récemment tournés vers des modèles 3D plus complexes. Ces différents modèles sont détaillés dans les paragraphes qui suivent.

1.4.2 Culture cellulaire : les modèles 2D

Si les premières cellules ont été observées et définies par R. Hooke en 1665, elles ont depuis été longuement étudiées et sont considérées comme l'unité de base du vivant. Pour cela, il a été nécessaire de les isoler et de les cultiver, un des pionniers en la matière étant R. Harrison qui a réalisé en 1907 la culture de cellules nerveuses [Harrison, 1907]. Les techniques de culture se sont ensuite développées, et il est désormais possible de cultiver différents types de cellules,

avec plus ou moins de complexité :

- Les cellules primaires : cellules isolées directement chez un donneur, ce qui est difficile au vu du grand nombre de cellules différentes présentes dans le corps humain. De plus, ces cellules ont une courte durée de vie à cause du phénomène de sénescence au fil des divisions, qui correspond au vieillissement de la cellule, entraînant une dégradation de ses fonctions. D'un autre côté, les cellules primaires présentent l'avantage de mimer de manière fidèle l'état physiologique et les paramètres génétiques des cellules *in vivo*.
- Les lignées cellulaires établies : obtenues auprès de centres de bioressources tels que l'ATCC (American Type Culture Collection), ces cellules ont été immortalisées en déréglant leur cycle cellulaire, d'une manière analogue à ce qui se produit naturellement pour certaines cellules cancéreuses, entraînant leur prolifération anormalement rapide. La première lignée immortelle ayant été cultivée s'appelle la lignée HeLa, prélevée sur une patiente atteinte d'un cancer par G. Gey en 1950, et est encore utilisée aujourd'hui [Skloot, 2010].

Ces modèles cellulaires sont très largement utilisés afin de tester la toxicité et l'efficacité de médicaments et autres biomolécules qui ont pour but d'être utilisés dans des traitements chez l'Homme. En effet, pour qu'un produit de santé soit commercialisé, il faut qu'il obtienne une autorisation de la part des autorités compétentes, la Food and Drug Administration aux Etats-Unis ou l'ANSM (Agence Nationale de la Santé et du Médicament) en France, par exemple. Une première étape pour identifier des molécules potentielles est de réaliser des tests *in vitro* sur des cellules en culture.

La culture cellulaire est généralement réalisée en 2D dans des supports tels que des flasques ou des boîtes de Pétri en plastique sur lesquels les cellules adhèrent. Cela permet de les multiplier afin de les utiliser en monocouche ou bien en suspension, après les avoir décollées de la surface grâce à des enzymes. Les protocoles sont ainsi simples, peu coûteux, reproductibles et facilement interprétables. Cependant, la pertinence de ces modèles 2D est limitée. En effet, ce type de modèle ne permet pas de prendre en compte les interactions cellule-cellule et cellule-environnement cellulaire. La morphologie et le mode de division des cellules sont notamment modifiés, et l'accès illimité aux nutriments et à l'oxygène ne représente pas l'environnement qui existe *in vivo* [Kapałczyńska et al., 2016]. Si la recherche *in vitro* s'est longtemps concentrée sur l'utilisation de cellules en suspension ou de monocouches cellulaires 2D, le micro-environnement des cellules, et particulièrement dans le cas de l'étude de tissus cancéreux, s'est révélé important, notamment pendant l'angiogenèse [Hoarau-Véchet et al., 2018], comme cela a été vu précédemment. Par conséquent, les premiers modèles 3D ont été développés dans les années 1970 dans des solutions d'agar [Hamburger et al., 1977], et depuis, de nombreuses techniques de culture 3D ont été mises au point.

1.4.3 Intérêt de la modélisation de tumeurs par des structures cellulaires 3D

Les modèles 3D de tumeur sont en constant développement depuis quelques décennies, puisqu'ils permettent de reproduire et étudier une ou plusieurs des complexités du TME naturel détaillé précédemment. Des études montrent d'ailleurs des différences significatives en ce qui concerne la réponse aux traitements sur des cultures 2D en comparaison avec des modèles 3D, pour lesquels les résultats obtenus sont plus proches de ceux obtenus *in vivo* [Huber et al., 2016].

Ces modèles ont de nombreux avantages, comme le fait de pouvoir être composés de différents types cellulaires, aussi bien sains que cancéreux, afin de reproduire au mieux le TME. De plus, l'utilisation de modèles 3D permet de réaliser un premier tri *in vitro* des traitements

potentiels sans avoir recours à des expérimentations animales, qui peuvent être éthiquement discutables et dont les modèles, souvent immunodéprimés et d'une autre espèce que la nôtre, ne sont pas forcément représentatifs de ce qui se passe pour l'espèce humaine. Cette démarche est appelée 3R pour "Remplacement, Raffinement, Réduction" [Fitzgerald et al., 2015] (figure 1.14).

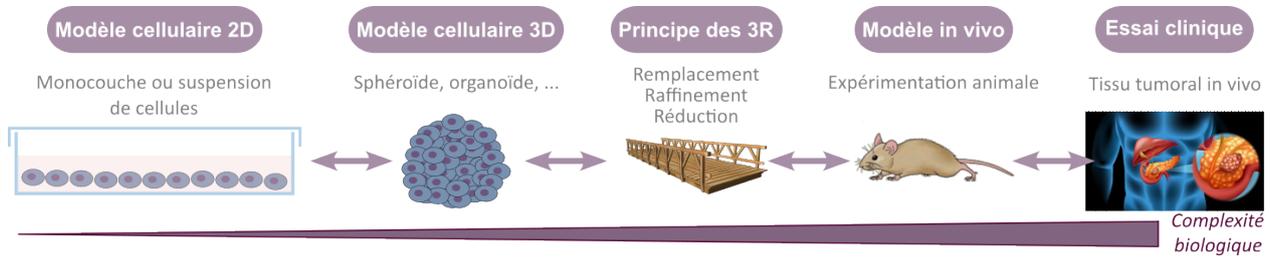


FIGURE 1.14 – Les différents modèles d'étude des tumeurs, de la culture cellulaire aux essais cliniques (inspiré de [Fitzgerald et al., 2015]).

Ces modèles 3D peuvent être utiles pour identifier les mauvais candidats de médicaments lors de l'étape préclinique ou au contraire les médicaments prometteurs qui échoueraient dans des essais cellulaires conventionnels en 2D [Hirschhaeuser et al., 2010]. Ils ouvrent même la voie à la médecine personnalisée, car ils peuvent être produits directement à partir de cellules de patients, afin de cribler de nombreux médicaments en parallèle in vitro et ainsi d'avoir une solution thérapeutique plus adaptée au patient, puisque tous les patients ne réagissent pas de la même manière aux traitements. Une comparaison des modèles 2D et 3D est réalisée dans le tableau 1.1.

Type de culture	Avantages	Inconvénients
2D	<ul style="list-style-type: none"> Croissance rapide Facile à manipuler Beaucoup de techniques d'analyse et facilité d'interprétation des résultats Faible coût 	<ul style="list-style-type: none"> Absence de gradient d'accès aux nutriments et à l'oxygène Manque d'interactions cellule-cellule Absence de matrice extracellulaire Profil génétique modifié par rapport à l'in vivo
3D	<ul style="list-style-type: none"> Gradients de nutriments et d'oxygène Interactions cellule-cellule Possibilité de reproduire la matrice extracellulaire Faible pénétration des médicaments mieux reproduite 	<ul style="list-style-type: none"> Coût élevé Techniques d'analyses complexes à mettre en place Manque de reproductibilité

TABLE 1.1 – Comparaison des avantages et inconvénients des cultures 2D et 3D, adapté de [Pinto et al., 2020].

Différents modèles 3D existent, avec une complexité croissante [Pape et al., 2021, Modi et al., 2021] (figure 1.15,a) :

- Les sphéroïdes, des agrégats cellulaires 3D compacts et de forme sphérique présentant beaucoup de contacts cellule-cellule, qui permettent d'obtenir une structure proche de l'in vivo avec des cellules prolifératives, quiescentes et nécrotiques, à cause de la présence de gradients de concentration de nutriments et d'oxygène (figure 1.15,b). Ils peuvent être composés d'un seul type de cellule (sphéroïde monotypique) ou de plusieurs types cellulaires en co-culture (sphéroïde hétérotypique), pour mieux représenter la diversité

présente *in vivo* dans le TME. Ils peuvent également être produits en présence de matrice synthétique ou naturelle, bio-imprimée dans certains cas, pour favoriser la reproduction de la MEC présente *in vivo*. Comme les sphéroïdes sont le modèle 3D sur lequel cette thèse se concentre, leurs méthodes de production sont détaillées dans la section suivante.

- Les organoïdes et organes-sur-puces, qui ont pour but de mieux reproduire le phénotype d'un type de tissu ou organe en particulier, en utilisant le plus souvent des cellules issues de patients directement, et non pas des lignées commerciales.
- Les tumoroïdes, qui sont des organoïdes uniquement cancéreux permettant de reproduire un type de tumeur en particulier, et notamment sa morphologie, qui n'est pas forcément sphérique.
- Les modèles entre *in vitro* et préclinique, utilisant des tissus décellularisés pour la culture de cellules de patients ou bien basés sur l'implantation de sphéroïdes ou de tissus tumoraux de patients humains chez la souris (xénogreffe).

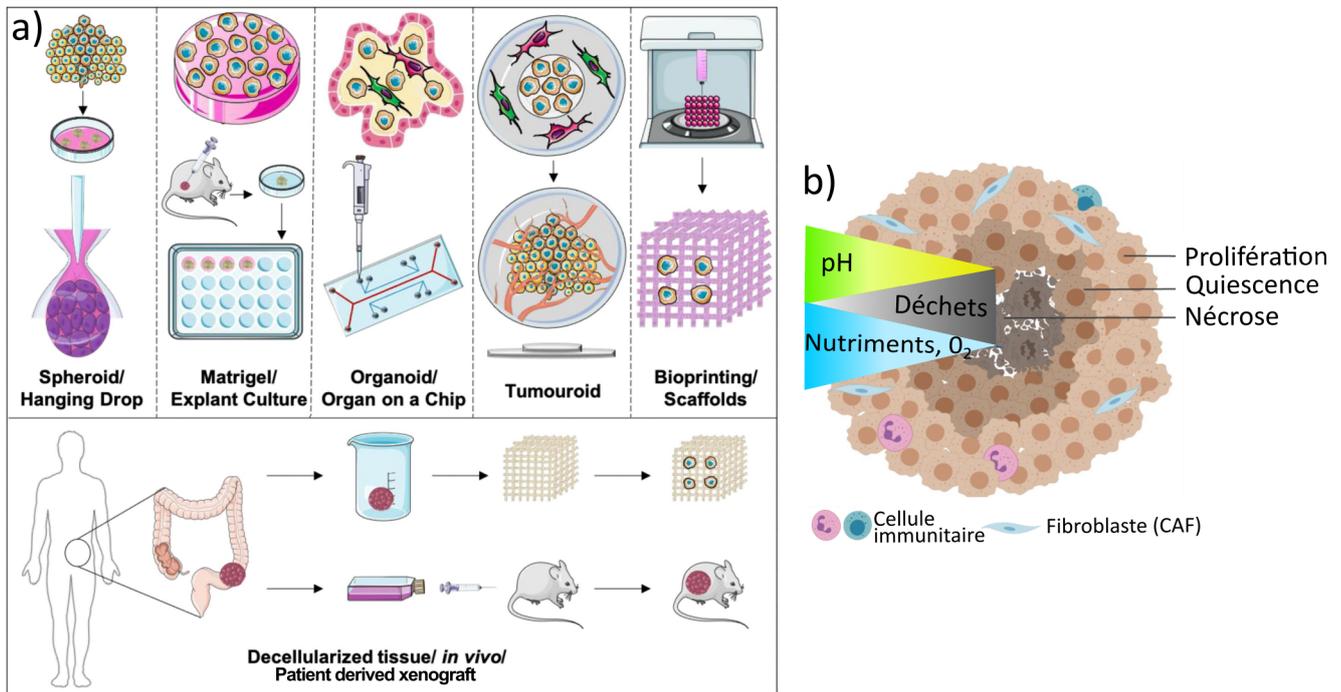
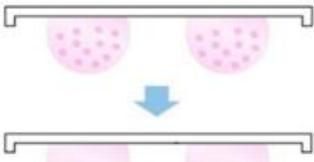
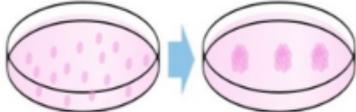
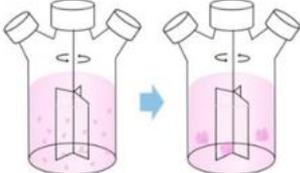
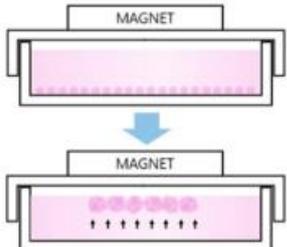
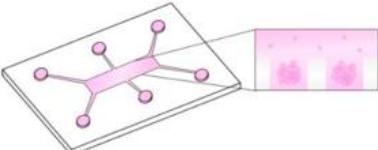
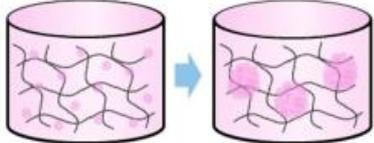


FIGURE 1.15 – (a) Les principaux modèles 3D de tissus tumoraux *in vitro*, adapté de [Pape et al., 2021]. (b) Composition et organisation d'un sphéroïde, adapté de [Pinto et al., 2020].

1.4.4 Méthodes de production de sphéroïdes

Face à l'intérêt grandissant pour l'utilisation des sphéroïdes comme modèle 3D de tissu, de nombreuses méthodes de production ont été développées (tableau ci-après), avec chacune ses avantages et inconvénients [Katt et al., 2016, Ryu et al., 2019]. Des efforts ont également été effectués dans le but de permettre la production de sphéroïdes à grande échelle et de manière répétable.

Méthode de production	Avantages	Inconvénients	Références
<p><i>Méthode de la goutte pendante</i></p> 	<p>Obtention de plusieurs centaines de sphéroïdes de taille relativement uniforme à partir d'un faible nombre de cellules</p>	<p>Technique chronophage Changement de milieu et manipulation difficile (faible volume < 50 µL)</p>	<p>[Kelm et al., 2003, Zhang et al., 2016, Gao et al., 2019]</p>
<p><i>Formation spontanée sur substrat peu adhérent</i></p> 	<p>Obtention de plusieurs centaines de sphéroïdes Compatible avec techniques classiques (plaque multi-puits)</p>	<p>Chronophage si fait soi-même et onéreux si acheté Manque de reproductibilité en taille et forme des sphéroïdes</p>	<p>[Ivascu et al., 2006]</p>
<p><i>Agrégation par agitation</i></p> 	<p>Changement de milieu facilité Peut favoriser l'expression de certains gènes sous micro-gravité</p>	<p>Force de cisaillement élevée Disparité en taille Pas adapté aux techniques d'observation et d'analyse classiques</p>	<p>[Schwarz et al., 1992]</p>
<p><i>Lévitiation magnétique</i></p> 	<p>Favorise les interactions entre cellules dans le cadre de la co-culture</p>	<p>Pas adapté aux techniques d'observation et d'analyse classiques Technique onéreuse et requérant des équipements spécifiques Présence/Toxicité des particules magnétiques</p>	<p>[Souza et al., 2010]</p>
<p><i>Systèmes microfluidiques</i></p> 	<p>Contrôle du micro-environnement des cellules pour des modèles plus réalistes Réduction de la quantité de réactifs et de cellules Bonne reproductibilité et obtention d'un grand nombre de sphéroïdes dans certains cas</p>	<p>Technique complexe et onéreuse Requiert des équipements spécifiques Pas toujours adapté aux techniques d'analyse classiques</p>	<p>[Powers et al., 2002, Torisawa et al., 2007, Kimura et al., 2008, Dolznig et al., 2011, Jeong et al., 2016]</p>
<p><i>Micropuits et encapsulation</i></p> 	<p>Obtention d'un grand nombre de sphéroïdes réguliers Compatibilité avec des plaque multi-puits pour certains Micro-environnement plus proche de l'in vivo</p>	<p>Technique onéreuse Technique chronophage pour élaborer les protocoles de culture</p>	<p>[Tang et al., 2016, Fang et al., 2019, Prunet et al., 2020, Fu et al., 2023]</p>

1.4.4.1 Méthode de la goutte pendante

Cette méthode était utilisée à l'origine en microbiologie pour étudier les bactéries dans un environnement confiné. Elle consiste à déposer une goutte de solution cellulaire sur l'intérieur du couvercle d'une boîte de Pétri que l'on retourne afin que les cellules s'accumulent en bas de la goutte, à l'interface air/liquide [W. Zhang et al., 2016, Gao et al., 2019]. Du tampon phosphate salin (PBS) doit être placé dans la boîte de Pétri afin que la goutte ne sèche pas. Cette méthode est simple car elle ne requiert pas d'équipement particulier autre que ceux disponibles classiquement dans les laboratoires, ni l'utilisation d'agent chimique pour favoriser l'agrégation des cellules. De plus, il existe des plaques permettant la formation de plusieurs centaines de sphéroïdes en même temps [Tung et al., 2011] et cette méthode s'applique pour de nombreuses lignées cellulaires [Kelm et al., 2003]. La formation de sphéroïdes avec cette méthode permet d'obtenir une répartition de taille relativement uniforme (10 à 15% de variation [Ryu et al., 2019]) et à partir d'un faible nombre de cellules. Cependant le changement de milieu peut perturber les sphéroïdes, étant donné le faible volume des gouttes (moins de 50 μL).

1.4.4.2 Formation spontanée

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une couche de substrat inerte ne favorisant pas l'adhésion des cellules pour les contraindre à s'agréger les unes avec les autres. Les substrats classiquement utilisés sont le méthacrylate de poly-2-hydroxyéthyle (poly-HEMA) et l'agarose. Cette méthode est facile à utiliser et permet de produire un grand nombre de sphéroïdes d'un coup, notamment avec les plaques multi-puits (96 puits) à faible adhérence, composées de puits ronds ou coniques [Ivascu et al., 2006]. Cependant, réaliser soi-même le revêtement des puits est chronophage, les plaques commerciales sont assez onéreuses, et la distribution en taille des sphéroïdes est moins maîtrisée (40 à 60% de variation [Ryu et al., 2019]).

1.4.4.3 Agrégation par agitation

Le principe est de maintenir les cellules en suspension dans une flasque ou un bioréacteur permettant une agitation constante, soit en agitant avec un barreau magnétique ou une tige, soit en agitant directement le contenant. À l'origine, cela a été étudié par la NASA (Administration Nationale de l'Aéronautique et de l'Espace) pour voir l'effet des voyages spatiaux sur des cellules et tissus en culture [Schwarz et al., 1992]. Le changement de milieu est facilité mais il est nécessaire de trier les sphéroïdes pour sélectionner leur taille car la répartition en taille est assez inhomogène, et la force de cisaillement appliquée peut modifier la physiologie des sphéroïdes [Hoarau-Véchet et al., 2018]. Pour certains types cellulaires comme les cellules souches mésenchymateuses, le maintien en microgravité peut influencer l'expression de certains gènes et favoriser leur différenciation, d'où l'intérêt pour cette méthode [Ryu et al., 2019].

1.4.4.4 Agrégation par méthode physique

Une méthode plus récente consiste à utiliser des particules magnétiques mélangées aux cellules pour permettre leur agrégation sous l'application d'une force magnétique. Cette méthode a été rapportée pour la première fois par [Souza et al., 2010]. Ils ont utilisé un hydrogel contenant des nanoparticules d'or et d'oxyde de fer et un aimant en néodyme pour obtenir une agrégation en quelques heures, et des sphéroïdes de taille convenable à leur étude en quelques jours. Cela est particulièrement intéressant dans le cadre de la co-culture pour favoriser les contacts entre les différents types cellulaires. Cependant, cette manipulation des cellules peut influencer la structure des sphéroïdes et les particules peuvent être toxiques à forte concentration, et le protocole est onéreux.

Par ailleurs, des techniques reposant sur d'autres méthodes physiques sans particules magnétiques ont été utilisées pour réaliser des agrégats de cellules. On peut citer la diélectrophorèse [Menad et al., 2015 ; Cottet, Kehren, Lasli et al., 2019], une méthode consistant à appliquer une force pour déplacer les cellules, rendue possible par leur polarisation sous l'effet d'un champ électrique alternatif non uniforme. Une autre méthode consiste quant à elle à utiliser des ondes acoustiques de surface pour manipuler les cellules et les assembler en agrégats [Guo et al., 2016].

1.4.4.5 Systèmes microfluidiques

La microfluidique est la science de l'étude du comportement des fluides de très faible volume ($< \mu\text{L}$). Les systèmes de culture de sphéroïdes basés sur la microfluidique sont avantageux car ils permettent l'utilisation d'un faible nombre de cellules, la réduction de la quantité de réactifs, l'observation in situ s'ils sont transparents, et sont parfois dotés de la capacité de caractériser l'état des sphéroïdes avec l'intégration de capteurs [Tung et al., 2011, Hoarau-Véchet et al., 2018]. La perfusion continue de milieu permet également de contrôler l'environnement des cellules. Des microsystèmes relativement simples existent, avec un canal dans lequel les sphéroïdes sont cultivés sous perfusion [Torisawa et al., 2007], mais il est également possible de créer plusieurs micro-canaux avec des membranes poreuses aux interfaces afin d'étudier l'interaction indirecte de plusieurs types cellulaires [Jeong et al., 2016], dans le but de créer des modèles plus complexes appelés "organes-sur-puces", de poumon [Dolznig et al., 2011], foie [Powers et al., 2002] ou encore intestin [Kimura et al., 2008] par exemple. Les principaux inconvénients sont la complexité de ces microsystèmes, leur coût et la faible adaptabilité à des techniques classiques comme les bio-marquages pour l'analyse des sphéroïdes après leur culture.

1.4.4.6 Micropuits et encapsulation dans des biomatériaux

Une méthode dérivée de celle des plaques multi-puits à faible adhérence a été développée au cours des dernières années. Elle est basée sur la structuration d'une surface non-adhérente avec des puits à l'échelle micro-métrique (voir figure 1.16) par moulage [Tang et al., 2016] ou tamponnage [Liao et al., 2019]. Cette surface est souvent faite de matériaux inertes comme le polydiméthylsiloxane (PDMS) [Fu et al., 2023] ou encore l'agarose [Tang et al., 2016, Fang et al., 2019]. Ces systèmes de micropuits peuvent être intégrés dans des plaques multi-puits classiques de 96 puits par exemple, afin de permettre des analyses à haut rendement et la production de sphéroïdes en plus grand nombre, ou bien intégrés dans des plateformes microfluidiques.

L'approche développée par l'équipe Biophysique de l'Institut Lumière Matière (ILM) et utilisée dans ces travaux permet de remédier aux inconvénients des techniques classiques de production de sphéroïdes. Elle consiste à former des sphéroïdes dans un réseau de micropuits moulés dans un hydrogel d'agarose. Cela permet la production de sphéroïdes de taille, forme et emplacement contrôlés et reproductibles [Rivière et al., 2018]. Les propriétés mécaniques de cet hydrogel sont adaptables, ce qui permet de recréer un micro-environnement aux propriétés proches de celles observées in vivo (rigidité de 1.5 kPa [Prunet et al., 2020]), propice au développement des sphéroïdes. Sa nature poreuse permet de laisser passer les nutriments et l'oxygène, et de changer le milieu facilement sans perturber les sphéroïdes. Ce système est compatible avec l'analyse des sphéroïdes par microscopie et la réalisation d'essais biologiques comme les marquages fluorescents, sans avoir besoin de manipuler les sphéroïdes.

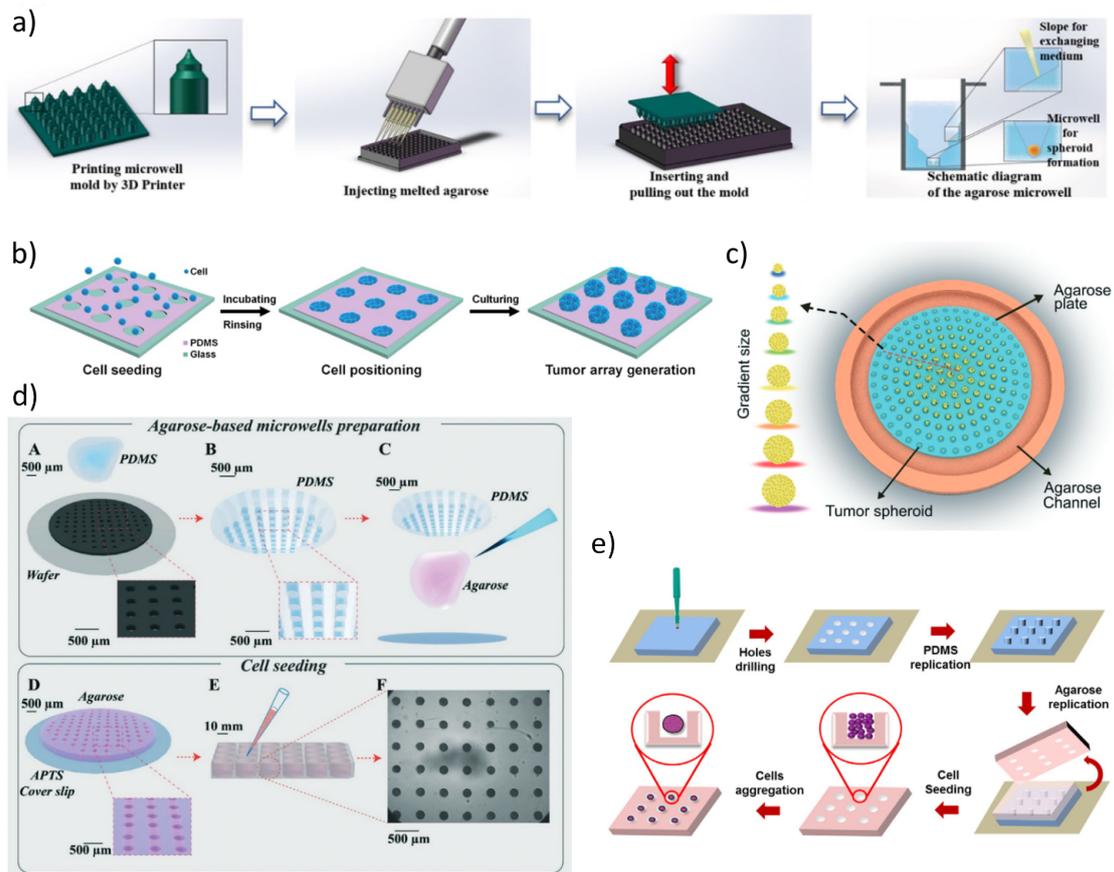


FIGURE 1.16 – Exemples de techniques de production de sphéroïdes basées sur l'utilisation de micropuits en agarose ou PDMS. (a) Tamponnage d'agarose dans une plaque multi-puits [Liao et al., 2019]. (b) Culture dans des micropuits structurés dans une fine couche de PDMS [Fu et al., 2023]. (c-e) Différentes méthodes de production de sphéroïdes dans un réseau de micropuits moulés dans un hydrogel d'agarose (c) [Fang et al., 2019] (d) [Goodarzi et al., 2021] (e) [Tang et al., 2016].

Plus récemment, la recherche s'est tournée vers l'utilisation de matrice en biomatériaux jouant le rôle de support dans lequel sont emprisonnées des cellules qui s'associent pour former des sphéroïdes. Ce support est souvent à base de collagène, très présent in vivo dans la matrice extracellulaire, puisqu'il contribue à lui donner ses propriétés mécaniques, régule l'adhésion des cellules et est impliqué dans leur migration [Rozario et al., 2010]. Cela permet de mieux reproduire l'organisation et les fonctions des cellules, ainsi que leur réponse aux traitements testés. Un exemple de matrice commerciale très couramment utilisée est le Matrigel [Laperrouzaz et al., 2018], composé de protéines dérivées de l'environnement d'une tumeur de souris et de facteurs de croissance [Kleinman et al., 2005]. Cependant, cette technique confère un faible contrôle en taille et en emplacement des sphéroïdes, et les variations de propriétés de ces matrices naturelles peuvent entraîner un manque de reproductibilité des résultats. De plus, la présence de facteurs de croissance provenant de l'animal à cause de la nature même de la production de ces matrices peut être un problème pour l'interprétation des résultats, si le but est de tester des traitements visant à être administrés chez l'humain. Des équipes se sont donc tournées vers des matrices synthétiques ou semi-synthétiques, respectivement le polyéthylène glycol (PEG) [Singh et al., 2016] ou l'acide hyaluronique [Rice et al., 2013, Sieni et al., 2020] par exemple.

D'autres équipes ont également essayé de réaliser un support sous forme d'une bio-encre afin de réaliser une bio-impression de structures cellulaires en 3D. Cela pourrait permettre de remédier au principal inconvénient des sphéroïdes formés avec les autres techniques, à savoir qu'elles ne permettent pas de recréer la vascularisation de ces tissus synthétiques [Pourchet

et al., 2019]. Cependant, le coût, la faible viabilité cellulaire et la résolution sont autant de points qui ralentissent le développement de cette technique.

1.5 Les technologies pour l'étude de l'EPN in vitro

Il existe plusieurs techniques permettant l'EPN des sphéroïdes ainsi produits, qui vont de l'utilisation d'un appareil commercial au développement d'électrodes spécifiques reliées à un système permettant l'application du champ, voire l'intégration du dispositif d'EPN dans le microsystème permettant la culture des cellules.

1.5.1 Électroporateurs commerciaux

La technique la plus ancienne est l'utilisation d'électroporateurs commerciaux pour électroporer des suspensions de cellules [Larkin et al., 2007, Frandsen, Gissel et al., 2014] ou des sphéroïdes [Canatella et al., 2004, Mellor et al., 2006, Laperrousaz et al., 2018]. Leur principe est basé sur l'utilisation d'une cuvette composée de deux électrodes parallèles, le plus souvent en acier inoxydable, dans laquelle la solution de cellules ou de sphéroïdes à électroporer est introduite (figure 1.17). Cette technique est relativement facile à mettre en place, même si le coût de ces appareils est élevé, mais l'inconvénient principal est qu'elle nécessite une manipulation des sphéroïdes, ce qui risque de les endommager [Fiorentzis, Viestenz, Seitz et al., 2020]. De plus, leur distribution dans cette cuvette est aléatoire, ce qui peut conduire à des différences de champ perçu d'un sphéroïde à l'autre et à un manque de reproductibilité dû à l'agrégation des sphéroïdes entre eux dans la cuvette. Une autre limitation concerne les paramètres d'EPN avec ce type d'appareil, dont le choix est limité, notamment en termes de forme d'onde, et le fait que les électrodes sont assez éloignées (plusieurs mm), ce qui implique d'appliquer des différences de potentiel élevées pour obtenir le champ permettant l'EPN (plusieurs centaines de V/cm).

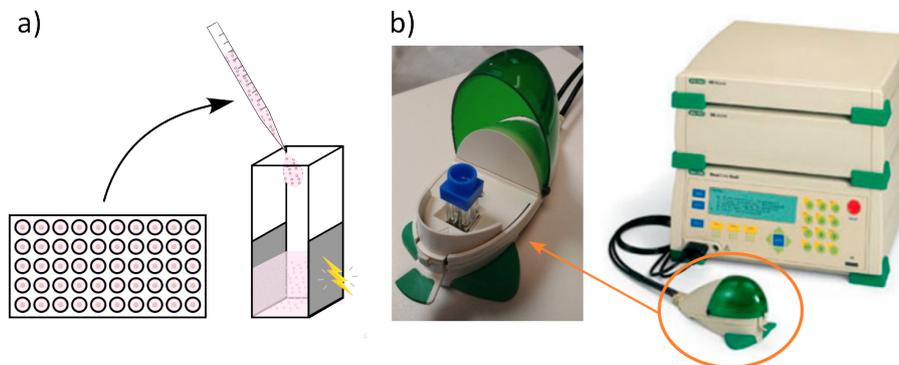


FIGURE 1.17 – (a) Schéma de principe d'une cuvette d'électroporateur commercial. (b) Exemple d'électroporateur commercial, le Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, États-Unis).

1.5.2 Systèmes d'électrodes portatives

Afin d'éviter la manipulation des cellules, certaines équipes ont développé des systèmes d'électrodes portatives permettant de réaliser l'EPN directement dans une boîte de Pétri pour les cellules adhérentes [Dermol et al., 2014] (figure 1.18,a), ou dans les puits d'une plaque multi-puits pour les sphéroïdes [Fiorentzis, Viestenz, Seitz et al., 2020] (figure 1.18,b). La distance inter-électrode peut être adaptée à la configuration pour réduire le potentiel à appliquer. Ce type d'électrode a tout de même pour inconvénients une difficulté du contrôle du positionnement, qui est manuel, et une possible perturbation des cellules ou sphéroïdes directement en contact

avec les électrodes. De plus, dans le cas d'électrodes sous forme de fil, cela peut entraîner une inhomogénéité du champ appliqué. Pour les électrodes sous forme de deux plaques parallèles, le protocole est très chronophage si l'on veut électroporer plusieurs dizaines de sphéroïdes pour obtenir un nombre de données suffisant pour réaliser des études statistiques, puisqu'il est nécessaire de réaliser l'EPN dans chaque puits contenant un seul sphéroïde.

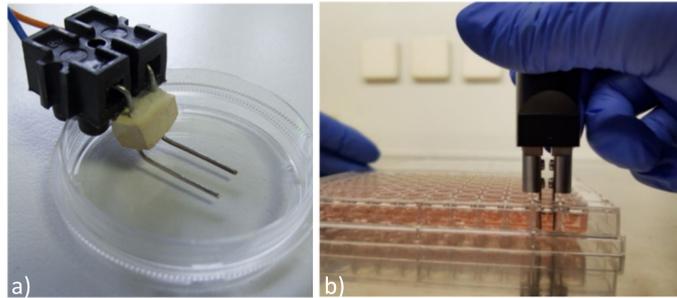


FIGURE 1.18 – Exemples d'électrodes portatives. (a) Électrodes en fil d'alliage platine-iridium pour boîte de Pétri [Dermol et al., 2014]. (b) Électrodes sous forme de plaques d'acier inoxydable parallèles pour plaque multi-puits [Fiorentzis, Viestenz, Seitz et al., 2020].

1.5.3 Dispositifs microfluidiques : approche « laboratoire sur puce »

Pour réaliser l'EPN *in situ* et mieux contrôler l'emplacement des électrodes, de nombreuses équipes ont développé des microsystèmes permettant l'EPN de cellules ou sphéroïdes. Ils sont basés sur l'utilisation de la microfluidique, permettant de réduire les quantités de réactifs et de cellules, comme cela a été vu dans la partie 1.4.4.5. Comme l'EPN nécessite un champ électrique élevé, il existe deux stratégies utilisées dans les microsystèmes pour réduire le potentiel à appliquer : réduire la distance entre les électrodes, ou focaliser le courant électrique en utilisant la constriction du flux [Fox et al., 2006]. Cela permet l'utilisation de dispositifs électriques plus simples pour l'application des impulsions. La miniaturisation du système entraîne souvent un large ratio surface sur volume qui peut, selon les configurations, permettre une dissipation plus rapide de la chaleur générée par effet Joule par unité de surface [Fox et al., 2006].

1.5.3.1 Microsystèmes pour cellules adhérentes ou en suspension

L'EPN sur des cellules en suspension en utilisant un électroporateur disponible dans le commerce nécessite de détacher les cellules de la surface sur laquelle elles sont mises en culture *in vitro*, par un traitement enzymatique. Cela peut avoir des effets néfastes sur le fonctionnement métabolique des cellules, et altérer les protéines membranaires ou encore le cytosquelette [Müller, 2003]. Il existe de nombreuses stratégies et microsystèmes pour électroporer des cellules adhérentes ou en suspension. Les cellules adhérentes sont le plus souvent cultivées sur des matériaux conducteurs servant d'électrodes, recouverts parfois d'une couche de polymère pour favoriser l'adhésion des cellules. Les configurations d'électrodes sont diverses : parallèles [Yamauchi et al., 2004] (figure 1.19,a), coplanaires [Jen et al., 2004] (figure 1.19,b), ou encore en 3D [Lu et al., 2005] (figure 1.19,c). La présence de micro-canaux permet aussi d'utiliser le flux pour améliorer les performances d'EPN, par exemple en faisant tourner les cellules pour électroporer une plus grande partie de la membrane [Wang et al., 2010] (figure 1.19,d). Il est également possible d'électroporer plusieurs zones en parallèle avec des conditions différentes en utilisant des électrodes structurées pour compartimenter l'EPN, grâce aux techniques de micro-fabrication (voir partie 2.3.2) [Xu et al., 2011, Bian et al., 2017] (figure 1.19,e et f). Ces différentes stratégies sont illustrées sur la figure 1.19.

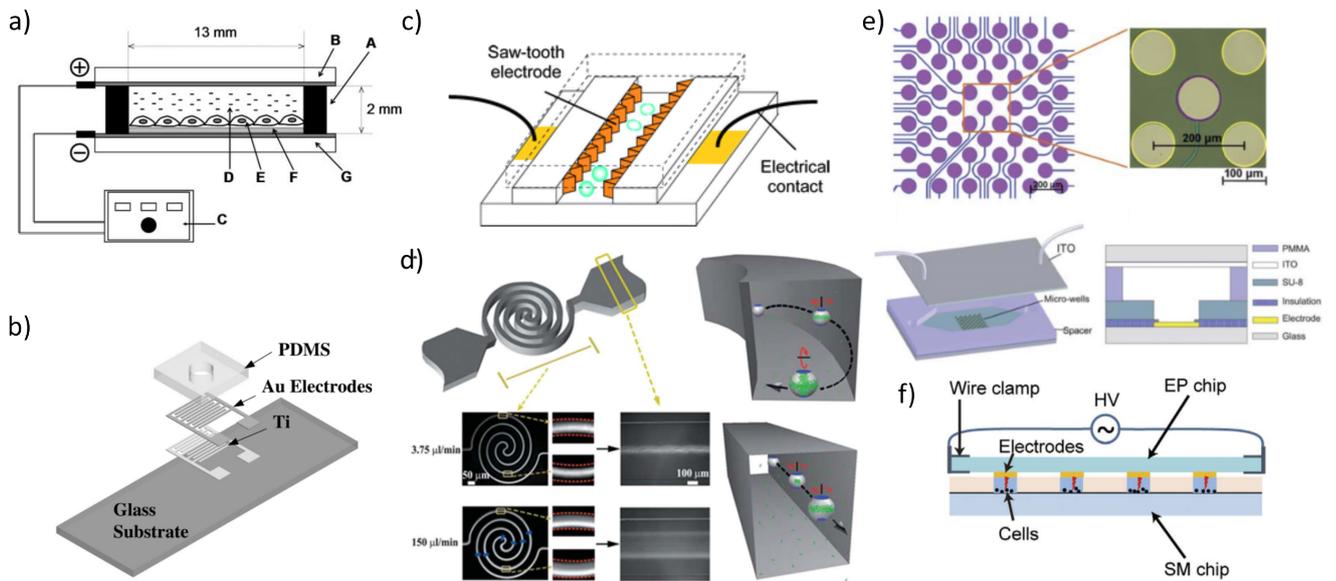


FIGURE 1.19 – Illustrations de différents microsystèmes pour l’EPN de cellules adhérentes ou en suspension. (a) Configuration d’électrodes parallèles avec culture sur une des deux électrodes [Yamauchi et al., 2004]. (b) Culture sur électrodes coplanaires [Jen et al., 2004]. (c) Canal avec électrodes en 3D et EPN sur suspensions cellulaires [Lu et al., 2005]. (d) EPN dans un canal induisant un vortex sur les cellules en suspension [Wang et al., 2010]. (e) EPN compartimentée avec culture de cellules sur électrodes structurées et contre-électrode parallèle [Xu et al., 2011]. (f) EPN compartimentée avec électrodes coplanaires placées au-dessus de micropuits permettant la culture des cellules [Bian et al., 2017].

1.5.3.2 Microsystèmes pour les sphéroïdes

Si de nombreux microsystèmes existent pour électroporer des cellules adhérentes ou en suspension d’un côté, ou pour produire des agrégats cellulaires 3D de l’autre, très peu permettent à la fois culture de sphéroïdes et EPN, alors même que l’intérêt des modèles 3D pour mieux mimer les tissus *in vivo* a été démontré (voir partie 1.4.3). On peut citer l’approche de [Zhu et al., 2019] (figure 1.20), centrée sur la conception d’un prototype en impression 3D, avec la particularité de créer des pièces moulées en PDMS qui s’assemblent comme des pièces de LEGO®. Les cellules sont mises en culture dans une matrice en hydrogel de peptide et s’agrègent pour former des sphéroïdes. Grâce à la présence de 4 électrodes parallèles 2 à 2 et verticales, le champ appliqué peut être multidirectionnel afin de faciliter la transfection de plasmides.

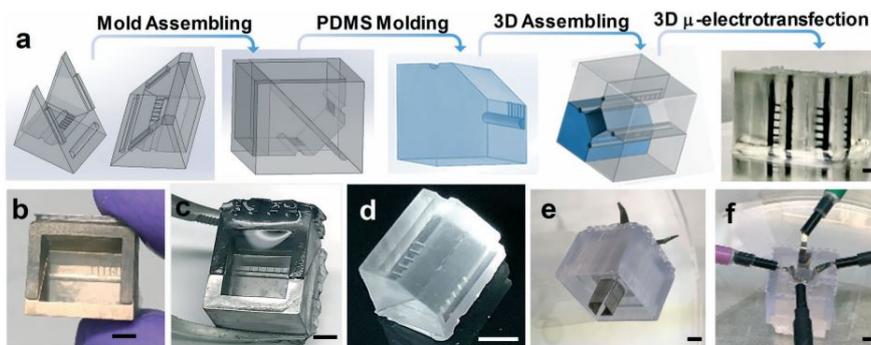


FIGURE 1.20 – Étapes (a à f) de fabrication du microsystème d’EPN de l’équipe de [Zhu et al., 2019], CAO (haut) et photos (bas).

Cependant, les sphéroïdes produits dans ce microsystème n’ont pas un emplacement et une répartition en taille homogène et reproductible. Le dispositif développé dans le cadre de cette

thèse permet la culture, le suivi et l'électroporation de plusieurs centaines de sphéroïdes en parallèle, de taille et emplacement contrôlés, tout en évitant leur manipulation. En effet, les sphéroïdes sont produits dans le réseau de micropuits en agarose précédemment décrit (figure 1.16,d), intégré à un dispositif microfluidique basé sur l'utilisation de deux électrodes parallèles transparentes, pour permettre également une observation *in situ*. La fabrication et la preuve de concept de l'efficacité de ce microsysteme sont présentées dans le chapitre 3.

1.5.4 La problématique du choix des électrodes dans le cadre de l'EPN

Lorsque l'on souhaite réaliser des tests d'EPN sur des échantillons biologiques, et en particulier lors de la conception de microsystemes d'EPN, le choix des électrodes est un paramètre important, puisque leur géométrie influence la distribution du champ électrique. Il est également important de se pencher sur le choix du matériau de ces électrodes et d'étudier l'impact de l'EPN sur les performances des électrodes, puisque leur dégradation peut entraîner une modification du champ électrique effectivement perçu par les cellules. En effet, le potentiel ; la forme, durée et fréquence de l'impulsion appliquée ; la géométrie de la chambre ; le matériau de l'électrode ; ou encore les propriétés de l'électrolyte sont autant de paramètres pouvant influencer les réactions électrochimiques se produisant aux électrodes. Lorsqu'un courant passe dans la double couche électrique à l'interface électrode-électrolyte (voir partie 2.3.1.3), à cause de l'application d'un champ électrique pulsé, cela peut avoir pour effet de charger le condensateur qu'est cette double couche. Si la différence de potentiel résultante dans la double couche dépasse un certain potentiel seuil, de l'ordre de 1 à 2 V pour les matériaux d'électrode les plus couramment utilisés, des réactions d'oxydoréduction peuvent alors avoir lieu : oxydation à l'anode (couple avec la plus grande valeur négative de potentiel de demi-réaction) et réduction à la cathode (couple avec la plus grande valeur positive de potentiel de demi-réaction). Elles peuvent entraîner une cascade d'effets néfastes pour les électrodes [Pataro et al., 2020], illustrés sur la figure 1.21 grâce aux travaux de [Mahnič-Kalamiza et al., 2020].

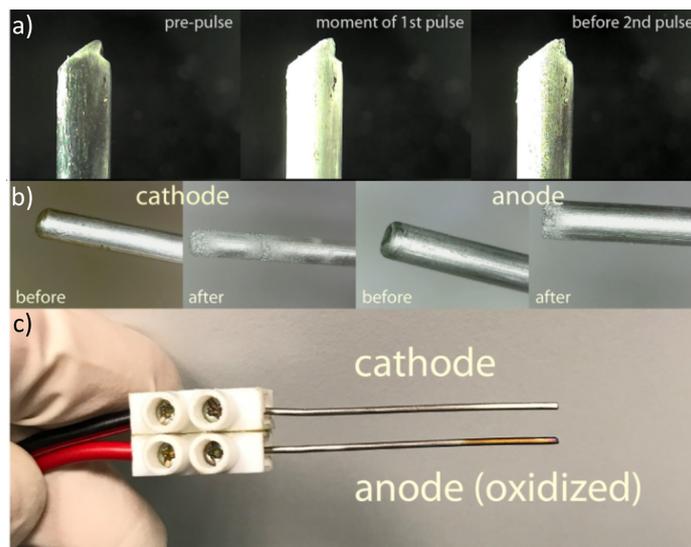


FIGURE 1.21 – Photos d'électrodes illustrant les réactions électrochimiques lors de l'application d'impulsions électriques avec pour électrolyte une solution saline à 0.9% [Mahnič-Kalamiza et al., 2020]. (a) Apparition de bulles d'hydrogène sur la cathode en or après application d'impulsions. (b) Mise en évidence de la corrosion métallique (aluminium) suite à l'utilisation intensive des électrodes. (c) Mise en évidence de l'oxydation de l'anode (titane) sur la partie immergée dans l'électrolyte.

Si la différence de potentiel est supérieure au potentiel redox de l'électrolyte, cela peut entraîner des phénomènes d'électrolyse (figure 1.21,a), principalement de l'eau présente dans l'électrolyte. Cela peut favoriser la corrosion, principalement de la cathode (figure 1.21,b) ou la formation d'oxydes isolants, principalement sur l'anode (figure 1.21,c).

De plus, cela entraîne la formation de bulles (O_2 , H_2 , CO_2 , Cl_2 ...) sur les électrodes, dont les propriétés diélectriques sont très différentes du milieu liquide, ce qui peut diminuer fortement l'intensité du champ électrique (figure 1.21,a). La plus faible permittivité diélectrique engendrée peut notamment favoriser le claquage et la formation d'arc électrique, ce qui réduit la durée de vie des équipements.

Ces phénomènes peuvent être limités en choisissant bien les paramètres de l'impulsion ou encore le matériau de l'électrode. La décharge de la double couche entre l'application de plusieurs impulsions est notamment très importante, ce qui est le cas lors de l'application d'impulsions bipolaires. Cela permet de réduire les réactions électrochimiques en changeant la polarité des électrodes. À l'inverse, afin de limiter les réactions électrochimiques aux électrodes lors de l'application d'impulsions unipolaires, il est important de bien choisir la fréquence de répétition des impulsions en fonction du temps de chargement de la double couche, qui dépend d'une part de la densité de courant, liée au potentiel appliqué, de la conductivité du milieu et de la géométrie de la chambre, paramètres ayant un impact sur la résistance électrique intrinsèque de la chambre, et d'autre part des propriétés électrochimiques du matériau de l'électrode utilisée. Ainsi plus le champ est intense, plus la densité de courant est élevée donc plus la durée des impulsions doit être courte. Les électrodes doivent également être remplacées régulièrement du fait de leur dégradation. Il est aussi possible de jouer sur la capacité de la double couche en choisissant bien le matériau de l'électrode, pour avoir une capacité élevée (acier inoxydable < platine < titane < carbone).

De plus, les risques d'électrolyse peuvent aussi être limités en réduisant la distance entre les cellules et les électrodes, ce qui permet de diminuer la tension appliquée tout en gardant le même champ perçu par les cellules. D'autres méthodes possibles consistent à diminuer la conductivité du milieu [Fox et al., 2006], ou encore à utiliser la constriction des canaux permettant d'amplifier localement le champ électrique [Khine et al., 2005].

Une possibilité pour réduire la corrosion est de passiver les électrodes en les recouvrant d'un film de polymère, comme le Téflon par exemple, ou d'un oxyde, comme le SiO_2 , même s'il est possible que cela altère la forme de l'impulsion, en agissant comme un filtre passe-haut. C'est ce que font [Santra et al., 2016] dans leurs travaux sur des électrodes en ITO, en les recouvrant de SiO_2 . Le seul risque est d'avoir une chute de tension trop importante et ainsi de réduire considérablement le champ transmis dans la chambre. Pour avoir une chute de tension moins importante, il faut privilégier des matériaux avec une haute permittivité, plus proche de celle de l'électrolyte (qui est d'environ 81 comme celle de l'eau). Il est aussi possible de choisir des matériaux plus stables chimiquement donc plus résistants à la corrosion, comme le titane.

Les produits dérivés de l'électrolyse et de la corrosion peuvent également générer des radicaux, espèces très réactives pouvant être néfastes pour les composés biologiques présents dans l'électrolyte, mais aussi entraîner l'hydrolyse de l'eau et ainsi diminuer le pH de l'électrolyte.

Un dernier effet de l'application d'impulsions électriques sur les électrodes qui est rapporté est l'encrassement des électrodes (fouling) dû au dépôt d'espèces telles que des protéines, particules chargées, qui migrent vers l'électrode de charge opposée sous l'effet du phénomène d'électrophorèse, et enrichissent la composition de la double couche à cet endroit.

Conclusion

Dans ce premier chapitre, nous avons vu que l'électroporation (EPN), une méthode physique permettant de perméabiliser des cellules grâce à l'application de champs électriques pulsés, disposait d'un grand champ d'applications en agroalimentaire et dans le domaine biomédical. Cette thèse se concentre sur les applications de l'EPN en oncologie, avec l'électrochimiothérapie (ECT), qui permet de réduire les effets secondaires par rapport aux chimiothérapies classiques puisque les propriétés des anticancéreux utilisés les rendent inefficaces pour des cellules non perméabilisées. Même si ce traitement est déjà utilisé *in vivo* pour des tumeurs cutanées, son adaptation à une utilisation pour des tumeurs plus profondes nécessite de réaliser des tests *in vitro*. De plus, d'autres applications plus innovantes reposant sur l'EPN, comme l'électrotransfert de gènes, nécessitent également une meilleure compréhension du phénomène.

Pour cela, différents modèles existent, avec une complexité croissante, allant des cellules en 2D aux essais précliniques et cliniques. Parmi eux, les modèles 3D disposent de nombreux avantages, puisqu'ils permettent de prendre en compte les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire, qui sont d'une importance capitale dans le développement d'une tumeur. De plus, ils favorisent la réduction des essais animaux, posant des questions éthiques, et peuvent être développés à partir de cellules humaines voire de patients directement, permettant parfois plus de pertinence que les essais animaux. De nombreuses méthodes ont été développées pour produire ces agrégats 3D nommés sphéroïdes. Cependant, elles ne permettent pas toutes d'obtenir des sphéroïdes réguliers en taille, sont parfois très coûteuses et ne sont pas toutes adaptées à une analyse des sphéroïdes avec les techniques classiques en biologie. En ce qui concerne l'EPN de ces sphéroïdes, les techniques existantes, comme celles basées sur l'utilisation de cuvettes d'EPN ou d'électrodes portatives, nécessitent une manipulation des sphéroïdes ou sont chronophages.

Les microsystèmes permettant la culture des cellules et leur EPN permettent de pallier ces inconvénients, mais à notre connaissance, il n'existe pas de microsystème permettant la culture de sphéroïdes réguliers et leur EPN. L'objectif principal de cette thèse est donc de développer, caractériser et tester un tel microsystème.

Ce microsystème permet également de suivre les sphéroïdes par des méthodes optiques grâce à la transparence des électrodes, ce qui permet de déterminer l'efficacité d'EPN et de caractériser des propriétés des cellules comme la viabilité ou la prolifération, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant. De plus, comme ce microsystème comporte des électrodes permettant l'application du champ électrique pulsé, il permet aussi de réaliser des mesures d'impédance électrique afin de caractériser les propriétés électriques des objets étudiés. Ces mesures ouvrent la voie à l'adaptation du microsystème à une nouvelle utilisation en tant que capteur de la croissance ou de la viabilité des sphéroïdes qui y sont cultivés, avec cette méthode sans marquage et en temps réel. La présentation du principe de ces mesures et de leurs applications fait donc l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 2

MÉTHODES DE SUIVI ET D'ANALYSE DES SPHÉROÏDES : L'INTÉRÊT DE LA BIO-IMPÉDANCE

Sommaire

Introduction	34
2.1 État de l'art des méthodes de suivi et d'analyse de sphéroïdes et de leur EPN	34
2.1.1 Méthodes avec bio-marquage et détection	34
2.1.1.1 Cytométrie de flux	35
2.1.1.2 Techniques d'analyse optique	35
2.1.2 Méthodes sans marquage	38
2.2 Impédance électrique des milieux biologiques	39
2.2.1 Définition de l'impédance	39
2.2.2 Propriétés électriques des cellules	39
2.2.2.1 Permittivité et conductivité complexe : notions de relaxation et dispersion	39
2.2.2.2 Modèle électrique d'une cellule	40
2.2.2.3 Des cellules en suspension aux tissus biologiques	42
2.3 Principe de mesure de la bio-impédance	43
2.3.1 Importance des paramètres expérimentaux et des équipements de mesure	43
2.3.1.1 Signal de mesure	43
2.3.1.2 Température	44
2.3.1.3 Électrodes et interface avec l'électrolyte	44
2.3.1.4 Mesure différentielle	44
2.3.1.5 Configuration de mesure	45
2.3.2 Utilisation d'électrodes structurées	45
2.3.2.1 Réseau de micro-électrodes avec contre-électrode commune .	46
2.3.2.2 Électrodes interdigitées	46
2.4 Applications de la mesure de bio-impédance sur modèles cellulaires	47
2.4.1 Mesures sur cellules uniques : caractérisation des propriétés électriques	47
2.4.2 Mesures sur cellules en suspension : la cytométrie de flux par impédance	47
2.4.3 Caractérisation physiologique : mesures sur cellules adhérentes ou agrégats 3D	48
2.4.4 Le cas du suivi de la réponse de sphéroïdes à un traitement	51
Conclusion	52

Introduction

Pour suivre la culture des sphéroïdes et étudier leur électroporation ou l'effet de traitements sur ces derniers, il est nécessaire de développer des méthodes de suivi adaptées à ces structures 3D. De nombreuses méthodes avec marquage et détection optique existent et sont présentées dans ce chapitre. Mais plus récemment, des méthodes sans marquage ont été développées, car elles ont l'avantage de permettre un suivi de paramètres biologiques en temps réel. Parmi elles, la mesure de bio-impédance est en pleine expansion et fait l'objet de ce chapitre. Le concept d'impédance en milieu biologique est tout d'abord détaillé, puis le principe de la mesure et ses applications sont présentés.

2.1 État de l'art des méthodes de suivi et d'analyse de sphéroïdes et de leur EPN

2.1.1 Méthodes avec bio-marquage et détection

De très nombreuses techniques de colorimétrie, fluorométrie et luminescence existent pour caractériser la viabilité, l'efficacité d'EPN ou d'autres paramètres de l'activité cellulaire comme la prolifération des cellules par exemple. Elles sont basées sur l'utilisation de biomolécules qui permettent de marquer la caractéristique qui est évaluée, et qui sera révélée par des méthodes telles que la cytométrie ou par des méthodes optiques, présentées dans les paragraphes suivants. Elles peuvent être réalisées en même temps que la croissance des cellules, pour suivre leur division par exemple, ou bien en fin d'expérience, pour quantifier l'effet d'un principe actif sur les cellules.

Des kits commerciaux ont été développés spécifiquement pour les structures cellulaires 3D, comme le test CellTiter-Glo 3D, afin de permettre une pénétration plus efficace à l'intérieur des sphéroïdes par rapport aux techniques classiquement utilisées en 2D, comme le dosage de l'acide phosphatase (cytotoxicité), le test Alamar Blue (activité métabolique) ou encore le colorant bleu de Trypan (viabilité) [Pinto et al., 2020]. Toutefois, les fluorophores classiquement utilisés en 2D sont également utilisés en 3D, surtout pour marquer la viabilité des cellules, avec notamment la calcéïne AM (ester d'acétoxyméthyle) et le diacétate de fluorescéine ("Fluorescein DiAcetate" en anglais ou FDA) pour marquer les cellules vivantes, et l'iodure de propidium (IP) ou le bromure d'éthidium (EtBr) pour marquer les cellules mortes. Le mécanisme de marquage des cellules vivantes repose le plus souvent sur une modification (hydrolyse) de la biomolécule uniquement réalisable par une cellule vivante pour donner un produit fluorescent. En ce qui concerne le marquage des cellules mortes, il consiste à utiliser des molécules fluorescentes qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique, et dont l'intensité de fluorescence augmente largement lorsqu'elles se lient à l'ADN des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (augmentation d'un facteur supérieur à 20 [Batista Napotnik et al., 2018]). Comme ces molécules ne sont pas perméables aux cellules, elles sont également largement utilisées pour quantifier l'efficacité d'EPN des cellules. En effet, lorsqu'elles sont ajoutées au milieu avant d'effectuer l'EPN, leur quantification permet de connaître la proportion de cellules électroporées. Au contraire, si elles sont ajoutées après l'EPN, cela peut permettre d'étudier la dynamique de réparation de la membrane lors d'une EPN réversible, puisqu'elles ne pourront pas pénétrer dans des cellules qui se seront refermées. Toutefois, la culture des cellules exposées à ces molécules toxiques ne peut alors pas être poursuivie. De plus, si l'on veut connaître la proportion de cellules électroporées de manière réversible, il est important d'ajouter aussi un marqueur de cellules vivantes.

Les autres caractéristiques de l'activité des cellules sont le plus souvent mesurées grâce

à des immunomarquages ou à l'histologie [Costa, Moreira et al., 2016], en fin d'expérience. L'immunomarquage repose typiquement sur l'utilisation d'un anticorps primaire permettant de cibler une caractéristique biologique, et d'un anticorps secondaire permettant de marquer l'anticorps primaire avec une molécule fluorescente. Afin de réaliser ce marquage, il est nécessaire au préalable de réaliser des étapes de fixation et perméabilisation des cellules. La fixation chimique est réalisée avec une substance telle que le paraformaldéhyde (PFA), et permet une réticulation des molécules qui composent les cellules, et notamment leurs membranes, ce qui les fige dans un état non viable proche du vivant. La perméabilisation est ensuite réalisée avec un détergent tel que le Tween 20 ou le TritonX-100 pour que les marqueurs puissent pénétrer dans les cellules fixées. L'histologie quant à elle repose sur l'utilisation de colorants pour étudier la structure et la composition des tissus, notamment la présence de collagène avec la coloration Masson trichrome, ou encore l'état prolifératif ou nécrotique des cellules avec la coloration hématoxyline et éosine (H&E), qui ont une affinité pour certains éléments cellulaires (respectivement dans le noyau et le cytoplasme). Pour visualiser ces colorations, il est en général nécessaire de réaliser des coupes dans les structures 3D afin d'avoir des échantillons assez fins (5-10 μm).

Des techniques classiques de biologie moléculaire peuvent aussi être utilisées, comme la qRT-PCR et le western blot, dans le but de caractériser l'expression de certains gènes ou certaines protéines dans le sphéroïde. Cependant, ces techniques nécessitent au préalable de dissocier les sphéroïdes pour ensuite lyser les cellules et accéder à leur contenu, ce qui rend les protocoles très longs.

2.1.1.1 Cytométrie de flux

L'analyse du bio-marquage des sphéroïdes peut être réalisée par cytométrie de flux. Cependant, cette méthode permet uniquement l'analyse de suspensions de cellules. Les sphéroïdes doivent donc être dissociés à l'aide d'enzymes avant d'être analysés. Ainsi, elle ne permet pas de déterminer la localisation des cellules marquées dans le sphéroïde, à l'inverse des méthodes optiques. Une autre limitation est le grand nombre de sphéroïdes nécessaires à une mesure à cause de la perte de cellules pendant la dissociation [Pinto et al., 2020]. Afin d'avoir une idée de la distribution spatiale des cellules marquées, certaines équipes utilisent une technique de dissociation progressive [McMahon et al., 2012, Keithley et al., 2013]. Cela consiste à utiliser l'action de l'enzyme pour détacher les couches de cellules en plusieurs fois, en recueillant à chaque étape dans le milieu de rinçage des couches de cellules allant de l'extérieur vers l'intérieur du sphéroïde.

2.1.1.2 Techniques d'analyse optique

De nombreuses méthodes optiques existent pour caractériser les sphéroïdes, avec pour avantage de pouvoir obtenir des données à la fois qualitatives et quantitatives [Costa, Moreira et al., 2016, Pinto et al., 2020]. La plus simple est la microscopie optique (figure 2.2,a), qui permet d'observer des changements de taille ou de forme, en particulier si le microscope est équipé du contraste de phase. En utilisant des logiciels de traitement d'images comme ImageJ, ou des logiciels de programmation comme Matlab ou Python, il est possible d'analyser les images de manière automatique pour mesurer la taille des sphéroïdes afin de suivre l'évolution de la taille pendant plusieurs jours, pour caractériser l'effet d'un principe actif par exemple.

Si l'on souhaite obtenir des informations suite au marquage fluorescent de la viabilité ou d'autres paramètres biologiques des sphéroïdes, il est possible d'utiliser plusieurs techniques permettant des degrés de précision différents. La plus simple est la microscopie à fluorescence (figure 2.2,b). Elle permet d'avoir une idée de la fluorescence globale du sphéroïde, sans avoir

de précision sur la répartition de cette fluorescence à l'intérieur du sphéroïde. On peut toutefois faire plusieurs acquisitions pour différentes positions en hauteur (z-stack) mais la technique optique ne permet pas de prendre en compte uniquement la fluorescence émise par la tranche en z. Le plus souvent, des projections de l'intensité maximale (MIP) sont réalisées afin que chaque pixel de l'image finale corresponde à l'intensité maximale parmi les images du z-stack, ce qui ne permet pas de rendre compte de sa répartition dans le volume du sphéroïde.

Pour obtenir une meilleure résolution spatiale, la microscopie confocale peut être utilisée (figure 2.2,c). Le principe, illustré sur la figure 2.1, est basé sur la présence d'un trou d'épingle sur le trajet du laser illuminant l'objet, qui permet de focaliser la lumière dans un seul plan focal, et d'un diaphragme placé devant le détecteur dans le plan conjugué au plan de l'objectif, afin de récupérer uniquement la lumière provenant du plan focal objet. À l'inverse de la microscopie à fluorescence, cela permet d'enlever la lumière des plans situés en-dehors du plan focal objet, qui apparaîtraient donc comme flous si la lumière provenant de ces plans était récupérée.

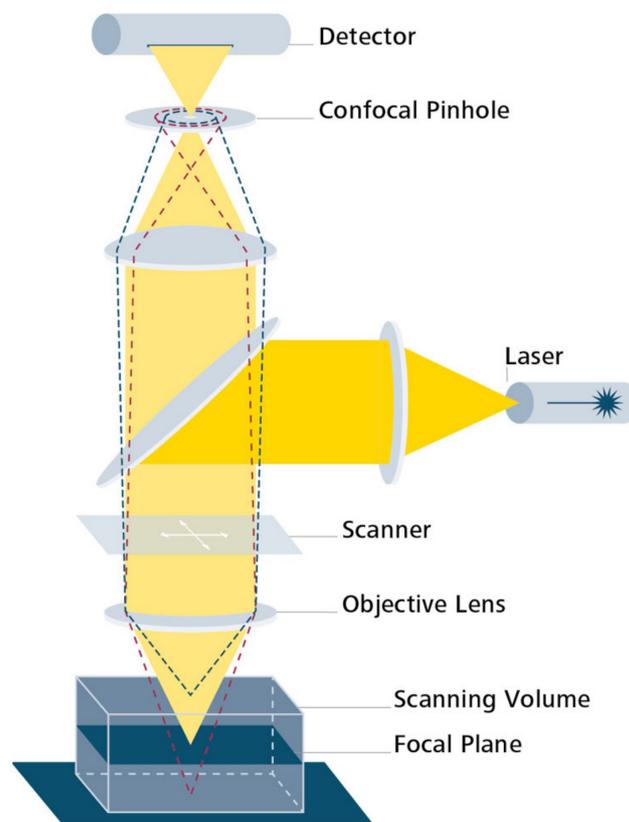


FIGURE 2.1 – Schéma optique du principe de fonctionnement d'un microscope confocal (source : Zeiss).

Cependant, la microscopie confocale permet une profondeur de pénétration assez faible ($< 200 \mu\text{m}$) à cause de la diffusion des photons dans des objets d'épaisseur élevée, et a une vitesse d'acquisition assez faible [Costa, Moreira et al., 2016]. Il est possible de réaliser des coupes physiques dans le sphéroïde pour diminuer l'épaisseur de l'échantillon à observer, notamment avec les techniques d'histologie ou bien en utilisant un cryotome qui permet d'effectuer des découpes fines sur des échantillons congelés. Cependant, ces techniques sont coûteuses, et peuvent entraîner une déformation des échantillons. Une autre technique pour améliorer la profondeur de pénétration est d'utiliser des agents permettant une transparisation des sphéroïdes en homogénéisant les indices de réfraction pour limiter la diffusion des photons à l'intérieur des échantillons observés, comme le glycérol qui est utilisé dans les travaux présentés ici [Costa, Silva et al., 2019].

D'autres techniques ont été développées pour permettre une meilleure observation des sphéroïdes. On peut citer la microscopie à feuille de lumière ("light-sheet microscopy"), qui repose sur une illumination dans un fin plan de lumière de manière perpendiculaire à la direction d'observation de l'échantillon, afin de réaliser un sectionnement optique de l'échantillon (figure 2.2,d). Elle permet d'observer l'échantillon sous plusieurs angles avec une vitesse d'acquisition plus rapide que la microscopie confocale [Costa, Moreira et al., 2016]. Il existe aussi des techniques basées sur l'utilisation de plusieurs photons pour exciter les fluorophores (imagerie 2-photons par exemple), afin de réduire le phénomène de photo-blanchiment optique et d'augmenter la profondeur de pénétration par rapport aux techniques détaillées précédemment (500 à 800 μm) [Costa, Moreira et al., 2016].

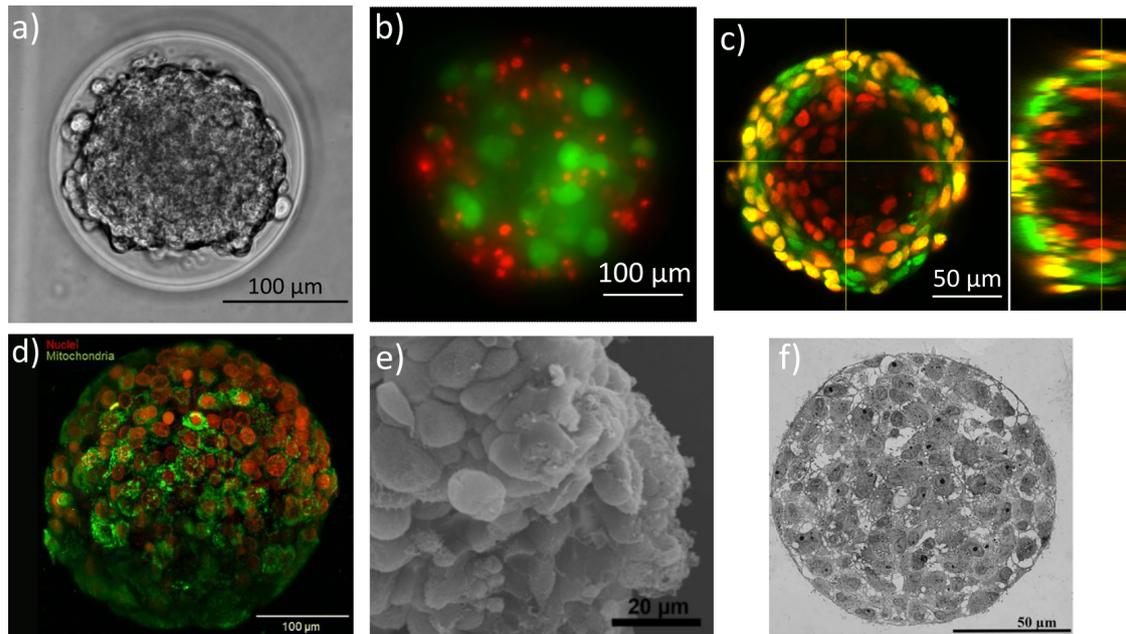


FIGURE 2.2 – Illustration des différentes méthodes optiques pour l'observation de sphéroïdes. (a) Image en microscopie optique d'un sphéroïde de cellules PANC1 de cancer de pancréas. (b) MIP d'un marquage de viabilité de sphéroïdes de cellules PANC1, après ajout d'anticancéreux. Rouge = cellule morte (IP), Vert = cellule vivante (FDA). (c) Vue orthogonale d'une MIP d'image réalisée au microscope confocal du marquage de la prolifération dans un sphéroïde de cellules HT29 de cancer colorectal. Rouge = cellule proliférative (marquage à l'EdU), Vert = noyaux (NucGreen). (a-c) Images réalisées durant cette thèse. (d) Sphéroïdes tumoraux de cellules T-47D de cancer du sein imagés par microscopie à fluorescence à feuille de lumière [Pampaloni et al., 2013]. Rouge = noyaux (Draq5), Vert = mitochondries (MitoView Green). (e) Image en microscopie électronique à balayage de la surface d'un sphéroïde de cellules MCF-7 de cancer du sein [Costa, Moreira et al., 2016]. (f) Image en microscopie électronique en transmission d'un sphéroïde de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien [Kosheleva et al., 2020].

Une autre méthode permettant d'imager des structures 3D relativement volumineuses est la tomographie en cohérence optique (OCT). Elle est non destructive, sans marquage, et est basée sur l'interférométrie à basse cohérence. Elle permet à la fois d'obtenir des images en 3D d'échantillons de tissus épais (d'environ 10 mm) et d'atteindre une haute résolution spatiale d'environ 5 à 10 μm , selon les propriétés de transparence et de diffusion des tissus. De plus, il a récemment été démontré que la visualisation et la quantification des activités métaboliques et nécrotiques de sphéroïdes de diamètre 500 μm pouvaient être déduites du signal optique [El-Sadek et al., 2021]. Cependant, ces images nécessitent un lourd post-traitement pour être interprétées.

Une autre catégorie d'imagerie, permettant d'obtenir des images de la structure des sphéroïdes avec une très haute résolution (ordre du nm) est la microscopie électronique à balayage (MEB) ou en transmission (MET). Elle repose sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons et nécessite donc une préparation de l'échantillon puisque la mesure est réalisée sous vide. Ils doivent ainsi être déshydratés et recouverts d'une fine couche de matériau conducteur tel que l'or afin que les électrons puissent parcourir la surface de l'échantillon. Comme cela peut endommager les échantillons, des microscopes à faible vide ou permettant l'utilisation d'échantillons humides ont été développés. Les images réalisées en microscopie électronique à balayage (figure 2.2,e) permettent des analyses de la topologie en surface et notamment d'étudier l'intégrité des membranes et des interactions cellule-cellule. Celles réalisées en transmission (figure 2.2,f) permettent une analyse en volume afin d'étudier la synthèse de matrice extracellulaire et la distribution de médicaments ou nanoparticules dans le sphéroïde par exemple [Pinto et al., 2020].

2.1.2 Méthodes sans marquage

Les techniques d'analyse présentées précédemment reposent toutes sur l'utilisation de marqueurs biologiques, qui peuvent potentiellement perturber les cellules voire être toxiques pour celles-ci [Alexander, Price et al., 2013]. De plus, elles requièrent une observation optique et, pour certaines, ne peuvent pas être réalisées en temps réel lors de la culture. Or avec l'émergence des microsystèmes pour la culture des cellules, le suivi *in situ* devient primordial puisque le transport de ces microsystèmes vers le microscope peut nuire à la culture des cellules, et la question de la transparence pour l'observation *in situ* peut se poser. C'est pourquoi de nombreuses équipes ont cherché à intégrer des capteurs dans leurs systèmes pour permettre un suivi en temps réel de divers paramètres tels que le pH, l'oxygène dissous, ou encore la température. D'autres méthodes existent pour mesurer des changements de concentration de certaines molécules dans le milieu, comme par exemple une méthode acoustique, la microbalance à quartz, qui repose sur la mesure du changement de fréquence de résonance de molécules fixées sur un substrat en cristal de quartz [Alexander, Price et al., 2013]. Cependant, il existe un délai entre le changement de la concentration de métabolites dans le milieu de culture, mesuré par ces capteurs, et l'état de la cellule [Kieninger et al., 2018].

Une autre méthode qui est en plein essor pour la mesure rapide et *in situ* de divers paramètres biologiques, tels que la croissance et la viabilité cellulaire, est la mesure des propriétés électriques de l'échantillon, et en particulier la mesure de bio-impédance. Elle permet notamment d'obtenir des informations sur la physiologie, le type et la taille des cellules [Rabbitt et al., 1999, Gawad, Schild et al., 2001, Tixier-Mita et al., 2014], et peut aussi être utilisée *in vivo* [Mercanzini et al., 2009]. En effet, les cellules sont constituées d'un électrolyte conducteur, le cytoplasme, séparé du milieu extérieur par une couche isolante, la membrane plasmique, ce qui entraîne une polarisation des membranes, comme cela a été vu précédemment pour décrire le phénomène d'électroporation (partie 1.2). Cela détermine la réponse en fréquence des cellules à un signal électrique, et peut permettre de relier la valeur d'impédance mesurée à des paramètres cellulaires tels que l'intégrité des membranes, donc la viabilité des cellules. De plus, cette méthode peut s'avérer utile pour suivre l'EPN des cellules, puisque le phénomène est basé sur une perméabilisation des membranes, qui joue directement sur les propriétés électriques et entraîne notamment une augmentation courte et rapide de la conductivité des cellules [Batista Napotnik et al., 2018]. Le microsystème développé dans cette thèse étant déjà équipé d'électrodes et de contacts électriques pour l'EPN, ces derniers ont été mis à profit pour développer cette méthode de suivi des sphéroïdes, c'est pourquoi la suite de ce chapitre se concentre sur le principe de

mesure de la bio-impédance et ses applications pour la caractérisation de modèles cellulaires.

2.2 Impédance électrique des milieux biologiques

2.2.1 Définition de l'impédance

L'impédance électrique est une généralisation du concept de résistance électrique, puisqu'elle caractérise l'opposition d'un matériau au passage d'un courant alternatif (AC). L'impédance est définie comme le rapport entre la tension sinusoïdale appliquée à l'échantillon et le courant électrique alternatif sinusoïdal qui le traverse. C'est donc une grandeur complexe, qui peut être exprimée avec la relation :

$$Z^* = \frac{V_0}{I_0} e^{j\varphi} = \text{Re}[Z^*] + j\text{Im}[Z^*] = |Z^*| e^{j\varphi}, \quad (2.1)$$

$$\text{avec } |Z^*| = \sqrt{\text{Re}[Z^*]^2 + \text{Im}[Z^*]^2} \text{ et } \varphi = \arctan \frac{\text{Im}[Z^*]}{\text{Re}[Z^*]}, \quad (2.2)$$

où $|Z^*|$ (ohm) et φ (rad) représentent respectivement le module et la phase de l'impédance.

La partie réelle traduit la dissipation d'énergie donc la résistance de l'échantillon, et la partie imaginaire, la réactance, rend compte de l'opposition au courant alternatif par la capacitance et l'inductance du système, via du stockage ou de la restitution d'énergie. L'impédance dépend de la fréquence de la tension appliquée, qui varie en général entre quelques kHz et quelques dizaines de MHz [Tamra, 2017] et également des propriétés électriques de l'échantillon étudié. Pour comprendre la signification physique de l'impédance, il existe des modèles de circuits électriques équivalents permettant de représenter l'impact des différents éléments composant le système étudié sur le comportement électrique global.

2.2.2 Propriétés électriques des cellules

2.2.2.1 Permittivité et conductivité complexe : notions de relaxation et dispersion

Dans le cas des matériaux biologiques comme les cellules, les porteurs de charges sont les ions présents dans le milieu biologique, comme les ions sodium, potassium ou calcium par exemple, et non les électrons comme c'est le cas pour les matériaux solides comme les métaux. De plus, il existe une dualité conducteur/diélectrique à cause de la différence de propriétés entre la membrane, considérée comme un diélectrique, et les milieux électrolytes intra et extracellulaire.

Les propriétés électriques des cellules sont caractérisées par deux grandeurs qui sont la conductivité et la permittivité. La conductivité σ traduit la possibilité pour les charges libres, dans le cas présent les ions, de se déplacer dans le matériau sous l'effet d'un champ électrique ; tandis que la permittivité ϵ reflète la capacité qu'a un matériau à stocker des charges et à se polariser sous l'effet d'un champ électrique. Cette polarisation dépend de la fréquence et par conséquent, une solution contenant des cellules est un milieu dispersif caractérisé par une permittivité complexe ϵ^* définie selon l'équation suivante :

$$\epsilon^* = \epsilon_0 \epsilon_r - \frac{j\sigma}{\omega}, \quad (2.3)$$

avec ϵ_0 la permittivité du vide (F/m), ϵ_r la permittivité relative du milieu, σ sa conductivité électrique (S/m) et ω la fréquence angulaire (rad/s), où $\omega = 2\pi f$ avec f la fréquence du courant AC appliqué (Hz).

Il est alors possible d'écrire l'impédance complexe d'un échantillon de propriétés électriques données sous la forme suivante :

$$Z^* = \frac{K}{j\omega\varepsilon^*} = \frac{K}{\sigma + j\omega\varepsilon_0\varepsilon_r}, \quad (2.4)$$

avec K une constante caractéristique de la configuration de mesure utilisée (configuration des électrodes, matériau...).

La polarisation des charges est un phénomène caractérisé par une constante de temps puisqu'elle n'est pas instantanée. Cela donne lieu à différentes dispersions en fonction de la fréquence, à savoir des transitions d'un plateau à un autre sur les courbes de permittivité et conductivité (figure 2.3). Il en existe 3 principales, décrites par [Schwan, 1957] :

- La dispersion α en basse fréquence, associée à la diffusion des espèces ioniques et donc au potentiel des membranes, aux jonctions, et au déplacement des contre ions autour des membranes chargées.
- La dispersion β entre le kHz et le MHz, qui est due à la polarisation à l'interface entre milieu intra et extracellulaire au niveau de la membrane, qui agit comme une barrière au transport des ions en se comportant donc comme une capacité.
- La dispersion γ en très haute fréquence, associée à l'orientation dipolaire des molécules d'eau (polarisation d'orientation).

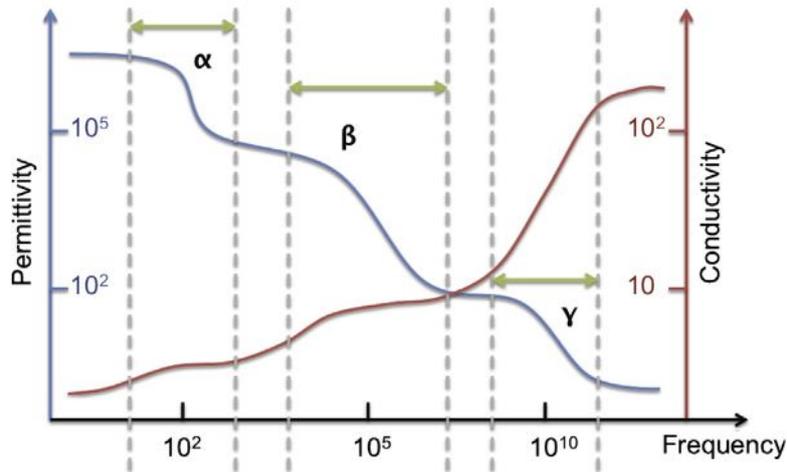


FIGURE 2.3 – Permittivité et conductivité complexes de cellules et visualisation des dispersions en fonction de la fréquence [Heileman et al., 2013].

La dispersion β est généralement décrite par l'effet Maxwell-Wagner, permettant de rendre compte de la polarisation des membranes sous l'effet de l'application d'un potentiel externe lors de la mesure électrique (figure 2.4). Elle est caractérisée par un temps de relaxation τ dépendant des propriétés diélectriques de la cellule :

$$\tau = \frac{\varepsilon_{cyt} + 2\varepsilon_e}{\sigma_{cyt} + 2\sigma_e}, \quad (2.5)$$

avec ε_{cyt} et σ_{cyt} la permittivité (F/m) et la conductivité (S/m) du cytoplasme, et ε_e et σ_e la permittivité (F/m) et la conductivité du milieu extracellulaire ou électrolyte (S/m).

2.2.2.2 Modèle électrique d'une cellule

Le modèle le plus simple utilisé pour décrire les cellules est un modèle dit à simple enveloppe ("single-shell"), avec une membrane, un cytoplasme et un milieu externe électrolyte, aux propriétés électriques distinctes (figure 2.4,a), en faisant l'hypothèse d'un cytoplasme homogène.

En réalité, les organelles, protéines, ADN présents dans le cytoplasme ont leur propre polarisation mais celle de la membrane reste prédominante [Heileman et al., 2013]. Ainsi la permittivité complexe d'une cellule ε_p^* est définie par l'équation suivante :

$$\varepsilon_p^* = \varepsilon_m^* \frac{\gamma^3 + 2 \frac{\varepsilon_{cyt}^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_{cyt}^* + 2\varepsilon_m^*}}{\gamma^3 - \frac{\varepsilon_{cyt}^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_{cyt}^* + 2\varepsilon_m^*}}, \quad (2.6)$$

avec $\gamma = \frac{R}{R-d}$ où R est le rayon de la cellule (de l'ordre de la dizaine de μm) et d l'épaisseur de sa membrane (de l'ordre du nm).

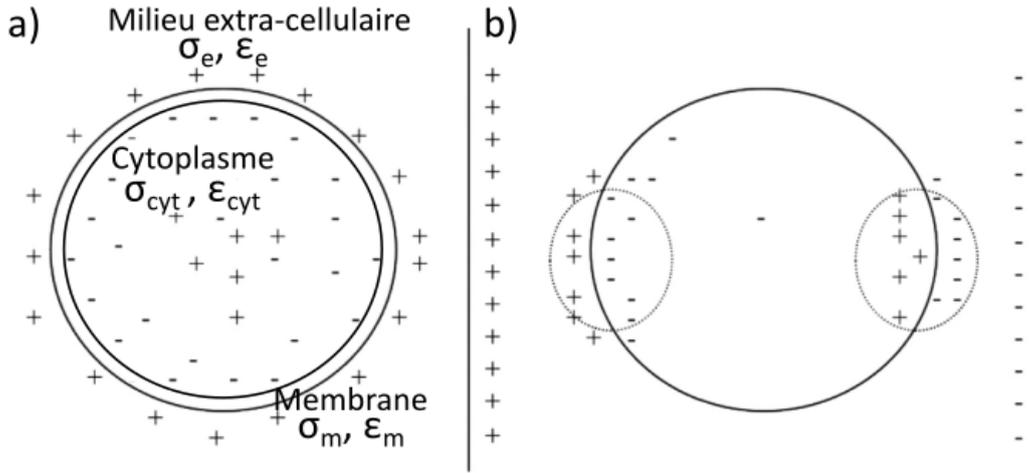


FIGURE 2.4 – Effet Maxwell-Wagner. (a) Modèle simple enveloppe d'une cellule dans un milieu électrolyte. (b) Polarisation de la membrane sous l'effet d'un champ électrique externe appliqué. Inspiré de [Heileman et al., 2013]

Une valeur typique de la conductance de la membrane par unité de surface est d'environ 0.3 mS/cm^2 , sa capacité spécifique est d'environ $1 \mu\text{F/cm}^2$, et la conductance du cytoplasme est d'environ 5 mS/cm^2 [Gerasimenko et al., 2020]. La valeur de la résistance membranaire est généralement grande devant la résistance du cytoplasme, tandis que sa capacité est petite devant celle de la membrane. Cela permet de négliger la résistance de la membrane et la capacité du cytoplasme. On peut donc remarquer qu'en basse fréquence, la membrane se comporte comme un isolant (figure 2.5,a) et c'est le plus souvent la résistance du milieu électrolyte qui prédomine, alors que pour des fréquences élevées ($> \text{MHz}$), la membrane se comporte comme un court-circuit donc le courant peut circuler librement (figure 2.5,b). L'impédance est alors influencée par la résistance du cytoplasme. La nature de la membrane et ses propriétés diélectriques permettent d'expliquer l'existence de la dispersion β .

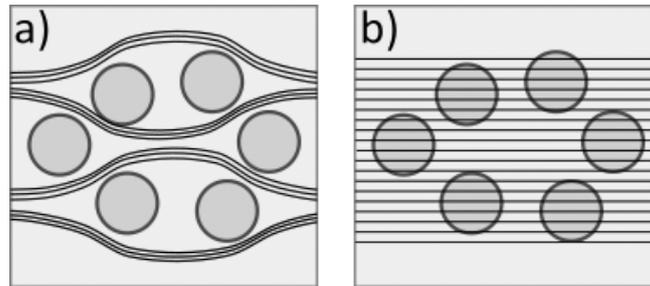


FIGURE 2.5 – Trajet du courant dans une suspension de cellules (a) en basse fréquence (de l'ordre du Hz) et (b) en haute fréquence (de l'ordre du MHz).

La modélisation la plus simple d'une cellule en solution dans un électrolyte consiste donc à considérer le milieu extracellulaire ionique comme une résistance, en parallèle avec une capa-

cité représentant la membrane et une résistance représentant la conductivité intracellulaire. Ce modèle est appelé modèle de Fricke (figure 2.6), et on y retrouve la dualité conducteur/diélectrique, qui permet de définir l'impédance par un circuit équivalent de R en parallèle avec un RC série.

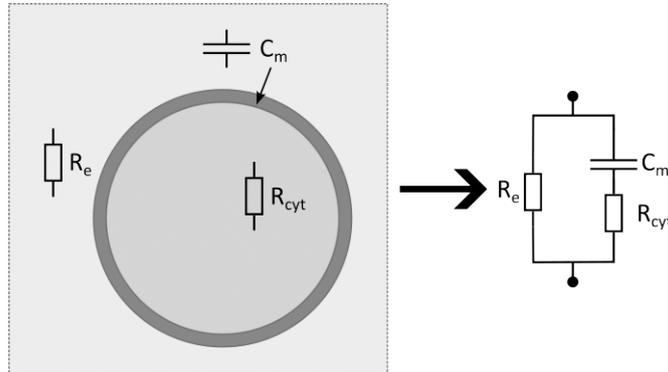


FIGURE 2.6 – Schéma simplifié d'une cellule et de son circuit électrique équivalent selon le modèle de Fricke.

Cependant, le modèle précédent ne permet pas de prendre pleinement en compte le comportement dépendant en fréquence des échantillons biologiques. Une autre approche consiste alors à ne pas considérer la membrane comme une capacité pure, mais comme un élément à phase constante ("Constant Phase Element" en anglais ou CPE), qui permet de mieux traduire le caractère imparfait de cette capacité. Ce modèle plus complexe est appelé modèle de Cole-Cole. L'impédance et la permittivité complexe sont alors exprimées de la manière suivante :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega C)^\beta}, \quad (2.7)$$

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^\beta}, \quad (2.8)$$

avec C la capacité de la membrane, β une constante comprise entre 0 (comportement purement résistif) et 1 (comportement purement capacitif), ε_∞ la permittivité limite en haute fréquence et ε_0 la permittivité limite en basse fréquence. Lorsque $\beta = 1$, on retrouve le modèle de Fricke.

2.2.2.3 Des cellules en suspension aux tissus biologiques

Les modèles précédents sont valables pour une cellule unique. Pour l'étude des suspensions de cellules dans un milieu électrolyte, une extension de l'équation 2.6 a été proposée par Maxwell. Elle est appelée équation des mélanges de Maxwell-Wagner [Sihvola et al., 1988] (figure 2.7) :

$$\frac{\varepsilon_{mix}^* - \varepsilon_e^*}{\varepsilon_{mix}^* + 2\varepsilon_e^*} = \varphi \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_e^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_e^*}, \quad (2.9)$$

où ε_{mix}^* est la permittivité complexe du mélange, ε_e^* celle du milieu extérieur, ε_p^* celle d'une particule ou cellule, et φ la fraction volumique de cellules en suspension.

Cette équation n'est valable que pour des particules sphériques, un champ uniforme, et pour des fractions volumiques φ faibles ($< 10\%$), car elle ne permet pas de prendre en compte les interactions entre les cellules.

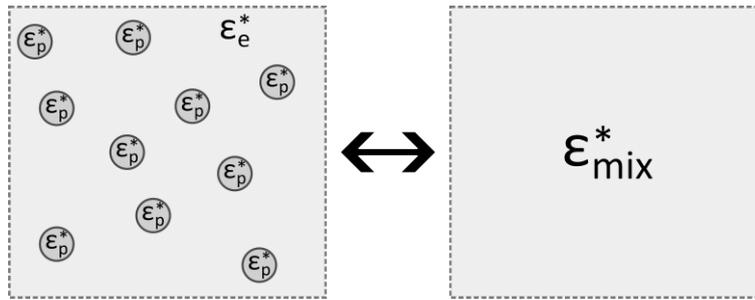


FIGURE 2.7 – Schéma simplifié d'une suspension de cellules et de sa modélisation.

D'autres modèles ont alors été développés pour permettre de décrire des suspensions de fraction volumique plus élevée. On peut citer le modèle de Hanai-Bruggeman permettant également de prendre en compte la morphologie des particules en suspension avec un facteur de forme ; ou encore le modèle de Looyenga, permettant de donner des résultats très proches des mesures expérimentales mais étant limité à un cas où les permittivités du milieu et des particules sont proches [Heileman et al., 2013].

Si l'on s'intéresse à des agrégats 3D tels que des sphéroïdes et non plus à des suspensions diluées, la modélisation devient plus complexe, et nécessite de faire des approximations, comme par exemple de considérer les sphéroïdes comme des particules en suspension, ou bien de considérer localement l'agrégat comme une zone avec une forte fraction volumique, sous l'hypothèse que l'espace intercellulaire a la même permittivité que le milieu extracellulaire [Asami, 2002].

2.3 Principe de mesure de la bio-impédance

2.3.1 Importance des paramètres expérimentaux et des équipements de mesure

La mesure de bio-impédance peut être réalisée à l'aide d'appareils de mesure de laboratoire (Agilent 4294A, Solatron 1260A) ou d'appareils portables (Livium, PalmSens4) [Showkat et al., 2023]. Dans les deux cas, les terminaux sont connectés au système contenant l'échantillon à analyser et la mesure peut être réalisée en balayant la fréquence. Il est parfois possible que l'appareil modélise la bio-impédance par un circuit équivalent pour en extraire les paramètres, en utilisant des algorithmes d'optimisation.

2.3.1.1 Signal de mesure

De nombreux systèmes ont été développés pour réaliser des mesures d'impédance sur des échantillons biologiques. Les cellules peuvent être cultivées directement sur un substrat servant d'électrode ou bien mises en suspension, avec des configurations d'électrodes parallèles ou coplanaires. Le premier paramètre à prendre en compte est l'intensité de la tension de l'oscillateur local, et donc du champ généré, afin que celui-ci n'affecte pas la viabilité des cellules, ni ne perturbe leur prolifération, migration ou encore leur cytosquelette [Gerasimenko et al., 2020]. Si la tension appliquée est trop élevée, le comportement peut devenir non linéaire. Il faut donc veiller à rester en-dessous de ce seuil de non linéarité, tout en utilisant une tension suffisamment élevée pour que le courant généré soit assez élevé pour être mesurable. Un bon compromis semble être autour de quelques centaines de mV [Das et al., 2014, Olariu et al., 2022].

2.3.1.2 Température

Un autre paramètre primordial à prendre en compte est la température de mesure. En effet, la conductivité d'un milieu ionique évolue de manière importante en fonction de la température. Il a été montré que cette variation est de l'ordre de 2%/°C [Schwan, 1957], comme c'est le cas pour les solutions salines. Il faut donc s'assurer lors des mesures que la température de l'échantillon est bien connue et constante.

2.3.1.3 Électrodes et interface avec l'électrolyte

Le choix du matériau et de la forme des électrodes est également très important. En effet, il ne faut pas que le matériau soit toxique pour les cellules, et il faut qu'il soit stable chimiquement pour ne pas être dégradé par les mesures, typiquement de l'or, du platine, ou encore du titane. De plus, comme le milieu contenant les cellules est placé en contact direct avec les électrodes, cela entraîne l'apparition d'une double couche ionique à l'interface électrode-électrolyte (figure 2.8). Elle est composée de la couche de Stern et d'une couche diffusive dite de Gouy-Chapman. L'impact de cette double couche sur la mesure d'impédance est important, surtout en basse fréquence, avec un comportement principalement capacitif. Il peut être limité par la méthode de mesure, comme nous allons le voir par la suite, ou bien en augmentant la surface des électrodes, puisque l'impédance de la double couche est inversement proportionnelle à la surface de l'électrode [Gerasimenko et al., 2020]. De manière plus globale, le design des électrodes joue un rôle très important sur la précision de la mesure.

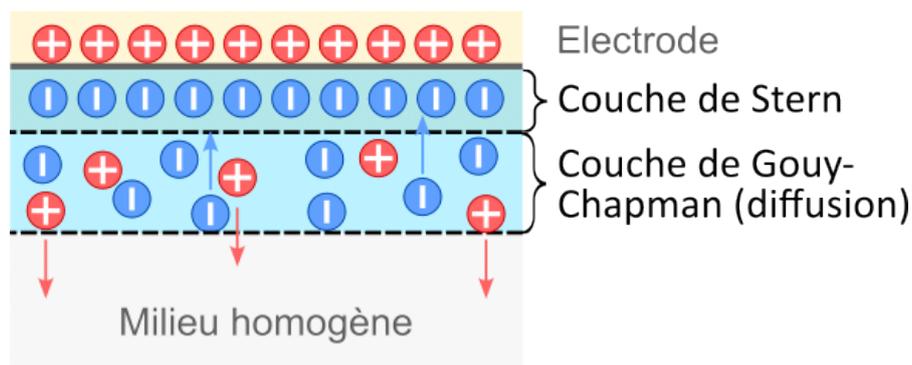


FIGURE 2.8 – Schéma de la double couche ionique à l'interface électrode-électrolyte.

Il est également nécessaire de bien valider le fonctionnement du dispositif sur des solutions de conductivités connues, comme des tampons salins KCl par exemple, afin de s'assurer que le suivi d'impédance permet bien de rendre compte des variations de propriétés électriques de l'échantillon de manière répétable [Alexander, Eggert et al., 2019]. En effet, lors de la mesure d'impédance pour des solutions de conductivités différentes, la valeur en basse fréquence, principalement due à la double couche se formant à l'interface électrode-électrolyte, devrait peu varier, mais des différences devraient être observées plutôt pour des fréquences supérieures au kHz, là où la résistance de l'électrolyte, dont la valeur est directement liée à la conductivité, domine. En effet, pour un conducteur filiforme de longueur L , de section S et de conductivité σ , la résistance associée est exprimée par la relation suivante : $R = \frac{L}{\sigma S}$.

2.3.1.4 Mesure différentielle

De plus, dans le cadre des mesures en milieu biologique, l'adsorption et la désorption de biomolécules sur les électrodes peut générer un bruit de fond qui empêche de visualiser les variations d'impédance dues à la présence des cellules, qui sont souvent relativement faibles. C'est pourquoi de nombreuses équipes s'intéressent à des valeurs d'impédance normalisées par

rapport à une valeur de référence sans cellule, afin de prendre en compte uniquement les variations liées aux cellules [Luongo et al., 2013; Lei et al., 2017; Pan et al., 2019]. Cette mesure différentielle, souvent appelée indice cellulaire (IC), est calculée en pourcentage selon la relation suivante :

$$IC = \frac{\Delta Z}{Z_0}, \quad (2.10)$$

avec ΔZ la variation du module d'impédance avec et sans cellules (en ohm), et Z_0 le module de l'impédance mesuré en l'absence de cellules (en ohm).

2.3.1.5 Configuration de mesure

La méthode de mesure la plus simple est d'utiliser les deux mêmes électrodes pour appliquer le signal sinusoïdal et mesurer la réponse du système. Cette méthode réalise une mesure de l'impédance totale, y compris la part due à l'interface électrode-électrolyte (figure 2.9,a). Afin de limiter l'impact de cette double couche sur la mesure d'impédance, une méthode dite tétrapolaire a été développée. Elle repose sur l'utilisation de quatre électrodes associées en deux paires indépendantes, soit deux électrodes pour le courant et deux pour la tension (figure 2.9,b). Grâce à l'impédance élevée du circuit de mesure de tension, le courant qui traverse cette paire d'électrodes est négligeable ce qui permet de réduire son influence sur la mesure. Il existe également des configurations à 3 électrodes, pour lesquelles une des électrodes de courant sert aussi pour la tension [Canali et al., 2015], et il faut en général réduire son impédance, en maximisant sa surface par exemple.

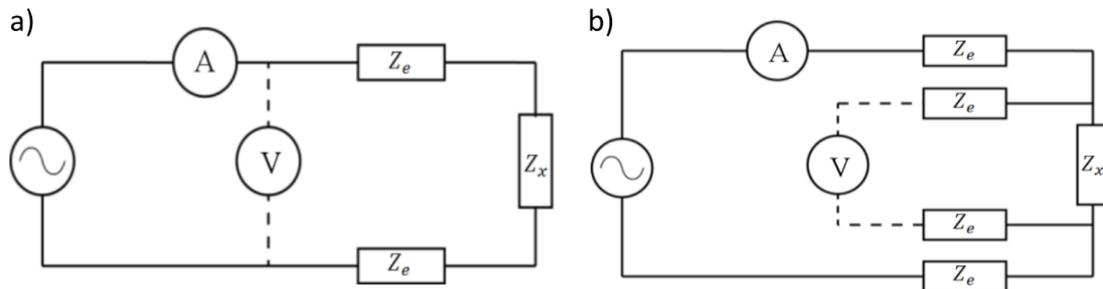


FIGURE 2.9 – Circuits électriques des configurations de mesure d'impédance [Castellvi, 2014], avec Z_e l'impédance des électrodes et Z_x l'impédance à mesurer. (a) Mesure avec deux électrodes. (b) Mesure tétrapolaire avec deux paires d'électrodes.

2.3.2 Utilisation d'électrodes structurées

Comme cela a été souligné précédemment, le design des électrodes est d'une importance capitale pour la précision de la mesure d'impédance. Il existe principalement deux types de design d'électrodes : les électrodes pleines plaques parallèles et les électrodes structurées. Les premières sont plus simples à utiliser puisqu'elles consistent en des lames de verre ou wafer recouverts d'une couche de matériau conducteur, que l'on peut acheter facilement. Les deuxièmes sont plus complexes à réaliser car elles sont obtenues grâce à des techniques de micro-fabrication (voir annexe A) nécessitant du matériel de précision permettant la structuration avec des motifs micrométriques, dans des salles équipées pour limiter la poussière, dites salles blanches. Ce deuxième design permet d'améliorer la résolution spatiale et la sensibilité de la mesure.

Parmi les types de structuration d'électrodes, les plus utilisés pour la mesure d'impédance sont les réseaux de micro-électrodes avec contre-électrode commune et les électrodes interdigitées coplanaires.

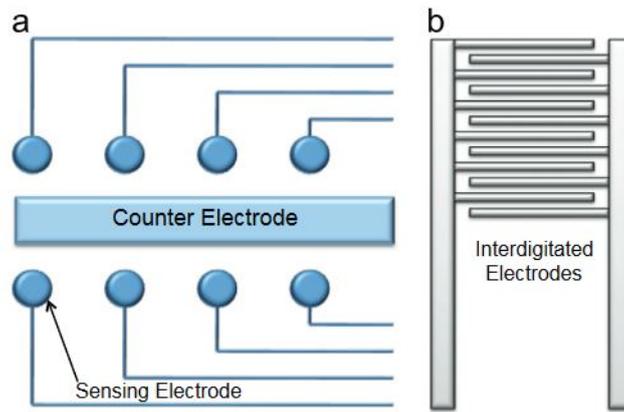


FIGURE 2.10 – Configurations d'électrodes les plus répandues pour la mesure d'impédance sur cellules [Heileman et al., 2013]. (a) Réseau de micro-électrodes de mesure avec une contre-électrode commune. (b) Électrodes interdigitées.

2.3.2.1 Réseau de micro-électrodes avec contre-électrode commune

Dans cette configuration, les mesures sont réalisées entre plusieurs électrodes de mesure et une électrode de référence (figure 2.10,a). La surface de l'électrode de référence est souvent grande devant celle des électrodes de mesure et les cellules ne se trouvent que sur les électrodes de mesure, afin de maximiser la contribution des cellules à l'impédance. Idéalement, les cellules doivent occuper toute l'électrode de mesure pour minimiser l'impact du milieu de culture. Il est notamment possible de déposer des couches de passivation et de les graver pour ne faire apparaître que les électrodes et éviter ce phénomène. Lors de mesures sur des couches cellulaires, il est possible de faire adhérer les cellules sélectivement sur les électrodes en les fonctionnalisant avec des biomolécules [Heileman et al., 2013].

2.3.2.2 Électrodes interdigitées

Les électrodes interdigitées (IDE) sont composées de deux peignes d'électrodes coplanaires reliées à deux plots de contact différents (figure 2.10,b). Lors de la mesure d'impédance, un champ électrique se développe dans la région située au-dessus et entre deux peignes consécutifs. Ce type de structure est avantageux car selon les paramètres des peignes (largeur, espacement, nombre), la profondeur de pénétration des lignes de champ au-dessus des électrodes peut être adaptée (figure 2.11). Cela peut permettre par exemple de détecter très finement des structures proches des électrodes (peignes fins et serrés) ou inversement. La surface globale des électrodes, donc le nombre de peignes, peut également être augmentée pour réduire l'impact de l'impédance électrode-électrolyte.

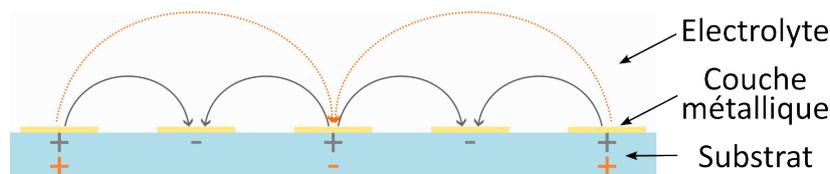


FIGURE 2.11 – Schéma des lignes de champ au-dessus d'électrodes interdigitées selon l'espacement entre les peignes.

2.4 Applications de la mesure de bio-impédance sur modèles cellulaires

À l'origine, la spectroscopie d'impédance en milieu électrolyte était surtout utilisée dans le domaine de l'électrochimie, et a permis notamment d'étudier les réactions ayant lieu à l'interface électrode/électrolyte [Alexander, Price et al., 2013]. En particulier, ces recherches ont donné lieu à la description de la double couche ionique. Elles se sont ensuite tournées vers le développement de bio-capteurs basés sur l'utilisation d'ADN ou d'anticorps, et également vers le suivi de cellules.

De nos jours, les applications de la spectroscopie d'impédance électrique aux systèmes biologiques sont nombreuses. Elles s'étendent à différentes échelles, de la caractérisation des propriétés à l'échelle d'une cellule unique, en passant par le suivi du métabolisme de cellules en monocouche ou en suspension, et plus récemment, la mesure sur sphéroïdes intégrée dans des microsystèmes.

2.4.1 Mesures sur cellules uniques : caractérisation des propriétés électriques

Les mesures à l'échelle cellulaire peuvent être réalisées de manière très précise en utilisant des réseaux de micro-électrodes de la taille des cellules. Des techniques pour piéger les cellules sur les électrodes sont alors utilisées, basées sur l'utilisation de biomolécules, sur lesquelles les cellules peuvent s'accrocher sélectivement ; sur le design du flux [Heileman et al., 2013] ; ou encore sur des méthodes électriques comme la diélectrophorèse [Nguyen et al., 2018], consistant à appliquer une force pour déplacer les cellules, résultant de leur polarisation sous l'effet d'un champ électrique alternatif non uniforme.

Les applications de ces mesures sont par exemple la caractérisation de l'activité des canaux ioniques, la différenciation entre plusieurs stades du cancer ou différentes morphologies de cellules, ou encore la distinction entre des cellules saines et cancéreuses [Alexander, Price et al., 2013]. Mettant à profit l'avantage des mesures d'impédance de pouvoir être réalisées en temps réel, elles permettent aussi d'étudier la viabilité des cellules et l'intégrité de leur membrane, comme par exemple après exposition à un agent chimique tel que le TritonX-100, qui a pour effet de perméabiliser les membranes [Huang et al., 2003].

Cependant, ces mesures sont inadaptées pour le criblage de médicaments ou les tests de cytotoxicité [Alexander, Price et al., 2013] car les modèles de cellules uniques sont assez éloignés des tissus en raison de l'absence de prise en compte du micro-environnement cellulaire.

2.4.2 Mesures sur cellules en suspension : la cytométrie de flux par impédance

La cytométrie de flux par impédance consiste à analyser des cellules en suspension sous flux, lors de leur passage à proximité des électrodes. La mesure doit pour cela être rapide ce qui peut limiter la plage de fréquences du signal de mesure et avoir un impact négatif sur le rapport signal sur bruit [Alexander, Price et al., 2013]. Il est possible d'obtenir des informations sur les propriétés de la membrane pour des fréquences de l'ordre du kHz, afin par exemple de distinguer différents types cellulaires ; tandis que pour des fréquences plus élevées (MHz), la membrane étant perméable au courant, il est possible d'obtenir des informations sur l'intérieur des cellules. Ainsi en réalisant des études multi-fréquences, les données obtenues permettent de déduire différentes propriétés des cellules, de manière analogue à des images multi-canaux en fluorescence [Gawad, Schild et al., 2001, Heileman et al., 2013].

2.4.3 Caractérisation physiologique : mesures sur cellules adhérentes ou agrégats 3D

La stratégie la plus couramment adoptée pour la mesure d'impédance sur des cellules adhérentes est de faire croître les cellules en monocouche directement sur les électrodes, préalablement recouvertes d'une couche de protéines permettant aux cellules d'adhérer au substrat. Cela permet de suivre de nombreux paramètres comme la cinétique de croissance, la différenciation, l'adhésion cellulaire et permet aussi le test de traitements. Il existe des appareils commerciaux permettant ce type de suivi, comme le système xCELLigence (figure 2.12,a) basé sur la culture de cellules sur des IDE [Ke et al., 2011].

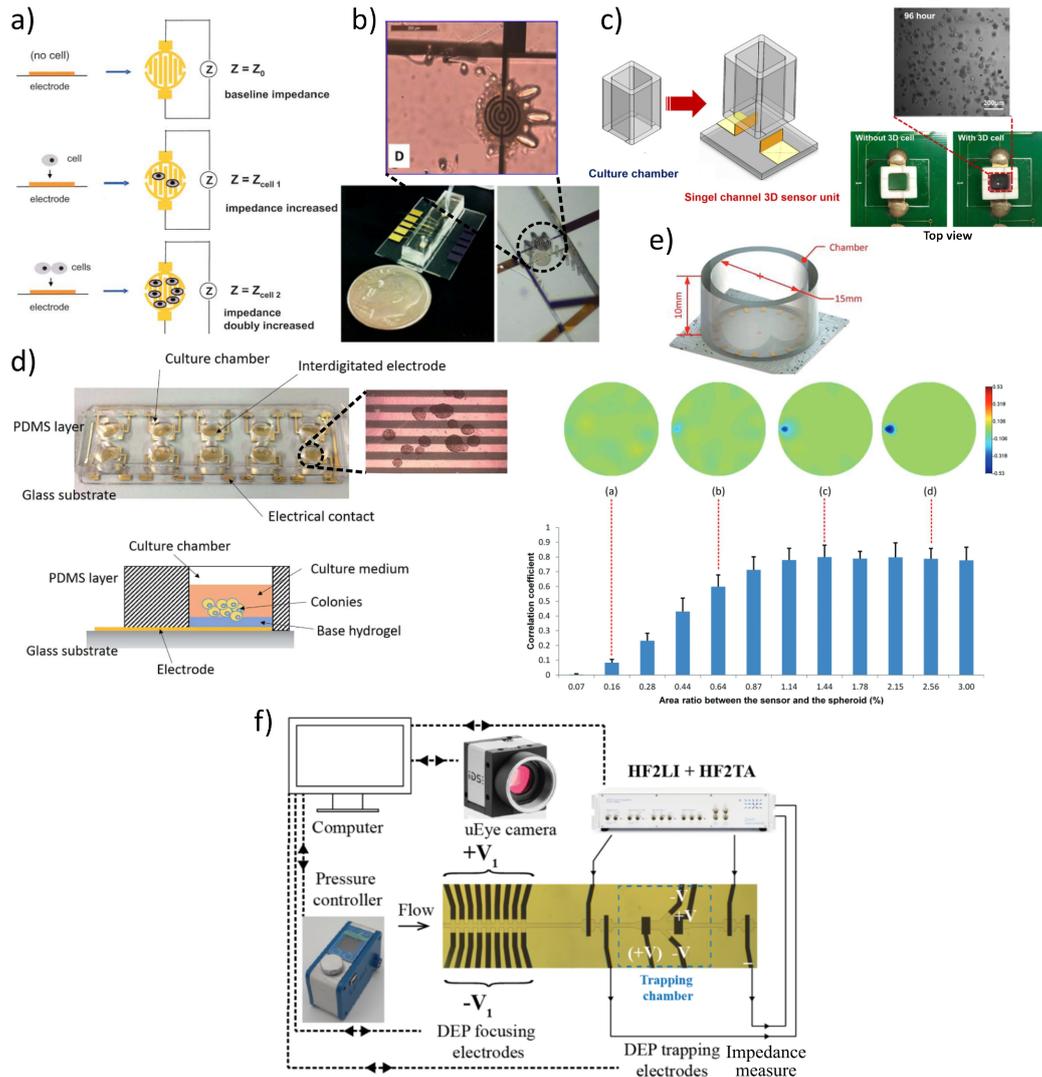


FIGURE 2.12 – Exemples de systèmes de mesure d'impédance sur cellules adhérentes et sphéroïdes. (a) Système commercial xCELLigence (Roche, Suisse) pour cellules adhérentes sur électrodes interdigitées [Ke et al., 2011]. (b) Système microfluidique pour mesure sur sphéroïde unique [Luongo et al., 2013]. (c) Chambre de culture de sphéroïdes dans une matrice en Matrigel et mesure avec des électrodes verticales en or [Pan et al., 2019]. (d) Biopuce équipée de plusieurs chambres de culture de sphéroïdes sur de fines couches d'hydrogel déposées sur des électrodes interdigitées en or [Lei et al., 2017]. (e) Chambre de culture équipée d'un réseau d'électrodes permettant de quadriller le volume contenant le sphéroïde et résultats de la reconstruction de l'emplacement de sphéroïdes de différentes tailles [H. Wu et al., 2018]. (f) Microsystème permettant la formation d'agrégats par diélectrophorèse et leur étude par impédance [Cottet, 2018].

Lorsque l'on passe à l'étude de structures 3D telles que les sphéroïdes, la problématique de mesure change, puisque les cellules ne sont pas directement en contact avec les électrodes. Deux principales stratégies existent (figure 2.13) : celles basées sur l'utilisation d'une matrice pour cultiver les sphéroïdes et celles qui ne le sont pas [Alexander, Eggert et al., 2019, Gerasimenko et al., 2020]. Parmi ces dernières, on peut citer des systèmes qui utilisent des micro-cavités dont les murs sont recouverts d'électrodes pour étudier les sphéroïdes (figure 2.13,a). C'est le cas de l'équipe de [Eichler et al., 2015] qui a développé un réseau d'électrodes adapté à une plaque 96 puits pour la mesure d'impédance. Cependant, le système développé par cette équipe ne permet que la mesure d'impédance et pas la culture des sphéroïdes in situ. Il est donc nécessaire de déplacer les sphéroïdes, produits par une autre technique (méthode de la goutte pendante), ce qui est chronophage, peut endommager les sphéroïdes et limite le nombre de sphéroïdes pouvant être étudiés en parallèle. Des complexifications du réseau d'électrodes ont été effectuées par cette équipe [Zitzmann et al., 2022], afin d'avoir une meilleure résolution spatiale de la mesure, sans toutefois permettre la culture des sphéroïdes au sein du même système.

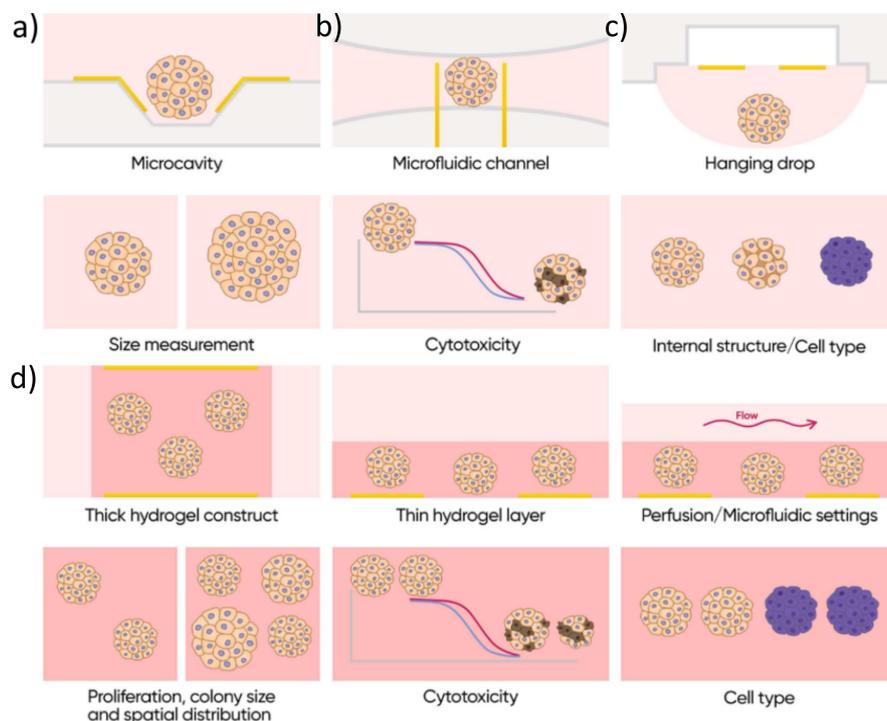


FIGURE 2.13 – Application de la spectroscopie d'impédance sur des modèles cellulaires 3D [Gerasimenko et al., 2020]. (a-c) Méthodes sans matrice et leurs applications : (a) réseau d'électrodes dans des micro-cavités, (b) électrodes dans un canal microfluidique, (c) électrodes intégrées à un système de culture par la méthode de la goutte pendante. (d) Méthodes avec matrice et leurs applications.

D'autres méthodes reposent sur l'utilisation de la microfluidique (figure 2.13,b) comme pour le système développé par [Luongo et al., 2013] (figure 2.12,b). Ce système est composé d'un canal microfluidique dans lequel est introduite une solution contenant un sphéroïde et ce canal est structuré pour permettre le piégeage passif de ce sphéroïde au-dessus des électrodes. Cette équipe a notamment étudié la signature électrique de sphéroïdes de différentes tailles ou de billes de polystyrène par rapport à des solutions de conductivité variable, pour montrer une différence de réponse en fréquence dans les cas avec et sans particules dans le milieu. Cela permet de confirmer que les variations d'impédance mesurées ne sont pas uniquement dues au changement de conductivité globale de la solution contenant les sphéroïdes mais aussi à leur présence, qui perturbe localement les lignes de champ électrique. Cependant, ce système nécessite une manipulation des sphéroïdes pour les introduire dans le canal et ne permet l'étude

que d'un seul sphéroïde à la fois.

Un autre système microfluidique, développé précédemment dans l'équipe Bio-Ingénierie du laboratoire Ampère, consiste à former des agrégats par diélectrophorèse à partir d'un nombre connu et précis de cellules, arrivant une par une par un canal (figure 2.12,f). Cet agrégat peut ensuite être étudié par impédance grâce à des électrodes placées plus loin dans le canal [Cottet, Kehren, Lintel et al., 2019, Cottet, 2018]. Cependant les agrégats produits sont de taille limitée et le temps d'expérimentation est long puisqu'ils sont produits un par un.

Il existe aussi des systèmes qui intègrent à la fois la production de sphéroïdes, comme par exemple avec la méthode de la goutte pendante (figure 2.13,c), et des électrodes pour le suivi par impédance. Le système de l'équipe de [Schmid et al., 2016] permet la culture sous perfusion de sphéroïdes et leur suivi par impédance. Cependant, un faible nombre (ordre de la dizaine) de sphéroïdes peuvent être étudiés en parallèle dans le système développé.

De plus, dans les travaux présentés ici, l'objectif est de réaliser des mesures d'impédance après électroporation des sphéroïdes. Les électrodes des systèmes présentés précédemment sont conçues pour des mesures d'impédance mais ces configurations ne sont pas forcément adaptées à l'application d'un champ électrique homogène permettant la réalisation d'EPN. Or si le champ n'est pas homogène, l'interprétation des résultats peut s'avérer complexe car tous les sphéroïdes ne voient pas le même champ.

En ce qui concerne les méthodes basées sur l'utilisation de matrice (figure 2.13,d), comme les techniques de production de sphéroïdes présentées dans la partie 1.4.4.6, la solution la plus simple pour réaliser la mesure d'impédance est de placer des électrodes de part et d'autre de la matrice contenant les sphéroïdes, avec des électrodes parallèles horizontales ou verticales, et d'étudier la réponse globale du système (figure 2.12,c) [Pan et al., 2019]. Dans les travaux développés ici, c'est cette configuration qui est privilégiée car elle permet aussi une électroporation des sphéroïdes avec un champ uniforme. En comparaison avec les solutions existantes, la solution développée permet de produire un réseau de sphéroïdes de caractéristiques contrôlées (taille, emplacement) ce qui facilite la reproductibilité des résultats par rapport aux techniques existantes pour lesquelles les sphéroïdes se forment de manière aléatoire dans la matrice et n'ont donc pas une taille et un emplacement répétables.

Il est aussi possible d'utiliser des électrodes co-planaires telles que des IDE (figure 2.12,d) lorsque la matrice est plus fine et que les sphéroïdes sont situés dans le même plan. C'est le cas de ceux cultivés dans des micropuits ou sur des couches de bio-matériaux empêchant l'adhésion des cellules et favorisant leur agrégation [Lei et al., 2017]. La présence de matrice permet également de réaliser une culture sous perfusion afin de mieux reproduire l'environnement existant *in vivo*, sans perturber les cellules avec le flux. Cette piste d'amélioration des mesures avec des IDE est explorée dans les travaux présentés ici. De plus, une méthode permettant l'amélioration de la sensibilité des mesures d'impédance, basée sur une modification de la conductivité du milieu de mesure, est exposée dans le chapitre 5.

Dans tous les cas, la culture dans une matrice nécessite une étude préalable des propriétés électriques de la matrice seule, afin d'évaluer son influence sur la mesure d'impédance, d'où l'intérêt de réaliser des mesures différentielles [Alexander, Eggert et al., 2019]. Il faut également prendre en compte l'éventuelle dégradation de la matrice au cours de la culture, qui peut aussi influencer la mesure. L'équipe de [Pan et al., 2019] qui a étudié l'impact de la matrice a constaté qu'en 3D, la présence de cellules diminuait l'impédance globale du système sur la plage de fréquences entre 1 et 100 kHz. Cela est dû à une augmentation de la conductivité de la matrice après l'ajout de cellules, attribuée notamment à la présence de jonctions intercellulaires assurant la cohésion du tissu et favorisant également la conduction ionique, en plus de l'impact des cellules elles-mêmes.

Les mesures macroscopiques ne permettant pas de donner des informations précises sur chaque sphéroïde, certaines équipes se sont tournées vers l'utilisation de réseaux d'électrodes afin d'améliorer la résolution spatiale de la mesure. C'est le cas de [Canali et al., 2015], avec une chambre de culture entourée de quatre électrodes verticales. Cette équipe compare des mesures à deux et trois électrodes, afin de réduire leur polarisation et d'avoir une sensibilité tantôt au centre, tantôt sur les bords de la chambre selon les électrodes utilisées pour la mesure. D'autres équipes vont même plus loin en allant vers la tomographie d'impédance électrique (figure 2.12,e) [H. Wu et al., 2018], qui consiste à reconstruire la distribution de la conductivité en 3D grâce aux mesures d'impédance, en utilisant un réseau d'électrodes permettant de quadriller le volume. À terme, dans des travaux envisagés à l'issue de cette thèse, la piste de l'individualisation des mesures grâce à la mise au point d'un réseau de micro-électrodes sera explorée, afin d'aller vers des mesures sur sphéroïde unique pour un grand nombre de sphéroïdes en parallèle.

En termes d'applications, certaines sont communes aux techniques avec et sans matrice, comme le suivi de taille, la discrimination du type cellulaire ou l'étude de la cytotoxicité de molécules, mais d'autres sont plus spécifiques à l'une ou l'autre. En effet, les techniques sans matrice sont plutôt associées à la mesure sur sphéroïde unique, tandis que l'étude sur un volume contenant plusieurs sphéroïdes dans une matrice permet des mesures plus globales comme la prolifération et la colonisation d'une matrice (figure 2.13,d). Une des applications sur lesquelles se concentre le travail présenté ici est l'étude de la réponse des sphéroïdes à un traitement, puisque l'objectif du micro-système développé est l'étude de traitement anticancéreux basés sur l'EPN.

2.4.4 Le cas du suivi de la réponse de sphéroïdes à un traitement

Pour évaluer simplement les performances de leur système à mesurer la dynamique des effets induits par des molécules sur les cellules, certaines équipes quantifient l'atteinte à l'intégrité de la membrane ou la mort cellulaire, visible sur le spectre d'impédance. Dans un premier temps, l'effet du TritonX-100, un agent chimique qui perméabilise les cellules, peut être mesuré et comparé à un contrôle sain, comme c'est le cas de [Curto et al., 2018] (figure 2.14,a).

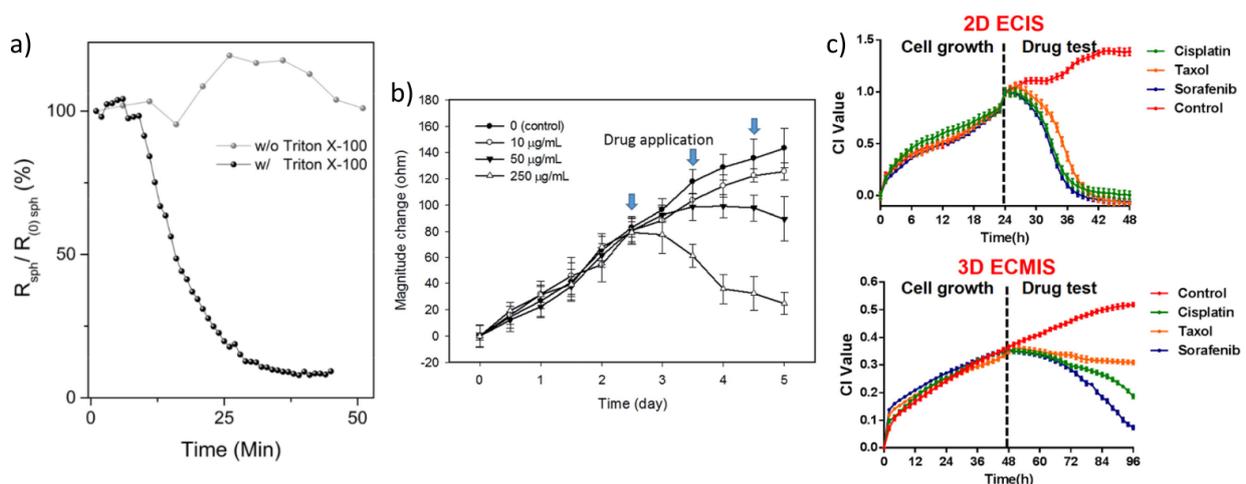


FIGURE 2.14 – Impact de molécules sur la viabilité de sphéroïdes mesuré par bio-impédance. (a) Diminution de la résistance équivalente d'un sphéroïde due à la mise en présence avec du TritonX-100 entraînant une perméabilisation de la membrane des cellules [Curto et al., 2018]. (b) Effet de concentrations croissantes de l'anticancéreux doxorubicine sur des sphéroïdes [Lei et al., 2017]. (c) Effet de différents médicaments sur des cellules cultivées en 2D (haut) ou en 3D (bas) [Pan et al., 2019].

Pour aller vers des applications plus concrètes, d'autres équipes mettent à profit la mesure

de bio-impédance pour caractériser en temps réel l'effet de médicaments. Cela est utile pour tester différentes concentrations de médicaments (figure 2.14,b) ou comparer leur effet (figure 2.14,c). Ces différentes études utilisent plusieurs représentations des résultats, soit en modélisant l'impédance mesurée pour déduire la valeur d'un composant qui représente la part d'impédance due au sphéroïde [Curto et al., 2018], soit en calculant la variation d'impédance par rapport à une référence sans cellules [Lei et al., 2017, Pan et al., 2019], mais toutes démontrent un effet significatif du traitement appliqué sur l'impédance mesurée. L'équipe de [Pan et al., 2019] a même mis en avant des différences de réponses entre les modèles cellulaires 2D et 3D (figure 2.14,c). De plus, en s'intéressant à l'évolution de l'impédance sur le spectre complet et pas seulement à la valeur normalisée moyennée sur une fréquence ou plage de fréquences donnée, [Molckovsky et al., 2001] ont réussi à mettre en avant des différences de réponses en fréquence selon le type de mort cellulaire induite par les différents médicaments testés.

Le développement de ces systèmes de suivi en temps réel d'agrégats cellulaires 3D présente un réel avantage pour l'utilisation à l'échelle industrielle de ces modèles 3D, en facilitant les mesures et en permettant une résolution temporelle élevée. Cependant, les systèmes existants sont souvent très complexes et spécifiques à une application donnée, et donc incompatibles avec une utilisation standardisée. De plus, ils ne permettent pas toujours une analyse à haut rendement et la résolution spatiale des mesures est encore limitée. Des pistes d'amélioration possibles sont l'intégration de plusieurs capteurs (pH ou O_2 par exemple) pour avoir un suivi multimodal des caractéristiques biologiques des agrégats cellulaires [De León et al., 2020]. Pour aller dans ce sens, les recherches futures devront également s'attacher à analyser tout le spectre en fréquence de l'impédance, et pas uniquement se concentrer sur l'analyse des changements de l'impédance à la seule fréquence où ils sont maximaux, même si l'interprétation des paramètres influençant l'impédance peut s'avérer complexe pour des agrégats 3D [Gerasimenko et al., 2020].

Conclusion

Dans ce deuxième chapitre introduisant des notions nécessaires à la compréhension du sujet, nous avons pu voir l'intérêt des méthodes optiques pour la caractérisation de divers paramètres biologiques des cellules. Elles permettent une analyse précise de la réponse des sphéroïdes à un traitement, en allant même jusqu'à déterminer les différences d'effet dans le volume du sphéroïde. Cependant, elles sont souvent associées à l'utilisation de marqueurs fluorescents et nécessitent des protocoles chronophages et réalisés à l'issue de l'expérience. En conséquence, des méthodes sans marquage permettant un suivi en temps réel et n'obligeant pas forcément à avoir des échantillons transparents ont été développées, afin de permettre une analyse complémentaire et multimodale des sphéroïdes. Parmi elles, la mesure de bio-impédance électrique a retenu notre attention puisque le microsystème développé ici est déjà équipé d'électrodes permettant de réaliser ces mesures. La bio-impédance permet de caractériser les propriétés électriques d'un échantillon biologique en mesurant la réponse de l'échantillon au passage d'un faible courant sinusoïdal. La mesure requiert toutefois une très bonne maîtrise des paramètres extérieurs comme la température, et nécessite des développements en termes de configuration d'électrodes pour obtenir une mesure sensible et répétable, notamment à cause du comportement capacitif de la double couche ionique qui existe à l'interface électrode-électrolyte. Les applications de la mesure de bio-impédance sur les modèles cellulaires sont principalement la caractérisation du type cellulaire ou des propriétés de la cellule (membrane, cytoplasme), le suivi de croissance et le suivi de la réponse à un traitement chimique ou médicamenteux, aussi bien sur des structures cellulaires 2D que 3D.

Tous les concepts et outils nécessaires à la compréhension du sujet ayant été présentés, les chapitres suivants s'attellent à présenter et discuter les résultats obtenus durant cette thèse, et en premier lieu la conception, caractérisation et preuve de concept du microsystème développé.

CHAPITRE 3

MICROSYSTÈME POUR LA CULTURE, LE SUIVI ET L'ÉLECTROPORATION DE SPHÉROÏDES

Sommaire

Introduction	54
3.1 Méthode de production des sphéroïdes	54
3.1.1 Protocole	54
3.1.2 Étude de la régularité en taille des sphéroïdes	55
3.2 Principe et fabrication du microsytème	56
3.2.1 Fabrication des micropuits en hydrogel	57
3.2.2 Montage de la chambre microfluidique	58
3.2.3 Dispositif de serrage et montage du microsytème	58
3.2.4 Procédure d'EPN des sphéroïdes	59
3.3 Caractérisation du microsytème	60
3.3.1 Modélisation électrique par mesure d'impédance	60
3.3.2 Détermination de la fréquence de travail	62
3.3.3 Modélisation COMSOL de la répartition du champ électrique	62
3.3.4 Caractérisation du changement de milieu dans la chambre microfluidique	65
3.4 Preuve de concept de l'efficacité d'électroporation	68
3.4.1 Détermination des paramètres d'électroporation par méthode de fluo- rescence	68
3.4.1.1 Protocole de la quantification de l'efficacité d'EPN par fluo- rescence	70
3.4.1.2 Résultats expérimentaux	71
3.4.2 Application à l'électrochimiothérapie	74
Conclusion	78

Introduction

Dans le premier chapitre, l'intérêt des sphéroïdes comme modèle biologique du tissu tumoral a été mis en avant. Il a également été montré que l'utilisation de dispositifs microfluidiques permettant l'étude de l'électroporation sur ces modèles tumoraux était pertinente par rapport aux technologies existantes. En s'appuyant sur l'expertise de l'Institut Lumière Matière pour la production de sphéroïdes, le microsystème développé ici combine ces deux technologies et permet la culture, le suivi et l'électroporation de plusieurs centaines de sphéroïdes en parallèle, situés au sein de micropuits structurés dans une matrice en hydrogel. Celle-ci est intégrée dans une chambre microfluidique, formant le cœur du microsystème développé.

Ce chapitre a pour objectif de détailler le principe de fonctionnement et la fabrication de ce microsystème. Sa caractérisation électrique et fluide est réalisée afin de déterminer le champ électrique effectivement perçu par les sphéroïdes lors de leur EPN et d'assurer des conditions reproductibles. Les paramètres d'EPN à utiliser sont ensuite déterminés par une méthode basée sur la quantification de la fluorescence liée à l'EPN des cellules. Enfin, une preuve de concept de l'application du microsystème en tant que plateforme de test de traitement anticancéreux est réalisée, avec une molécule classiquement utilisée en électrochimiothérapie, la bléomycine, sur des sphéroïdes de cellules de cancer colorectal.

Le contenu de ce chapitre est basé sur l'article publié suite à ces travaux : Bregigeon, P., Rivière, C., Franqueville, L., Vollaire, C., Marchalot, J., Frénéa-Robin, M., 2022. *Integrated platform for culture, observation, and parallelized electroporation of spheroids*. *Lab on a Chip* 22, 2489–2501 (DOI).

3.1 Méthode de production des sphéroïdes

3.1.1 Protocole

Les cellules étudiées ici sont des cellules de lignée stabilisée de cancer colorectal HT29 (ATCC). Elles sont cultivées dans un mélange de milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, Dutscher) complété par 10% de sérum foetal bovin inactivé par chauffage (FBS, Dutscher), 1% d'acides aminés non-essentiels 100X (NEAA, Dutscher) et 1% de pénicilline/streptomycine 100X (Dutscher), dans des flacons de culture cellulaire T-25 placés dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 . Ce milieu sera appelé milieu de culture dans la suite de cette thèse. Il est renouvelé tous les 2 à 3 jours et les cellules sont passées pour les diluer une fois par semaine.

L'ensemencement dans les puits en hydrogel est illustré sur la figure 3.2, étape 2. Le passage des cellules est tout d'abord réalisé avec de la Trypsine EDTA 10X (0.5 mL/flasque T25, Dutscher) permettant de les détacher. Elles sont ensuite remises en suspension dans du milieu de culture, comptées à l'aide d'une lame de Neubauer et centrifugées à 1200 rotations par minute pendant 3 minutes. Un volume déterminé de milieu de culture est ajouté au culot cellulaire pour atteindre la concentration cellulaire désirée. La lame sur laquelle est moulé l'hydrogel microstructuré est placée dans une boîte de Pétri de diamètre 6 cm. Un joint, découpé dans une plaque de PDMS de hauteur 5 mm environ, est désinfecté à l'éthanol 70% et placé autour de l'hydrogel afin de former une chambre dans laquelle est déposé un volume de 200 μ L de suspension cellulaire homogénéisée contenant 50 000 cellules. On laisse ensuite les cellules sédimenter dans le fond des micropuits pendant 10 min. Le surplus de cellules est éliminé par pipetage de la solution excédentaire, et 5 mL de milieu de culture sont ajoutés. Les hydrogels ensemencés sont incubés pendant 3 jours à 37°C+5% de CO_2 pour former un réseau de sphéroïdes aux caractéris-

tiques contrôlées et uniformes (taille et espacement), comme le montre la figure 3.2 à l'étape 3.1.

Comme il n'est pas possible de compter le nombre de cellules sédimentées dans chaque puits à cause de leur grand nombre, celui-ci est estimé par comparaison de la taille obtenue en 3 jours avec une technique classique de production de sphéroïdes, les plaques à ultra-faible adhésion 96 puits. Pour cela, des puits sontensemencés avec différents nombres de cellules (de 20 à 320 cellules par puits). Le diamètre moyen des sphéroïdes obtenus au bout de 3 jours de culture, mesuré sur le logiciel ImageJ, est comparé au diamètre moyen obtenu pour les sphéroïdes formés dans les micropuits en hydrogel. Ce diamètre est obtenu à partir de l'aire donnée par le logiciel et en remontant au diamètre apparent en approximant la forme de la section du sphéroïde observée à celle d'un cercle.

Les résultats présentés dans le tableau 3.1 permettent d'estimer que 30 à 40 cellules se déposent dans chaque puits durant leur ensemencement avec cette méthode, même si cela ne reste qu'une approximation puisque les conditions ne sont pas les mêmes dans la plaque multi-puits, dont le diamètre fait plusieurs mm contre 200 μm dans l'hydrogel.

Diamètre dans les micropuits	Diamètre dans la plaque 96 puits		
	20 cellules/puits	40 cellules/puits	80 cellules/puits
110 \pm 15 μm .	88 \pm 13 μm .	122 \pm 14 μm .	145 \pm 10 μm .

TABLE 3.1 – Estimation du nombre de cellules ensemencées par puits de diamètre 200 μm .

3.1.2 Étude de la régularité en taille des sphéroïdes

Afin de caractériser la régularité en taille des sphéroïdes, l'évolution du diamètre des sphéroïdes a été étudiée pour 3 lames différentes de la même expérience, de 3 à 6 jours après l'ensemencement des cellules (figure 3.1). Les résultats montrent que l'écart-type standard du diamètre est de 12 à 14 μm , ce qui est inférieur ou du même ordre de grandeur par rapport à d'autres techniques de production de sphéroïdes, pour lesquelles le protocole employé est plus fastidieux. Par exemple, [W. Zhang et al., 2016] ont obtenu une déviation d'environ 30 à 40 μm pour la formation de sphéroïdes avec la méthode de la goutte pendante, de diamètre comparable à celui des sphéroïdes produits ici (200 μm).

De plus, pour s'assurer qu'il n'y a pas de déviation de taille entre les différentes zones de micropuits composant le réseau de micropuits (16 zones de 20 micropuits), le diamètre des sphéroïdes a été mesuré et comparé entre toutes les zones. La figure 3.1,b montre que les diamètres moyens de chaque zone sont comparables et proches du diamètre moyen de l'ensemble du réseau (barre orange), assurant qu'il n'y a pas de déviation de taille significative sur le réseau. On peut également noter que l'écart-type obtenu ici (17 μm) est proche des valeurs déterminées dans la figure 3.1,a, toutes réalisées selon la même méthode de mesure sur le logiciel ImageJ.

Par conséquent, la méthode utilisée ici permet la production de sphéroïdes réguliers, à la fois sur un réseau de micropuits et entre les réseaux, ce qui assure la reproductibilité des résultats. En effet, cela empêche d'avoir des résultats d'électroporation biaisés en raison d'une grande distribution de taille, puisque l'effet des champs électriques pulsés dépend de la taille des cellules [Gibot, M.-P. Rols, 2013].

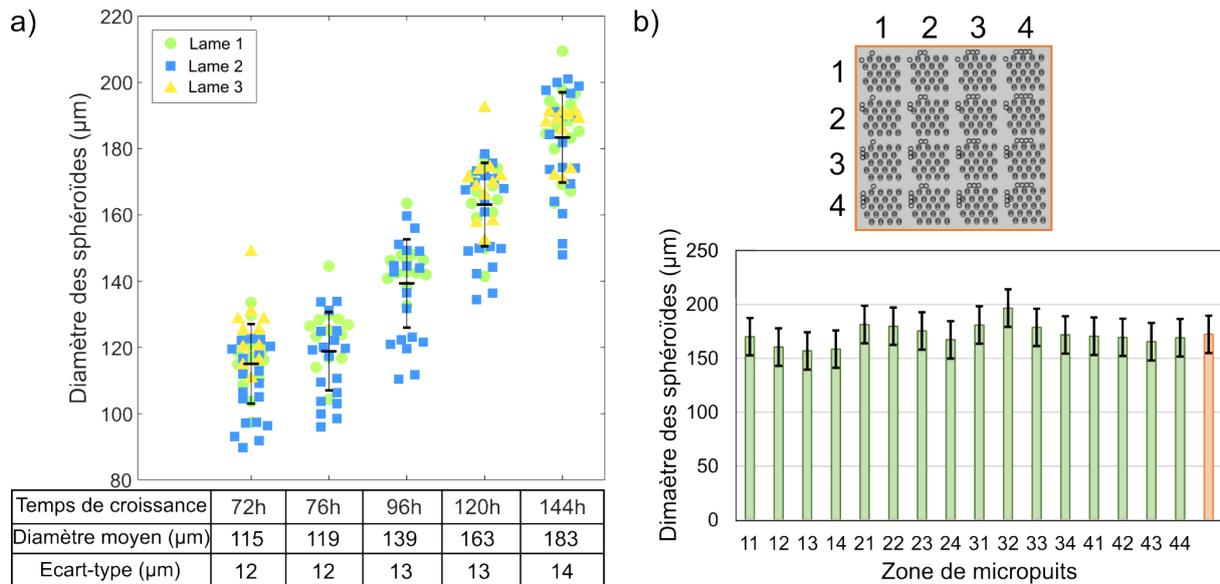


FIGURE 3.1 – (a) Évolution du diamètre des sphéroïdes de cellules HT29 de trois lames différentes ($N = 16$ sphéroïdes/lame). Point = valeur pour un sphéroïde imagé, Longue ligne horizontale = moyenne, Petite ligne horizontale = écart-type standard. (b) Étude de la régularité du diamètre de sphéroïdes de cellules HT29 au bout de 120h de culture (moyenne \pm écart-type) sur toutes les zones de micropuits d'un hydrogel (une expérience). Vert = Diamètre moyen sur une zone de 20 micropuits, Orange = Diamètre moyen sur l'ensemble du réseau.

3.2 Principe et fabrication du microsystème

La conception et le principe de fonctionnement du microsystème sont présentés dans la figure 3.2. Il est composé d'une chambre microfluidique constituée de deux électrodes parallèles transparentes, intégrées à des pièces découpées dans du poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA ou Plexiglas®) permettant l'étanchéité, le contact électrique et l'observation au microscope inversé. Ce microsystème permet l'électroporation de centaines de sphéroïdes en parallèle de forme, de taille et d'espacement similaires. Ces sphéroïdes sont produits et cultivés dans un hydrogel d'agarose micro-structuré greffé sur l'électrode inférieure de la chambre microfluidique.

Cet hydrogel présente plusieurs avantages et est largement utilisé dans les systèmes d'ingénierie tissulaire et de culture cellulaire microfluidique [Rosser et al., 2015, Zarrintaj et al., 2018]. Ses propriétés mécaniques ajustables peuvent reproduire la rigidité du micro-environnement *in vivo* et sa porosité permet la libre diffusion des ions et des petites molécules comme les protéines [Pluen et al., 1999] (taille des pores < 30 nm dans l'agarose à 2%). En effet, l'échange de milieu dans la chambre microfluidique est régi par deux mécanismes principaux : (1) la convection du flux au-dessus de l'hydrogel, (2) la diffusion des ions et des molécules à l'intérieur de l'hydrogel (pas de flux convectif dans l'hydrogel). Ainsi, l'hydrogel agit comme une matrice inerte biologiquement pour la croissance des sphéroïdes, qui a des propriétés proches des tissus en termes de rigidité (1.5 kPa [Prunet et al., 2020]). Il permet également de maintenir les sphéroïdes dans leur emplacement ce qui facilite leur suivi et limite les risques de les endommager lors de certaines étapes du protocole, comme l'ajout et le renouvellement de milieu par exemple.

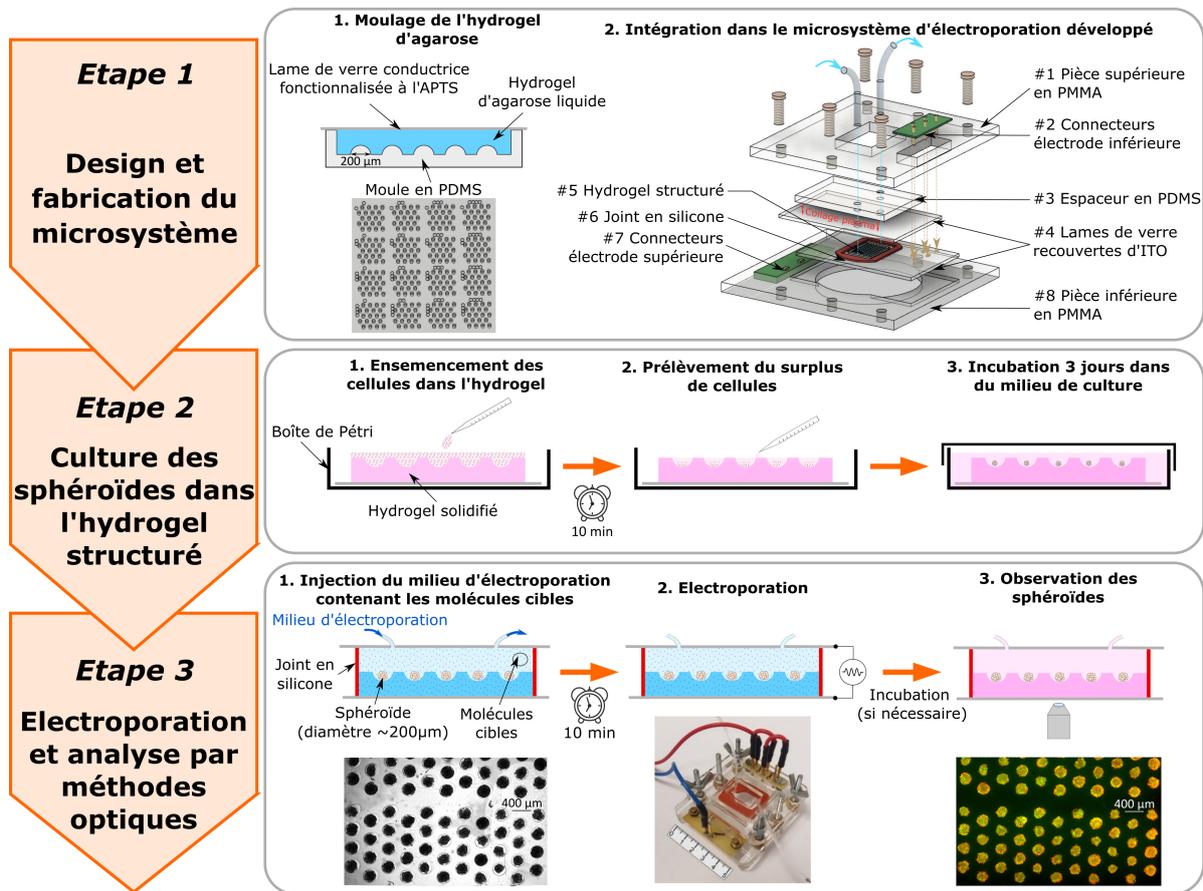


FIGURE 3.2 – Conception, fabrication et utilisation du microsystème comme plateforme de culture et d'électroporation de sphéroïdes. **Étape 1** Fabrication du dispositif : schéma du moulage et du réseau de micropuits obtenu (1.1), vue éclatée du dispositif (1.2). **Étape 2** Protocole de culture des sphéroïdes dans l'hydrogel microstructuré. **Étape 3** Électroporation et imagerie : injection du tampon EPN dans le dispositif contenant les sphéroïdes (champ clair $\times 2.5$, 3.1), puis EPN dans le dispositif monté (photo, 3.2), et imagerie par microscopie optique à épifluorescence ($\times 2.5$, 3.3).

3.2.1 Fabrication des micropuits en hydrogel

Le protocole de fabrication des micropuits est basé sur un brevet déposé par l'équipe biophysique de l'Institut Lumière Matière [Rivière et al., 2018]. Afin de réaliser le moulage des micropuits en hydrogel, un moule métallique est d'abord fabriqué à l'aide d'une micro-fraiseuse (dixi polytool 7032, diamètre 200 μm , longueur 300 μm) pour créer un réseau de 320 micropuits semi-sphériques de 200 μm de diamètre et 220 μm de profondeur. Une empreinte négative réutilisable en polydiméthylsiloxane (PDMS) est ensuite fabriquée à partir de ce moule principal (figure 3.3), le protocole étant détaillé dans l'annexe B. Ce moule en PDMS permet ensuite la réalisation du réseau de micropuits en hydrogel (figure 3.2, étape 1.1). Les dimensions (diamètre et profondeur) des puits ou plots de ces moules et moulages obtenus ont été caractérisées grâce à un profilomètre optique (voir annexe C).

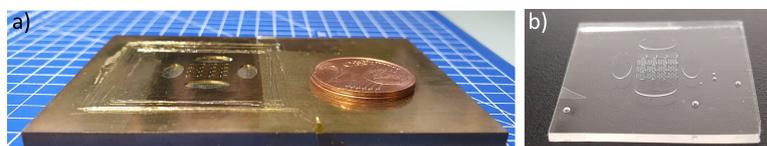


FIGURE 3.3 – (a) Moule métallique micro-fraisé. (b) Réplique négative en PDMS.

La première étape est de fonctionnaliser chimiquement le support sur lequel on va mouler l'hydrogel afin qu'il reste greffé à sa surface lors du démoulage. Pour cela, on réalise une silanisation à l'aide d'une solution de (3-Aminopropyl) triéthoxysilane (APTS) (Merck) (1% d'APTS et 5 mM d'acide acétique dans de l'eau dé-ionisée). L'adaptation du protocole classiquement utilisé à l'ILM réalisée dans le cadre de cette thèse consiste à utiliser comme support une lame recouverte d'une fine couche d'oxyde d'indium-étain (ITO, Merck), la rendant conductrice tout en restant transparente (120-160 nm), afin de permettre l'application du champ électrique pulsé par la suite. Le moulage de l'hydrogel est ensuite réalisé en utilisant une solution d'agarose à 2% (p/v), préparée en dissolvant de l'agarose standard (Merck) dans de l'eau dé-ionisée. Elle est autoclavée et conservée à 78°C. Un faible volume de cette solution (ici 100 μ L), dépendant de la surface moulée, est versé sur le moule PDMS et la lame d'ITO fonctionnalisée est placée sur l'hydrogel, tous deux ayant été préchauffés à 78°C. Il est ensuite laissé 10 min à température ambiante pour permettre sa gélification, avant de le démouler (Figure 1, étape 1.1). La lame d'ITO recouverte de l'hydrogel micro-structuré est ensuite placée dans une boîte de Pétri avec une solution saline tamponnée au phosphate sans calcium ni magnésium (PBS, Dutscher) et stérilisée à la lumière UV-C pendant 25 min (24 W, 254 nm) pour éviter toute contamination bactérienne par la suite.

3.2.2 Montage de la chambre microfluidique

Deux joints de 0.5 mm d'épaisseur (Grace Bio-Labs, Merck), découpés à l'aide d'une machine à découper Silhouette Cameo, sont superposés et placés autour de l'hydrogel, et la chambre microfluidique ainsi obtenue est fermée sur le dessus avec une autre lame de verre recouverte d'ITO. La superposition de deux joints permet d'observer une meilleure étanchéité dans notre cas. L'hydrogel contenant les sphéroïdes est ainsi pris en sandwich entre deux lames de verre conductrices utilisées comme électrodes pour l'EPN (figure 3.2, étape 1.2, pièces #4 à #6).

Afin de permettre l'injection de milieu dans cette chambre, deux trous ont été préalablement percés dans la lame supérieure à l'aide d'un jet micro-abrasif (Microblaster®, Comco Inc). Une plaque de PDMS (pièce #3), dans laquelle des trous de même diamètre ont également été poinçonnés, est alignée et collée à la lame de verre par activation au plasma à air (nettoyeur plasma Harrick). Cela permet d'y insérer des capillaires pour l'injection du milieu.

3.2.3 Dispositif de serrage et montage du microsystème

Deux pièces en plexiglas (pièces #1 et #8) sont micro-usinées à l'aide d'une découpeuse laser (Speedy 400, Trotec). Une encoche de la taille des lames conductrices utilisées est réalisée sur la pièce inférieure afin d'y insérer la lame. Les pièces sont également conçues pour permettre d'y fixer des PCB ("Printed Circuit Board" ou circuit imprimé) assurant le contact électrique sur les lames conductrices (pièces #2 et #7). Ces PCB comportent des pistes de cuivre reliées d'une part aux connecteurs, qui sont en contact avec les couches conductrices présentes sur les lames de verre jouant le rôle d'électrodes, et d'autre part avec des contacts mâles permettant de brancher des fils reliant les électrodes au générateur employé pour réaliser l'EPN. Comme les deux lames sont décalées l'une par rapport à l'autre (figure 3.4,a), le contact est réalisé par le PCB du bas pour la lame du haut, avec des contacts à ressort en or (RS, référence 2199248-6), comme le montre la figure 3.4,b. À l'inverse, le contact sur la lame du bas est réalisé par le PCB du haut avec des pointes à ressort en bronze (RS, 2615092), comme le montre la figure 3.4,c.

La transparence du plexiglas permet un montage facile, notamment la vérification de l'apparition de bulles dans la chambre microfluidique, et le trou circulaire sur la pièce inférieure permet l'imagerie in situ des sphéroïdes avec un microscope inversé.

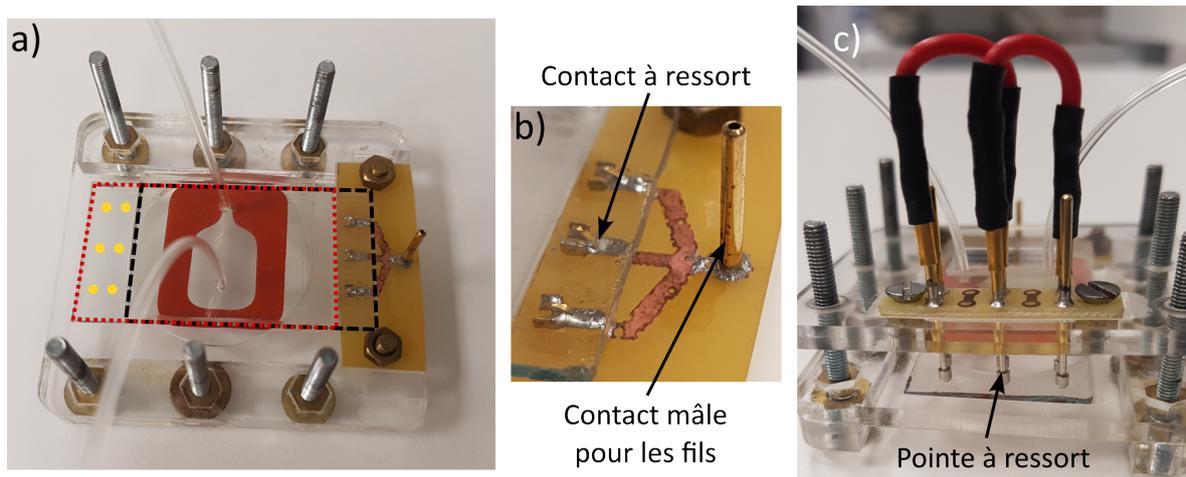


FIGURE 3.4 – Explication de la prise de contact sur les électrodes dans le microsystème. (a) Photo du microsystème sans la pièce en plexiglas du haut. Rectangles en pointillés = lames d'ITO en décalé, Cercles oranges = zones de contacts pour les pointes à ressorts (situées sur la pièce en plexiglas du haut). (b) Zoom sur les contacts à ressort pour la lame du haut. (c) Zoom sur les pointes à ressort pour le contact sur la lame du bas.

3.2.4 Procédure d'EPN des sphéroïdes

Pour réaliser l'électroporation des sphéroïdes cultivés dans l'hydrogel micro-structuré, il est nécessaire dans notre configuration de changer le milieu dans la chambre microfluidique contenant les sphéroïdes pour réduire la conductivité, en passant du milieu de culture (1.3 S/m) au tampon à base d'Hépès (0.03 S/m), appelé tampon EPN par la suite. Cela permet d'éviter d'avoir un courant trop élevé lors de l'application du champ électrique pulsé, qui ne pourrait pas être délivré par l'amplificateur de tension utilisé et qui pourrait entraîner un échauffement par effet Joule [García-Sánchez et al., 2018].

Ce tampon EPN est composé de 10 mM d'Hépès (Merck), de 1 mM de chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck) et de 250 mM de saccharose (Roth) dissous dans de l'eau dé-ionisée [Frandsen, Gibot et al., 2015], avec quelques gouttes d'hydroxyde de sodium 10 M (NaOH, Merck) pour ajuster le pH à 7.1. L'injection du tampon EPN (figure 3.2, étape 3.1), complété par les molécules cibles appropriées, est réalisée avec un temps et un volume calibrés pour un changement complet du milieu (voir section 3.3.4 ci-après).

Le microsystème est ensuite connecté au système d'EPN, composé d'un générateur de signaux arbitraires (3310A, Agilent Technologies) pour appliquer le champ électrique pulsé, amplifié par un amplificateur de puissance (HAS 4051, NF Corp) de bande passante 500 kHz et permettant de délivrer jusqu'à $1 A_{RMS}$ et $300 V_{pp}$. Un oscilloscope (DSO5012A, Agilent Technologies) est également utilisé pour visualiser la tension appliquée en entrée et le courant de sortie, ce dernier étant mesuré avec un capteur de courant à effet Hall (HY 5-P, LEM). La détermination des paramètres d'impulsion utilisés pour l'EPN est détaillée dans la section 3.4.1 ci-après.

Pour le suivi à long terme, le dispositif est soigneusement démonté et la lame supportant l'hydrogel contenant les sphéroïdes est remplacée en culture dans une boîte de Pétri contenant 5 mL de milieu de culture. La croissance des sphéroïdes peut alors être suivie pendant plusieurs jours. Par la suite, il sera envisagé de permettre la culture des sphéroïdes directement dans le microsystème sous perfusion de milieu de culture.

3.3 Caractérisation du microsystème

Afin de déterminer le champ électrique effectivement perçu par les sphéroïdes à l'intérieur de la chambre microfluidique, le dispositif a été entièrement caractérisé. Ce processus de caractérisation est assez rarement effectué dans la littérature, alors même que pour des systèmes utilisant des électrodes en oxyde d'indium étain (ITO), cela est particulièrement important pour connaître précisément le champ appliqué aux sphéroïdes. En effet, la conductivité électrique de l'ITO (0.7×10^6 S/m) est inférieure de plus d'un ordre de grandeur à celle d'autres métaux plus classiquement utilisés pour les électrodes (or : 45×10^6 S/m, acier inoxydable : 1.5×10^6 S/m...). Cela peut entraîner une chute de tension significative le long des lames conductrices, selon la conception, et rendre le champ électrique inhomogène. Toutefois, la distribution du champ électrique dans les dispositifs microfluidiques d'EPN est parfois déterminée par une modélisation multiphysique [Jain et al., 2012, Bian et al., 2017, Zhu et al., 2019], mais l'approche utilisée ici comprend également la détermination expérimentale de la chute de tension due aux contacts et à l'électrode en ITO grâce à des mesures d'impédance électrique. Ainsi, il y a ici une double caractérisation, celle des pertes liées aux contacts et à la chute de tension dans le matériau peu conducteur de l'électrode par mesure d'impédance d'une part, et celle de la répartition du champ par modélisation multiphysique avec le logiciel COMSOL d'autre part.

Comme indiqué précédemment (sous-partie "Procédure d'EPN des sphéroïdes" de la partie 3.2), un changement du milieu de culture vers le tampon EPN est réalisé avant l'EPN. Afin d'assurer une reproductibilité des conditions d'EPN, ce changement de milieu a également été caractérisé par méthode optique et par mesure d'impédance.

3.3.1 Modélisation électrique par mesure d'impédance

Afin de déterminer la chute de tension due aux contacts électriques et aux fils, l'impédance du microsystème contenant le tampon EPN est mesurée avec un analyseur d'impédance (4294A, Agilent Technologies, voir figure 3.5,a). À partir de ces résultats, on peut extraire les paramètres du modèle électrique du microsystème, déterminé grâce à la littérature (figure 3.5,b). Pour cela, un programme Python basé sur l'approximation des moindres carrés est utilisé. Il a été réalisé lors du stage de Martin Guillemaud au laboratoire Ampère.

Le système étudié ici, c'est-à-dire la chambre microfluidique, comprend les contacts et fils, que l'on peut modéliser par une résistance en série, l'interface électrode-électrolyte, dont la modélisation est quant à elle plus complexe, car son comportement dépend de la fréquence. En effet, les ions de la solution introduite dans la chambre forment une double couche électronique au niveau de l'interface avec l'électrode (voir partie 2.3.1.3), qui est modélisable par ce que l'on appelle un "Constant Phase Element" (CPE), permettant de prendre en compte le caractère capacitif imparfait de la double couche [McAdams et al., 1995]. Le reste du système peut être modélisé par un circuit RC parallèle [Green et al., 2002], la résistance représentant l'électrolyte, et l'aspect capacitif étant lié à la présence d'un électrolyte entre deux électrodes parallèles assez proches. Ce dernier n'a qu'un faible impact uniquement en hautes fréquences et peut être négligé pour des électrolytes très conducteurs [Koklu, 2019]. On a alors :

$$Z_{doublecouche} = K_{DL}(j\omega)^{-\beta}, \quad (3.1)$$

où K_{DL} est l'amplitude de l'impédance $Z_{doublecouche}$ de la double couche, ω est la pulsation et β est une constante allant de 0 à 1. Plus elle est proche de 1, plus le comportement de la double couche est capacitif, et plus elle est proche de 0, plus il est résistif.

À partir des mesures d'impédance complexe réalisées sur le système sans cellules, on peut alors extraire les paramètres du circuit électrique équivalent décrit précédemment (figure 3.5,b) :

$$\beta = 0.91, K_{DL} = 6.4 \times 10^4 \Omega, R_E = 245 \Omega, C = 1.07 \times 10^{-10} F, R_C = 43 \Omega. \quad (3.2)$$

avec R_E la résistance de l'électrolyte, C la capacité parasite, et R_C la résistance liée aux contacts et aux fils. L'électrolyte utilisé ici a pour conductivité $290 \mu\text{S}/\text{cm}$, et la chambre de mesure de surface 1.62 cm^2 est constituée de deux électrodes parallèles espacées de 1 mm , donc la résistance théorique est de 213Ω , ce qui est proche de la valeur de R_E trouvée par la modélisation (erreur de 15% pouvant être liée aux incertitudes de mesure de la conductivité et de l'aire de la chambre d'une part, et à la mesure d'impédance et à la modélisation d'autre part). De même, il est possible de calculer la capacité parasite en prenant pour permittivité relative celle de l'eau, soit 80, et les mêmes surface et écart inter-électrodes que pour le calcul de la résistance. La capacité théorique calculée est alors de $1.15 \times 10^{-10} \text{ F}$, soit une valeur très proche de la valeur issue du modèle électrique (erreur de 7% environ).

L'allure de l'impédance électrique de la chambre microfluidique mesurée et sa modélisation grâce à la fonction de transfert du circuit déterminé précédemment (figure 3.5,a et b) permet de montrer que le système a un comportement capacitif dû à la double couche électronique en basse fréquence ($< 10^3 \text{ Hz}$), ce qui est cohérent avec la valeur de β proche de 1. Le comportement pour des fréquences allant de 10^3 à 10^7 Hz est caractéristique du circuit RC parallèle représentant l'électrolyte, avec un plateau résistif suivi d'une chute d'impédance correspondant à la partie capacitive du RC parallèle, de fréquence de coupure $\omega_0 = \frac{1}{RC}$ égale à 6.5 MHz dans notre cas. Les fréquences supérieures à 10^7 Hz ne sont pas considérées dans cette étude, car l'EPN est réalisée bien en dessous de cette fréquence (environ 10 kHz), comme cela est montré dans la partie suivante.

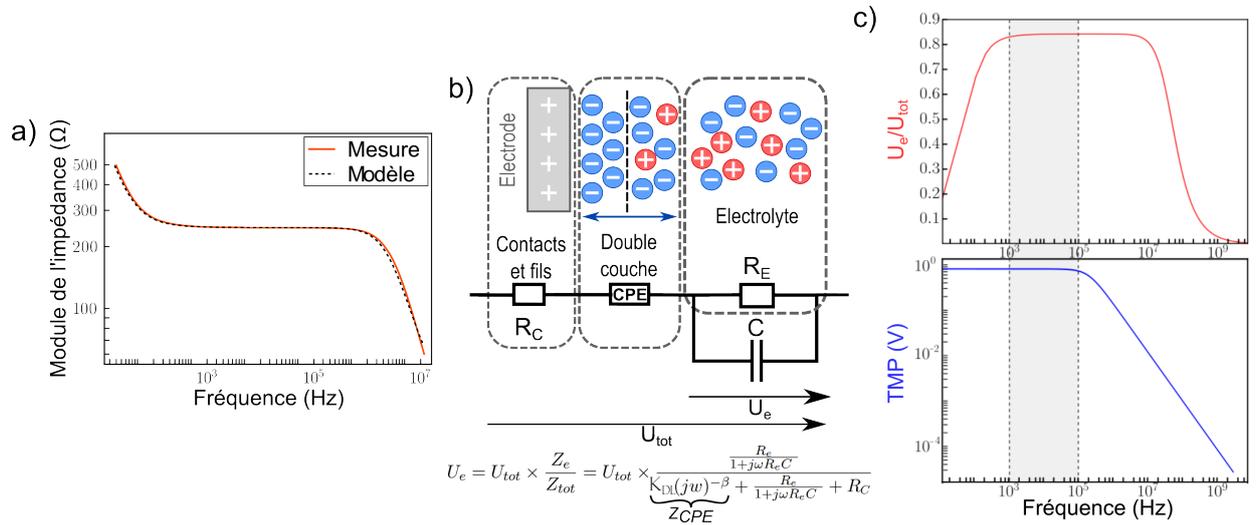


FIGURE 3.5 – (a) Mesure et courbe ajustée du module de l'impédance dans le microsystème contenant du tampon EPN sans hydrogel ni sphéroïdes. (b) Équation et schéma du modèle électrique de la chambre microfluidique. (c) Évolution du rapport de la tension U_e dans la chambre du dispositif étudié sur la tension appliquée U_{tot} , calculé à partir des paramètres du circuit électrique modélisé (rouge), et du potentiel transmembranaire induit par un champ de $800 \text{ V}/\text{cm}$ pour des cellules HT29 (bleu) en fonction de la fréquence.

3.3.2 Détermination de la fréquence de travail

Afin de choisir la fréquence permettant la meilleure efficacité d'EPN, il faut s'intéresser à la réponse en fréquence du système mais aussi à celle des cellules. Pour cela, on trace d'une part l'évolution en fréquence du rapport $\frac{U_e}{U_{tot}}$ pour déterminer les fréquences pour lesquelles la chute de tension dans la chambre microfluidique est minimale. D'autre part, on détermine la sensibilité des cellules à un champ électrique en calculant le potentiel transmembranaire induit pour les cellules étudiées, dont les propriétés électriques (conductivité, permittivité) sont issues du logiciel MyDEP [Cottet, Fabregue et al., 2019]. Ce potentiel transmembranaire induit $\Delta\Psi_m$, déjà introduit dans la partie 1.2.2, varie selon la fréquence, avec un comportement de passe-bas du premier ordre [Kotnik, Miklavcic, 2000] :

$$\Delta\Psi_m = 1.5 \times E \times R \cdot \cos(\theta) \cdot \frac{1}{1 + j\omega\tau_m} , \quad (3.3)$$

$$avec \tau_m = \frac{R \cdot (\varepsilon_m/d)}{\frac{2\sigma_{cyt}\sigma_e}{\sigma_{cyt} + 2\sigma_e} + \frac{R}{d}\sigma_m} \quad (3.4)$$

où E le champ appliqué (800 V/cm), $\omega = 2\pi f$ la pulsation, θ l'angle entre la direction du champ et la normale à la surface membranaire (on prend $\theta = 0$), R le rayon d'une cellule HT29 (6.6 μm), ε_m la permittivité d'une membrane de cellule HT29 (6.8×10^{-11}), d l'épaisseur d'une membrane (5 nm), σ_{cyt} la conductivité du cytoplasme (0.18 S/m), σ_m la conductivité de la membrane (1.1×10^{-4} S/m) [L. Wu et al., 2012] et σ_e la conductivité du milieu extérieur (0.03 S/m).

Sur la figure 3.5,c, on peut voir qu'au-delà de 100 kHz, le TMP induit et donc l'effet du champ électrique sur les membranes des cellules diminue fortement. En ce qui concerne le dispositif utilisé, les mesures d'impédance réalisées montrent qu'en dessous de 1 kHz, la chute de tension dans la chambre est très importante. Cela justifie le choix de 10 kHz comme fréquence de travail, puisque cette fréquence se situe dans la plage permettant la meilleure efficacité d'EPN (zone grisée), à savoir une minimisation de la chute de tension et une maximisation du TMP induit.

De plus, la chute de tension à cette fréquence est d'environ 15%, donc la tension effective à l'intérieur de la chambre contenant les sphéroïdes est égale à 85% de la tension appliquée à 10 kHz.

3.3.3 Modélisation COMSOL de la répartition du champ électrique

Pour évaluer le champ électrique effectivement perçu par les sphéroïdes, la distribution du champ électrique dans la chambre microfluidique a également été déterminée, grâce à une modélisation sur le logiciel de simulation multiphysique COMSOL. Le module "Electric Currents in Layered Shells (ecis)" a permis de modéliser la couche conductrice en ITO des électrodes. Sa conductivité (7×10^5 S/m) a été mesurée par une technique de mesure à 4 pointes et son épaisseur (134 ± 4 nm) a été déterminée par profilométrie. Ces couches conductrices sont placées de part et d'autre d'un bloc représentant la chambre microfluidique remplie de tampon EPN en l'absence de cellules et d'hydrogel (figure 3.6,a), qui a donc les propriétés de l'eau mais dont la conductivité est paramétrée à 0.03 S/m. Ce bloc est modélisé par le module "Electric Currents (ec)". L'interface entre les deux modules est réalisée par le couplage mutliphysique "Electric Currents Solid to Shell via Boundary". La tension appliquée aux bornes des électrodes dans la simulation est la valeur efficace de la tension la plus élevée testée dans les expériences. Ici, cela correspond à 106 V_{RMS} , soit 300 V_{pp} . Les conditions aux limites sont des conditions d'isolation électrique sur toutes les arrêtes des couches sauf celles où sont appliqués les potentiels, et sur

toutes les faces du bloc.

La figure 3.6,b permet de rendre compte de la chute de tension qui a lieu dans la couche d'ITO du fait de sa faible conductivité. Celle-ci est de l'ordre de 3%, ce qui explique en partie la chute de tension observée sur la figure 3.5,c, l'autre partie de la chute de tension mesurée étant due aux contacts électriques.

Les résultats de la modélisation du champ électrique (figure 3.6,c) montrent que la distribution du champ est homogène dans la chambre contenant les sphéroïdes (moins de 1% de variation), ce qui garantit que tous les sphéroïdes devraient soumis aux mêmes conditions de champ électrique. Il faut toutefois noter que les sphéroïdes ne sont ici pas simulés. Il pourrait être intéressant de rajouter des inclusions sphériques les représentant dans le modèle, mais les propriétés de ces inclusions ne sont pas aisées à déterminer. La distribution réelle du champ est en réalité influencée par la présence des sphéroïdes, puisque leurs propriétés électriques sont différentes de celle du milieu extérieur. Par ailleurs, l'effet de la double couche n'est pas considéré car il est négligeable à la fréquence de travail de 10 kHz (figure 3.5,a) mais la chute de tension due à la faible conductivité de l'ITO est bien prise en compte car les couches d'ITO modélisées ont l'épaisseur et la conductivité mesurées sur les électrodes d'ITO utilisées dans les expériences.

Le module COMSOL "Heat Transfer in Fluids" a également été utilisé pour estimer l'élévation de température en partant de 20°C liée à l'application du champ électrique pulsé de mêmes paramètres que celui utilisé pour l'EPN (valeur efficace de 300 V_{pp} soit 106 V_{RMS} , 10 kHz, 5 ms, voir figure 3.6,d). En effet, l'amplitude du signal sinusoïdal utilisé pour les tests d'EPN est exprimée en valeur "peak-to-peak" ou crête-à-crête (noté pp), soit la différence entre les valeurs maximales et minimales du signal sinusoïdal. La correspondance entre l'amplitude crête-à-crête A_{pp} du signal sinusoïdal appliqué et le champ électrique effectif E_{RMS} est donnée par la relation suivante :

$$E_{RMS} = \frac{0.85 \times A_{pp}}{2\sqrt{2}d}, \quad (3.5)$$

avec $d = 1$ mm la distance entre les électrodes.

Pour calculer cette élévation de température, une source de chaleur, liée aux pertes générées par l'application du potentiel, a été définie sur les faces inférieure et supérieure du bloc, qui sont en contact avec les couches conductrices. La température initiale a été définie à 293.15 K et des conditions aux limites d'isolation thermique ont été définies sur les autres faces du bloc, qui ne sont pas en contact avec les couches conductrices.

L'estimation de l'élévation de température induite par l'application d'un champ électrique de même amplitude et durée que celui utilisé expérimentalement, est de seulement 0.4°C lorsque le milieu dans la chambre fluide est du tampon EPN de conductivité 0.03 S/m, ce qui n'endommagera pas les cellules. Cependant, si on le remplace par du milieu de culture de conductivité 1.3 S/m, en gardant la même durée et amplitude du champ appliqué, l'échauffement est plus important, puisqu'il est d'environ 5°C, si on ne prend pas en compte les effets de bord.

Une estimation plus grossière de l'élévation de la température peut également être réalisée en calculant l'énergie électrique totale correspondant à l'application du champ électrique pulsé, donnée par l'équation suivante [Sherba et al., 2020] :

$$W = \sigma \times E^2 \times t \times v, \quad (3.6)$$

où W est l'énergie électrique (J), σ la conductivité de la solution d'EPN (S/m), E le champ électrique appliqué (V/m), t la durée de l'impulsion électrique (s) et v le volume total de solution d'EPN (m^3).

Et sous l'hypothèse que cette énergie est intégralement transformée en chaleur dans la solution d'EPN par effet Joule, on a l'équation suivante [Sherba et al., 2020] :

$$\Delta T = \frac{W}{\rho \times v \times C_p}, \quad (3.7)$$

où ΔT est l'élévation de température due à l'application de l'impulsion électrique, ρ est la densité de la solution (ici celle de l'eau, soit 1000 kg/m^3) et C_p la capacité calorifique de l'eau à température ambiante ($4184 \text{ J/kg}^\circ\text{C}$).

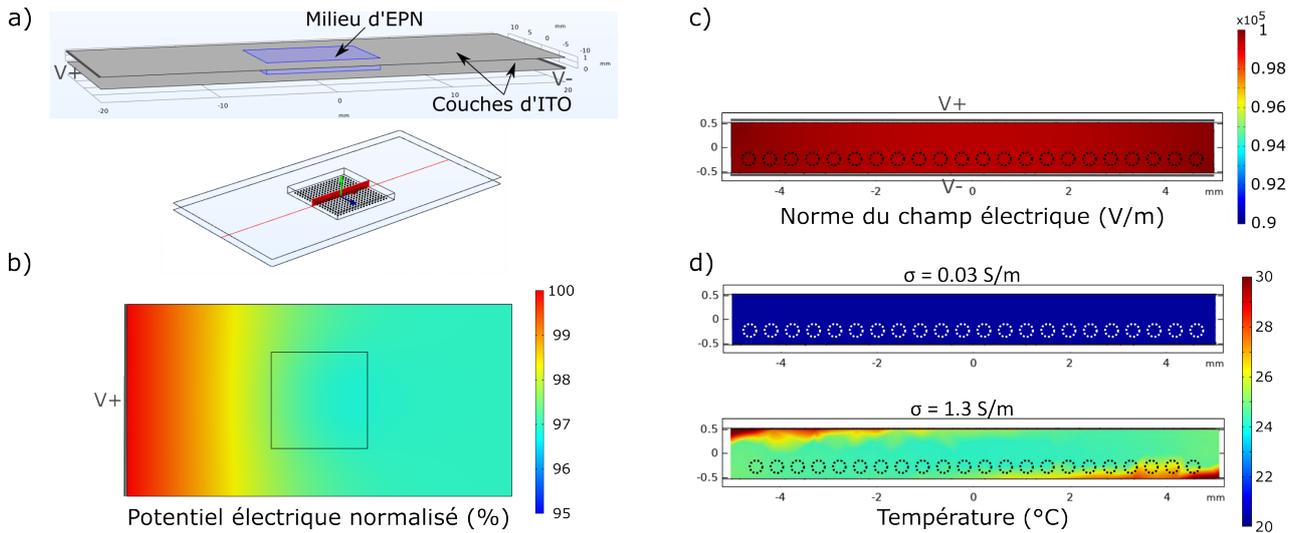


FIGURE 3.6 – (a) Modèle COMSOL de la chambre microfluidique et visualisation du plan de coupe transversal. (b) Évolution du potentiel dans la couche d'ITO normalisé par rapport au potentiel appliqué. (c) Norme du champ électrique dans une section transversale de la chambre pour $106 V_{RMS}$ appliqués (équivalent à $300 V_{pp}$). (d) Température dans une section transversale de la chambre après l'application d'un potentiel de $106 V_{RMS}$ pendant 5 ms pour deux conductivités : 0.03 S/m (tampon EPN, haut) et 1.3 S/m (milieu de culture, bas), pour une température initiale de 20°C . Cercles en pointillés = emplacement des sphéroïdes (non simulés dans le modèle).

Ainsi l'élévation de température est bien liée aux paramètres d'EPN d'une part (intensité et durée), et aux propriétés du milieu dans lequel est réalisée l'EPN, notamment sa conductivité. Si l'on calcule l'élévation de température pour un champ correspondant à $300 V_{pp}$ appliqués, soit $900 V_{RMS}/\text{cm}$ en prenant en compte les 15% de chute de tension (voir partie 3.3.2), une durée de 5 ms et un volume de milieu de 200 mm^3 , on obtient une valeur de 0.3°C pour un milieu de conductivité 0.03 S/m et de 12.6°C pour un milieu de conductivité 1.3 S/m . Ce calcul permet de retrouver la tendance obtenue à l'aide de la simulation, même si l'échauffement semble surestimé avec cette approximation (voir tableau 3.2).

		Conductivité de la solution d'EPN	
		0.03 S/m	1.3 S/m
Élévation de température	Simulation	0.4°C	5°C
	Calcul	0.3°C	12.6°C

TABLE 3.2 – Comparaison de l'élévation de température pendant l'EPN par le calcul et par la simulation.

Ces résultats permettent donc de justifier l'intérêt du changement de milieu effectué avant l'EPN des sphéroïdes, qui est caractérisé dans la section suivante (3.3.4), puisqu'il permet de réduire considérablement l'échauffement induit par effet Joule, et ainsi d'éviter que les effets observés soient dus à la température et non au seul champ électrique.

3.3.4 Caractérisation du changement de milieu dans la chambre microfluidique

La présence d'un hydrogel sur la moitié de la hauteur de la chambre fluidique modifie le flux du fluide injecté et la diffusion des ions et petites molécules dans la chambre. Pour permettre de se rendre compte de cela, des simulations ont été réalisées sur COMSOL.

Un modèle simplifié de l'hydrogel de 0.5 mm de hauteur a été réalisé, comportant des puits de 0.2 mm de diamètre et 0.25 mm de profondeur. Il est placé dans un bloc de 1 mm de hauteur représentant la chambre. La chambre et l'intérieur des puits sont modélisés par de l'eau (fluide newtonien) et l'hydrogel est modélisé comme un matériau poreux de perméabilité hydraulique $3.7 \times 10^{-16} \text{ m}^2$ et de porosité 0.9805 [Pluen et al., 1999]. Le module "Écoulement en milieu libre et poreux" est utilisé pour simuler un flux de vitesse 0.5 mm/s, correspondant à un débit de 0.3 mL/min dans la chambre de section d'entrée (dans un plan vertical) de 10 mm^2 , qui est le débit utilisé pour injecter le milieu EPN par la suite. La vitesse du flux et la pression initiale sont nulles, et des conditions de non-glissement sont imposées sur tous les bords du domaine à l'exception des surfaces d'entrée et de sortie du flux. On réalise une étude stationnaire et on trace le profil de vitesse du flux pour une coupe longitudinale au milieu de la chambre passant par le centre des puits (figure 3.7). Les résultats de cette simulation mettent en avant le fait que le flux est contraint de s'écouler au-dessus de l'hydrogel, ce qui augmente localement sa vitesse dans cette zone, par rapport à la vitesse du fluide injecté. En revanche, la vitesse dans les puits est très faible, ce qui permet de ne pas perturber les sphéroïdes lors de l'injection de fluide dans la chambre, en ne les soumettant pas à une force de cisaillement trop élevée.

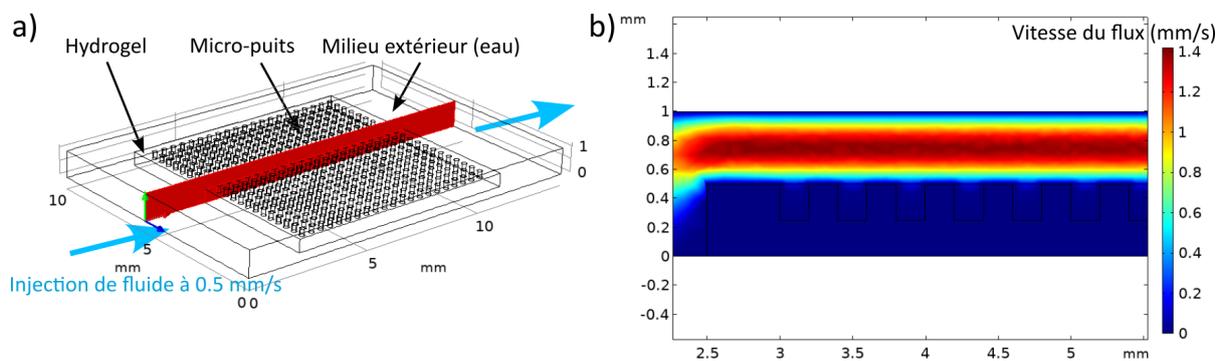


FIGURE 3.7 – (a) Géométrie du modèle COMSOL de la chambre fluidique composée de l'hydrogel micro-structuré. (b) Vitesse du flux (mm/s) dans une coupe longitudinale au milieu de la chambre.

Pour s'intéresser à la diffusion des molécules dans l'hydrogel, une autre modélisation a été réalisée. Pour des raisons de temps de calcul, les micropuits n'ont pas été simulés, l'hydrogel a uniquement été représenté par un bloc, dont on a fait varier la hauteur pour étudier son impact sur la diffusion. Les propriétés des matériaux, la vitesse du flux, les conditions initiales et aux limites restent les mêmes. On utilise cependant le module "Équations de Brinkman", qui permet de modéliser la vitesse d'un fluide en milieu poreux en régime laminaire, et le module "Transport d'espèces diluées en milieu poreux" pour étudier le transport par diffusion de manière isotropique d'une solution diluée dans l'eau.

Le bloc d'hydrogel d'agarose 2% poreux modélisé a les mêmes propriétés que dans les précédentes modélisations [Pluen et al., 1999]. On prend une concentration d'espèce diluée de 0.05 mol/m^3 et un coefficient de diffusion dans l'eau de $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, ce qui correspond à une solution fluorescente de FITC (isothiocyanate de fluorescéine ou "Fluorescein IsoThioCyanate" en anglais) à 0.05 mM , dont la diffusion est étudiée expérimentalement par méthode optique dans la suite de cette partie. On réalise une étude temporelle entre 0 et 10 min après le début de l'injection, par pas de 5 min. On trace l'évolution de la concentration le long d'une droite verticale traversant la chambre et l'hydrogel dans toute leur hauteur, au centre de l'hydrogel (figure 3.8). Les résultats de la simulation montrent qu'il faut du temps pour que l'espèce diffuse à l'intérieur de l'hydrogel, et que ce temps est d'autant plus élevé que l'épaisseur de l'hydrogel est grande (figure 3.8,b-e).

Dans la réalité, les sphéroïdes sont situés dans des micropuits qui structurent l'hydrogel. Ils sont donc bien recouverts de milieu et baignent dans un milieu adéquat. Cependant, cette simulation souligne l'importance de l'étude du changement de milieu, afin d'assurer la reproductibilité des conditions d'EPN, et en particulier de la conductivité à l'intérieur de la chambre microfluidique contenant les sphéroïdes. En effet, comme cela a été vu précédemment, il est nécessaire de changer le milieu pour diminuer sa conductivité avant de réaliser des tests d'EPN sur les sphéroïdes. L'échange de milieu a donc été caractérisé expérimentalement en utilisant deux méthodes : suivi d'impédance et microscopie.

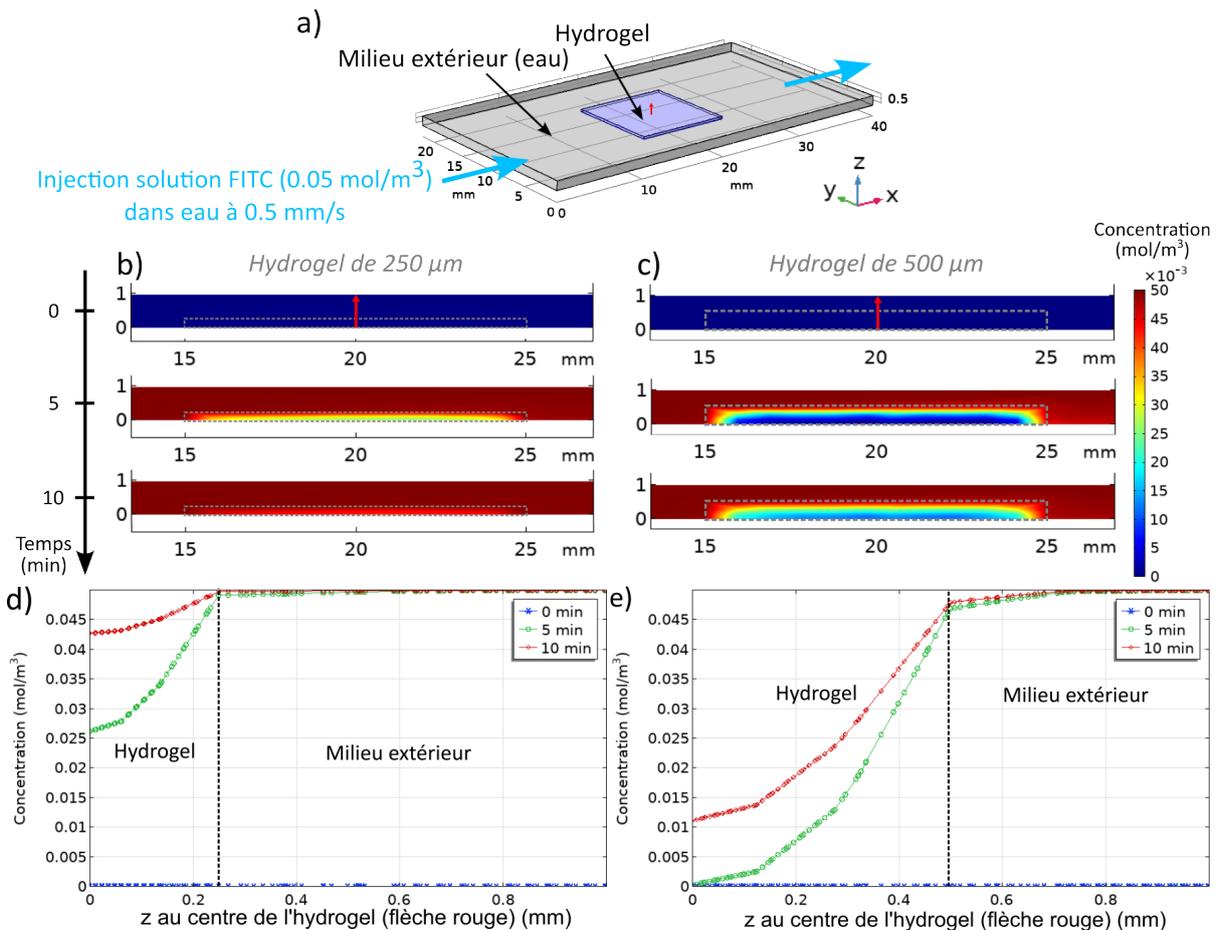


FIGURE 3.8 – (a) Géométrie du modèle COMSOL de la chambre fluidique contenant l'hydrogel. (b-c) Profils de concentration dans un plan transversal xz passant par le milieu de l'hydrogel de hauteur $250 \mu\text{m}$ (b) ou $500 \mu\text{m}$ (c) pour 0, 5 et 10 min après injection. (d-e) Évolution de la concentration de l'espèce diluée injectée sur une droite verticale au centre de la chambre (flèche rouge) pour un hydrogel de $250 \mu\text{m}$ de hauteur (d) ou de $500 \mu\text{m}$ de hauteur (e).

L'impédance étant reliée à la conductivité de la solution dans laquelle sont réalisées les mesures, un suivi a été réalisé au cours de l'injection de milieu d'électroporation dans une chambre contenant un hydrogel saturé en milieu de culture. L'hydrogel, sans sphéroïdes, a d'abord été incubé 24h dans le milieu de culture. Il a ensuite été monté dans le dispositif et le tampon EPN a été injecté à l'aide d'une seringue de 2.5 mL et d'une aiguille 21G par volume de 0.5 mL toutes les 1.5 min. Des mesures d'impédance ont été effectuées après chaque injection pour suivre l'évolution de la conductivité globale à l'intérieur de la chambre, reflétant notamment la diffusion des ions et des molécules dans l'hydrogel.

Les résultats présentés dans la figure 3.9,a montrent que l'échange de milieu à l'intérieur de la chambre toute entière, y compris l'hydrogel, est facile et rapide. En effet, l'injection de 2.5 mL de milieu, par ajout de 0.5 mL toutes les 1.5 min, permet de remplacer tout le milieu de culture par du milieu d'électroporation en 10 min puisque l'impédance mesurée, donc la conductivité, se stabilise. Le microsystème permet donc un échange de milieu avec un faible débit et sans manipulation qui pourrait endommager les sphéroïdes.

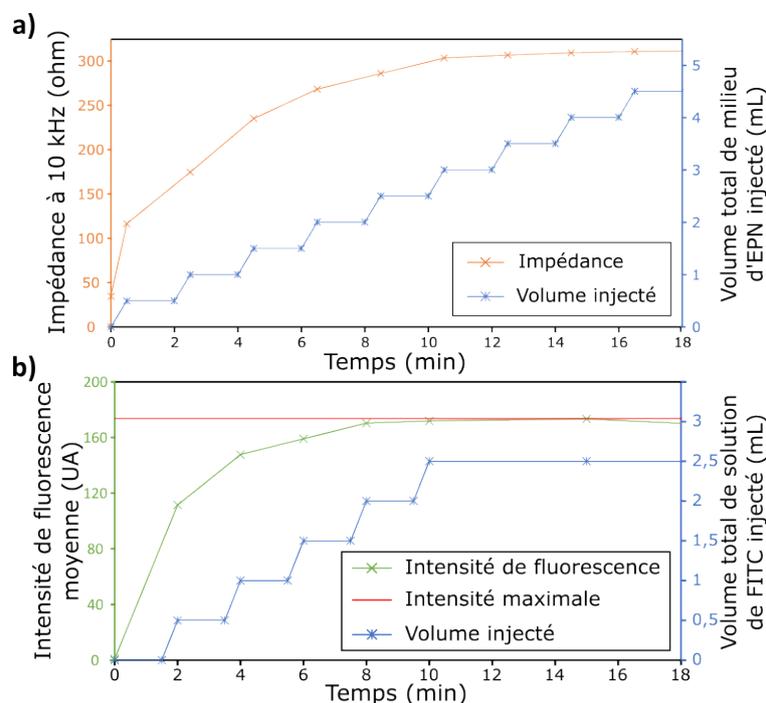


FIGURE 3.9 – (a) Évolution du module de l'impédance à 10 kHz dans le dispositif contenant un l'hydrogel saturé en milieu de culture lors de l'injection de milieu d'EPN. Ligne orange = module de l'impédance à 10 kHz, Ligne bleue = volume injecté. (b) Intensité moyenne de fluorescence verte (FITC) sur toute l'épaisseur de l'hydrogel, mesurée in situ au microscope confocal ($\times 25$, NA = 0.95) pendant l'injection de la solution de FITC dans le dispositif contenant un hydrogel saturé en PBS. Ligne rouge = intensité moyenne mesurée sur un hydrogel saturé 24h dans une solution de FITC, Ligne verte = intensité de fluorescence de la FITC, Ligne bleue = volume injecté.

Pour confirmer la cinétique d'échange du milieu à l'intérieur de la chambre microfluidique trouvée avec les mesures d'impédance, une autre expérience a été réalisée avec une technique optique (microscopie confocale) pour suivre la diffusion d'une solution fluorescente à base de FITC à l'intérieur de l'hydrogel. Pour cela, un hydrogel d'agarose micro-structuré a été moulé sur une lamelle pour permettre une observation directe avec un objectif $\times 25$ (ouverture numérique ou NA = 0.95) au microscope confocal (Leica SP5). Il a été incubé dans du PBS avant d'être monté dans le microsystème. Une solution de FITC (isothiocyanate de fluorescéine) à 0.05 mM dans du PBS a été injectée dans la chambre microfluidique à l'aide d'une seringue de

2.5 mL et d'une aiguille 21G par volume de 0.5 mL avant l'acquisition d'un z-stack pour imager toute l'épaisseur de l'hydrogel ($z = 20 \mu\text{m}$, 1.5 min/stack). Une acquisition supplémentaire a été réalisée après 5 min sans injection pour déterminer si la fluorescence avait atteint une valeur constante. La fluorescence a ensuite été mesurée sur les z-stack avec le logiciel ImageJ en définissant une région d'intérêt (ROI) sur la zone de l'image correspondant à l'hydrogel.

La fluorescence moyenne sur toute l'épaisseur de l'hydrogel imagé est représentée dans la figure 3.9,b. Elle est comparée à l'intensité maximale mesurée sur un hydrogel incubé 24h dans la même solution de FITC, donc saturé en solution de FITC. Les résultats montrent une diffusion complète du milieu à l'intérieur de l'hydrogel en 10 min pour 2.5 mL injectés, ce qui est comparable à ce qui a été observé avec les mesures d'impédance.

En appliquant le protocole d'injection ainsi déterminé, la conductivité à l'intérieur de la chambre sera donc reproductible pour toutes les expériences réalisées dans des conditions comparables.

3.4 Preuve de concept de l'efficacité d'électroporation

Le microsystème étant caractérisé, tant au niveau de la répartition du champ électrique qu'au niveau du changement de milieu dans la chambre microfluidique, il est désormais possible de faire des essais d'électroporation sur des sphéroïdes, afin de réaliser une preuve de concept de sa fonctionnalité en tant que plateforme de test *in vitro* de l'électrochimiothérapie.

3.4.1 Détermination des paramètres d'électroporation par méthode de fluorescence

Dans un premier temps, il s'agit de tester différents paramètres d'électroporation et d'étudier par une méthode de fluorescence la réponse des sphéroïdes. Le choix du type d'impulsion utilisé s'est porté sur les impulsions sinusoïdales. La pertinence de cette forme d'onde pour l'administration de petites molécules dans les cellules a récemment été soulignée [García-Sánchez et al., 2018], car son contenu spectral simple peut aider à mieux comprendre le phénomène d'EPN. De plus, l'application de signaux bipolaires permet de réduire les réactions électrochimiques susceptibles d'endommager les électrodes utilisées. En effet, ces dernières sont fragiles car elles ne sont composées que d'une fine couche de matériau conducteur (120-160 nm) [Mahnič-Kalamiza et al., 2020] (voir partie 1.5.4).

Les paramètres du champ électrique pour une EPN efficace dans le microsystème ont été déterminés en faisant varier uniquement l'amplitude des salves sinusoïdales appliquées, les autres paramètres ont été fixés. La durée, le nombre de salves et la fréquence de répétition des impulsions, respectivement 5 ms et 2 salves espacées de 1 s, ont été choisis en se basant sur les données de la littérature [García-Sánchez et al., 2018] et sont restés inchangés pour toutes les expériences. En effet, ces paramètres influencent principalement la concentration des pores formés à la surface de la membrane [M.-P. Rols et al., 1998]. La durée des impulsions peut également influencer l'efficacité pour certaines molécules cibles, telles que les plasmides d'ADN, puisque d'autres phénomènes tels que l'électrophorèse sont nécessaires pour aider ces molécules volumineuses et chargées à se déplacer vers les cellules [Golzio et al., 2002]. Cependant, ici, seules des petites molécules sont utilisées (IP : 668.4 g/mol, bléomycine : 1415 g/mol en comparaison avec des plasmides par exemple qui ont un poids moléculaire de plusieurs dizaines de milliers de g/mol), donc l'amplitude sera le seul paramètre qui variera pour déterminer le seuil d'EPN permettant de délivrer de telles molécules dans les cellules HT29 étudiées.

Deux impulsions sinusoïdales de fréquence 10 kHz et de durée 5 ms, espacées de 1 s (fré-

quence de répétition de 1 Hz), sont appliquées. En ce qui concerne la fréquence, elle est choisie pour correspondre à une valeur pour laquelle le champ dans la chambre et la sensibilité des cellules à ce champ sont maximaux, soit 10 kHz, comme cela a été démontré dans la partie 3.3.2. Les amplitudes testées vont de 100 à 300 V_{pp} , ce qui permet de balayer une gamme de champ électrique adaptée aux valeurs utilisées dans la littérature, soit entre 300 et 900 V_{RMS}/cm [Chopin et al., 2012, García-Sánchez et al., 2018]. Il faut noter que les pertes électriques ne sont pas souvent prises en compte dans la littérature, et les valeurs de champ électrique données sont généralement celles appliquées, plutôt que celles effectivement perçues par les sphéroïdes. La comparaison entre les différentes études est donc compliquée, car les pertes électriques peuvent ne pas être du même ordre de grandeur pour tous les microsystèmes ou dispositifs d'EPN utilisés.

De plus, comme cela a été souligné par les experts du domaine de l'EPN dans le "Handbook of electroporation" [Reberšek, 2017], il est important de vérifier lors de chaque expérience que la tension a bien été appliquée lorsque l'on reporte des études d'EPN in vitro. La tension appliquée est ainsi mesurée et visualisée sur l'oscilloscope en le reliant à la sortie "monitor" de l'amplificateur, et le capteur de courant permet de mesurer et de visualiser le courant de sortie sur l'autre voie (figure 3.10,a). Lors des expériences, pour chacune des deux salves d'impulsions sinusoïdales, l'amplitude de la tension appliquée et du courant de sortie ont été mesurées. La figure 3.10,b montre que la tension mesurée est bien celle qui est appliquée (100 à 300 V_{pp} par pas de 50 V_{pp}), avec un faible écart-type. Pour le courant mesuré, il faut appliquer un facteur 1.4 (rapport courant/tension du capteur) pour obtenir la valeur en A. La figure 3.10,b montre que le courant mesuré se situe entre 0.6 et 1.6 A_{pp} , soit une amplitude de 0.3 à 0.8 A. La relation entre la tension et le courant est bien linéaire, ce qui est cohérent avec le fait que la fréquence à laquelle est appliquée la tension se situe sur le plateau résistif. Si les potentiels appliqués étaient plus faibles (quelques mV) ou si l'on se situait à une fréquence plus basse (Hz), on s'attendrait à une relation non-linéaire car la cinétique électrochimique et la vitesse de diffusion des ions de la double couche à l'interface électrode-électrolyte joueraient un rôle plus important [Mahnič-Kalamiza et al., 2020].

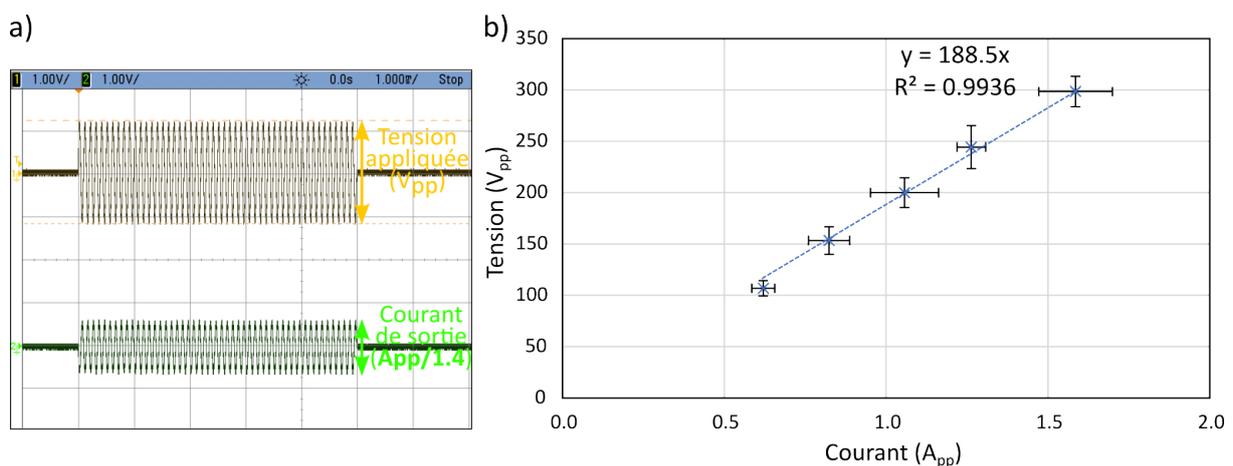


FIGURE 3.10 – (a) Capture d'écran d'un exemple de résultat obtenu sur l'oscilloscope. (b) Tension appliquée en fonction du courant de sortie, mesurés sur l'oscilloscope pour chaque salve d'impulsions sinusoïdales appliquée, lors d'expériences d'EPN de sphéroïdes. Moyenne et écart-type sur 3 à 5 expériences/condition.

Ainsi lors de chaque expérience, on peut vérifier avec cette mesure de courant l'absence de problème lors de l'application de la tension, pouvant être liée à un mauvais contact sur les électrodes ou un mauvais changement de milieu par exemple, qui pourrait biaiser les résultats obtenus.

3.4.1.1 Protocole de la quantification de l'efficacité d'EPN par fluorescence

Pour déterminer l'efficacité de l'EPN et évaluer la viabilité des cellules, deux fluorophores sont utilisés : le diacétate de fluorescéine (FDA, Merck) pour marquer les cellules vivantes en vert, et l'iodure de propidium (IP, Merck), pour marquer les cellules mortes ou électroporées en rouge. En effet, cette molécule est un marqueur de la perte de l'intégrité membranaire des cellules, ce qui se produit pour des cellules électroporées ou mortes [Gibot, M.-P. Rols, 2013, Zhu et al., 2019]. Cependant, l'intensité de fluorescence est plus faible quand les cellules sont électroporées de manière réversible que quand elles sont mortes, comme on peut le voir dans l'annexe D. Ainsi, lorsque les cellules sont électroporées en présence de FDA et d'IP, celles qui affichent à la fois une fluorescence verte et rouge peuvent être considérées comme vivantes et électroporées. Par conséquent, en superposant les canaux de fluorescence rouge et vert, les cellules apparaissant en jaune peuvent être considérées comme électroporées de manière réversible.

Étude sur un grand nombre de sphéroïdes L'IP et la FDA sont ajoutés au tampon EPN, avec des proportions respectives de 30 μM et 12 μM , avant d'injecter cette solution à l'intérieur de la chambre microfluidique selon le protocole décrit dans la partie 3.3.4. Le champ électrique pulsé est ensuite appliqué avec les paramètres choisis (2 salves sinusoïdales, 10 kHz, 5 ms). Des amplitudes assez faibles sont testées dans un premier temps (100 à 200 V_{pp} soit 300 à 600 V_{RMS}/cm). Les sphéroïdes sont observés 5 min après l'EPN avec un microscope à épifluorescence (AxioImager M1, Zeiss) sur 5 plans focaux situés dans le volume des sphéroïdes. Une projection d'intensité maximale (MIP) est réalisée avec le logiciel ImageJ et l'intensité moyenne de la fluorescence rouge est évaluée pour environ 12 sphéroïdes par condition testée, afin de comparer l'efficacité d'EPN des 3 conditions testées. La démarche d'analyse est détaillée dans l'annexe E, et le test statistique utilisé pour calculer la valeur-p associée à ce test ("p-value" en anglais pour "probability-value") est donné dans l'annexe F.

Étude de l'efficacité d'EPN au cœur des sphéroïdes Pour caractériser plus précisément l'efficacité de l'électroporation à l'intérieur des sphéroïdes, et tester des tensions plus élevées, des observations avec un microscope confocal à fort grossissement ($\times 25$ à immersion dans l'eau, $\text{NA} = 0.95$) sont réalisées sur des échantillons fixés. Après leur EPN (2 salves sinusoïdales, 10 kHz, 5 ms, 100 à 300 V_{pp}) dans le microsystème, les sphéroïdes sont incubés 15 min dans du milieu de culture cellulaire pour permettre aux membranes de se refermer. Ils sont ensuite fixés avec du paraformaldéhyde à 4% (PFA, Merck) dans du PBS pendant 20 min, avec trois rinçages de 5 min au PBS avant et après la fixation. Un contrôle négatif avec des sphéroïdes morts, incubés 30 min dans de l'éthanol à 70%, est également étudié. Comme cela a été présenté dans la partie 2.1.1.2 et pour pallier les limites des techniques de sectionnement optique comme la microscopie confocale, une clarification des sphéroïdes est réalisée afin d'uniformiser les indices de réfraction dans les échantillons. Pour cela, une solution de glycérol 80/20 dans du PBS est utilisée comme décrit précédemment [Goodarzi et al., 2021, Ahmad et al., 2021].

La microscopie confocale permet l'acquisition d'images dans la direction z avec un pas de 2 μm . Les images sont analysées avec une routine Matlab développée à l'ILM [Goodarzi, 2021]. Les sphéroïdes sont segmentés à chaque position z grâce à la fluorescence rouge de l'IP et chaque tranche de sphéroïde est modélisée par un cercle parfait. Dans la sphère parfaite obtenue en combinant toutes les tranches z , un changement de coordonnées cartésiennes à sphériques est effectué, afin d'obtenir la distance de chaque point au centre du sphéroïde. Cette distance est ensuite normalisée pour chaque sphéroïde par rapport au diamètre du sphéroïde, pour obtenir la distance normalisée d entre la périphérie ($d = 0$) et le cœur ($d = 1$) de chaque sphéroïde. Cela permet d'évaluer l'intensité moyenne de fluorescence rouge de la périphérie des sphéroïdes

vers leur cœur, et donc de déterminer l'efficacité de l'EPN à l'intérieur des sphéroïdes pour les différentes tensions testées. Cette intensité est également normalisée par rapport à l'intensité de la périphérie ($d = 0$) pour 300 V_{pp} appliqués, car elle correspond au champ électrique le plus élevé appliqué. L'intensité maximale de fluorescence rouge sur l'ensemble du sphéroïde est également déterminée, permettant de comparer les niveaux de fluorescence entre les cellules mortes et les cellules électroporées. Un contrôle "mort" (sphéroïde de cellules mortes) est également réalisé pour démontrer que la technique de clarification utilisée (l'ajout de glycérol) est efficace pour permettre l'observation à l'intérieur de ces sphéroïdes de $116 \pm 23 \mu\text{m}$ de diamètre. La démarche d'analyse est détaillée dans l'annexe G.

Étude de la mortalité induite par les protocoles d'EPN testés au bout de 2h Enfin, pour évaluer la mortalité à 2h en fonction de la tension d'EPN appliquée, les sphéroïdes sont électroporés à 200 ou 300 V_{pp} dans le tampon EPN, puis incubés pendant 2h dans du milieu de culture. Ils sont ensuite marqués avec de la FDA et de l'IP (respectivement 12 μM et 30 μM dans du PBS) pour caractériser la viabilité des cellules par observation en microscopie confocale. Le même fluorophore (IP) est donc utilisé pour les deux tests (efficacité de l'EPN et viabilité cellulaire), comme souvent rapporté dans la littérature [Xu et al., 2011, Gibot, M.-P. Rols, 2013, Zhu et al., 2019]. Une comparaison de l'intensité de fluorescence rouge mesurée sur des sphéroïdes morts et des sphéroïdes électroporés a été réalisée pour illustrer cette double utilisation de l'IP, montrant une intensité significativement plus élevée pour les sphéroïdes de cellules mortes en comparaison avec les sphéroïdes électroporés (annexe D).

3.4.1.2 Résultats expérimentaux

Étude sur un grand nombre de sphéroïdes Dans un premier temps, plusieurs paramètres d'EPN sont testés sur des sphéroïdes et des observations globales sont réalisées au microscope à épifluorescence. Les résultats présentés dans la figure 3.11,a permettent de déterminer un premier seuil d'électroporation de 200 V_{pp} pour notre expérience, car pour 100 et 150 V_{pp} , l'intensité de fluorescence est de niveau similaire et significativement plus faible.

Cela peut également être visualisé qualitativement sur la figure 3.11,b, sur laquelle les sphéroïdes apparaissent en jaune (c'est-à-dire la superposition des canaux de fluorescence des cellules vivantes et électroporées) uniquement pour 200 V_{pp} appliqués. Les images microscopiques, prises au grossissement minimal et ne représentant qu'un huitième de la chambre entière, illustrent tout de même le fait que le microsystème développé ici permet l'observation de dizaines de sphéroïdes simultanément. En effet, il est possible de réaliser l'EPN en une seule fois sur un grand nombre de sphéroïdes sans aucune étape de manipulation. Ainsi, ce microsystème permet de réduire le temps d'une expérience d'EPN par rapport aux autres dispositifs existants utilisés dans la littérature [Fiorentzis, Viestenz, Seitz et al., 2020, Gibot, Montigny et al., 2020], pour lesquels les sphéroïdes sont souvent cultivés dans des plaques multi-puits, nécessitant de répéter chaque étape pour chaque sphéroïde traité (voir partie 1.4.4). Contrairement à ces plaques multi-puits, ici les étapes d'échange de milieu et la procédure d'EPN ne perturbent pas les sphéroïdes grâce à l'hydrogel micro-structuré et au système microfluidique. En outre, le microsystème rend possible l'imagerie in situ avec une technique optique simple, l'épifluorescence, ce qui a permis de calibrer les paramètres d'EPN rapidement et facilement.

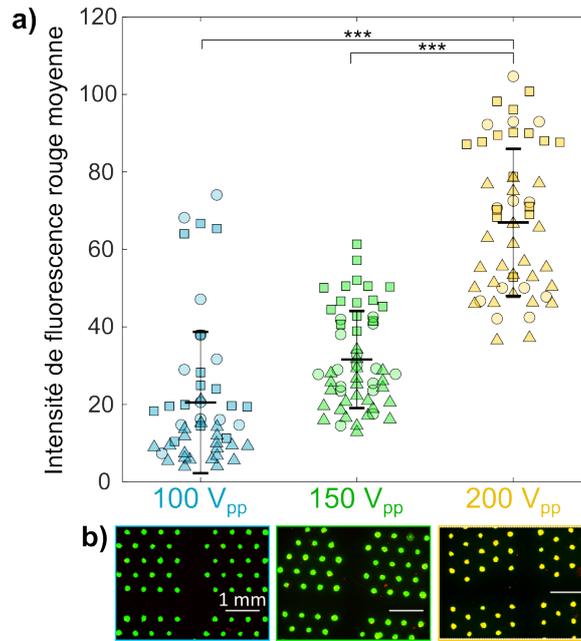


FIGURE 3.11 – Détermination du seuil de l'EPN par microscopie à épifluorescence. (a) Intensité moyenne de la fluorescence rouge de chaque sphéroïde sur des images d'épifluorescence ($\times 10$, MIP) réalisées sur des sphéroïdes de cellules HT29 5 min après EPN en présence de FDA et d'IP. Point/Carré/Triangle = valeur pour un sphéroïde imagé, Longue ligne horizontale = moyenne, Petite ligne horizontale = déviation standard, $N = [12 \text{ à } 24]$ sphéroïdes/expérience, *** $p < 0.001$, triplicata (les points, carrés et triangles correspondent aux résultats de 3 expériences différentes). (b) Images d'épifluorescence (canaux vert et rouge superposés, $\times 2.5$, MIP) de ces sphéroïdes. Vert = FDA, Rouge = IP, Jaune = les deux, Barre d'échelle = 1 mm.

Étude de l'efficacité d'EPN au cœur des sphéroïdes Afin d'avoir une meilleure idée de l'efficacité d'EPN jusqu'au centre des sphéroïdes pour les différents paramètres testés précédemment, et également de regarder l'effet de tensions plus élevées, une étude des sphéroïdes électroporés est réalisée par microscopie confocale à fort grossissement. Ces mesures (figure 3.12,a et b), normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence rouge (cellules électroporées) en périphérie pour la tension maximale ($300 V_{pp}$), montrent que l'EPN est plus efficace pour la plus grande tension testée, à savoir $300 V_{pp}$ (correspondant à $900 V_{RMS}/cm$). Pour $250 V_{pp}$ ($750 V_{RMS}/cm$) et $200 V_{pp}$ ($600 V_{RMS}/cm$), l'EPN est respectivement 25% et 45% moins efficace jusqu'à 40% à l'intérieur des sphéroïdes (à partir de $d = 0.4$).

Si l'on se concentre sur l'efficacité de l'EPN à l'intérieur des sphéroïdes (figure 3.12,b), on observe une diminution de l'intensité normalisée de 20 à 30% de la périphérie vers le cœur pour 250 et $300 V_{pp}$, et de plus de 40% pour $200 V_{pp}$. Pour les deux plus fortes amplitudes appliquées, l'intensité au cœur du sphéroïde reste supérieure à 50% de l'intensité maximale mesurée, montrant une bonne efficacité de l'EPN pour l'ensemble du volume. Cependant, pour $200 V_{pp}$, les cellules situées dans le cœur des sphéroïdes ne sont presque pas électroporées, puisque le niveau d'intensité diminue jusqu'à une valeur proche de celle du bruit.

La figure 3.12,b montre également que pour les tensions inférieures au seuil déterminé, à savoir 100 et $150 V_{pp}$, les résultats sont cohérents avec ceux obtenus par microscopie à épifluorescence (figure 3.11), puisque l'intensité moyenne mesurée est inférieure de 60 à 75% à celle mesurée pour une tension de $300 V_{pp}$. On peut noter que la différence entre les intensités de la périphérie et du cœur pour 100 et $150 V_{pp}$ est moins visible que pour $200 V_{pp}$, mais cela est dû au fait que l'intensité mesurée pour ces faibles tensions est si faible (proche du niveau de bruit) qu'il n'est pas possible de déterminer si les cellules du cœur des sphéroïdes sont moins électroporées que celles de la périphérie.

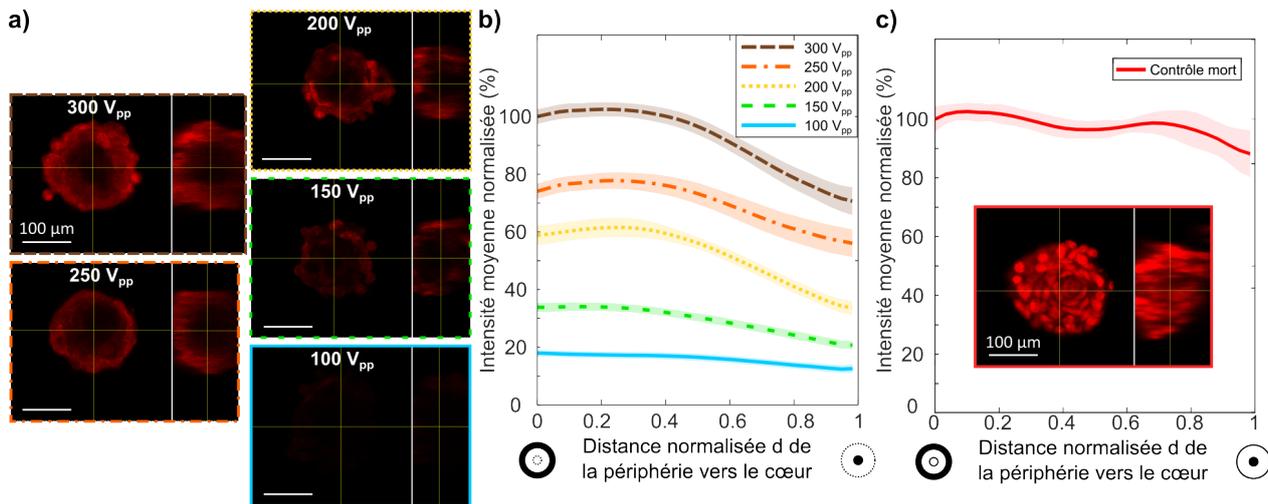


FIGURE 3.12 – Étude de l'efficacité de l'EPN à l'intérieur des sphéroïdes par microscopie confocale. (a) Images typiques d'un z-stack ($\times 25$) obtenu au microscope confocal pour une tranche dans le cœur des sphéroïdes de cellules HT29 et vue orthogonale correspondante. Rouge = IP, Barre d'échelle = 100 μm . (b) Intensité moyenne des sphéroïdes électroporés avec IP (rouge) en fonction de la distance entre la périphérie et le cœur du sphéroïde ($116 \pm 23 \mu\text{m}$ de diamètre), normalisée par l'intensité moyenne en périphérie ($d = 0$) des sphéroïdes électroporés à 300 V_{pp} , et par le rayon maximal de chaque sphéroïde. Zone ombrée = valeurs SEM, $N = 20$ sphéroïdes/condition, duplicata. (c) Image d'un z-stack ($\times 25$) pour le contrôle mort et intensité moyenne normalisée par rapport à l'intensité moyenne en périphérie obtenus pour les sphéroïdes de ce contrôle mort en fonction de la distance entre la périphérie et le cœur du sphéroïde. $N = 10$ sphéroïdes, une expérience.

Il est à noter que la méthode de clarification des sphéroïdes (ajout de glycérol) est bien efficace, comme cela avait déjà été montré précédemment par l'équipe Biophysique de l'ILM [Ahmad et al., 2021]. En effet, la figure 3.12,c montre que l'intensité moyenne normalisée pour le groupe contrôle mort reste constante de la périphérie vers le cœur des sphéroïdes, ce qui témoigne de la capacité d'observer la fluorescence à l'intérieur des sphéroïdes sans diminution due à une absorption des photons. Cela est notamment permis par la taille relativement petite des sphéroïdes étudiés (diamètre moyen de $116 \pm 23 \mu\text{m}$). On peut donc dire que lorsqu'on observe une chute de l'intensité au centre du sphéroïde, cela est bien dû à une EPN moins efficace. Cela pourrait être dû à une diminution de la taille des cellules dans le cœur des sphéroïdes [Han et al., 2020] et donc à une diminution de la sensibilité des cellules au champ électrique appliqué, puisque le potentiel transmembranaire induit dépend linéairement du rayon de la cellule [Schwan, 1957].

Étude de la mortalité à 2h induite par les protocoles d'EPN testés Pour évaluer la mortalité à 2h due aux conditions d'EPN appliquées, un test de viabilité a été réalisé sur des sphéroïdes électroporés, pour deux des tensions les plus élevées testées, à savoir 200 et 300 V_{pp} . Les résultats (figure 3.13) démontrent une très faible proportion de cellules rouges, de moins de 3%, due au champ électrique pulsé appliqué, assurant que les conditions d'EPN déterminées sont bien réversibles. Il faut toutefois noter que pour déterminer la mortalité globale induite par l'EPN, il faudrait faire un marquage de la viabilité au bout de 24 à 48h.

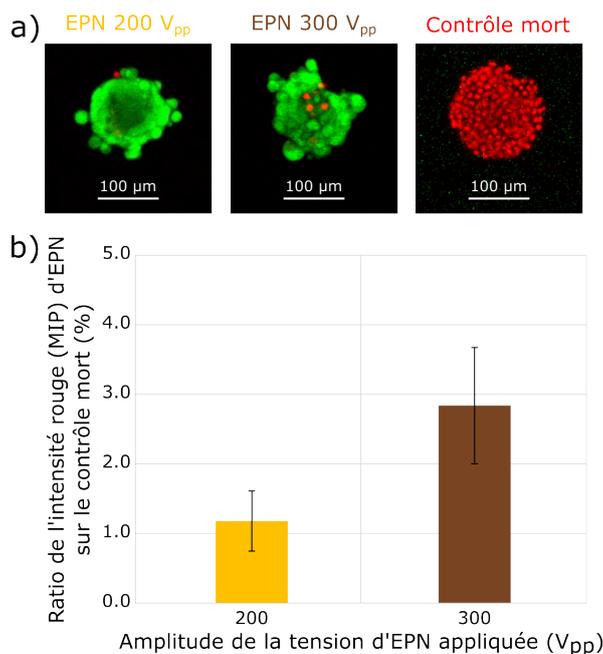


FIGURE 3.13 – (a) Image au microscope confocal ($\times 10$, $NA = 0.3$, MIP, canaux vert et rouge superposés) de sphéroïdes de cellules HT29 marqués avec FDA et IP 2h après EPN et contrôle mort (cellules tuées avec de l'éthanol 70%). Vert = FDA, Rouge = IP. (b) Intensité de fluorescence rouge moyenne (MIP) pour les deux tensions testées, normalisée par rapport à celle des sphéroïdes morts. Valeur moyenne \pm STD, $N = [4 \text{ à } 6]$ sphéroïdes/condition, une expérience.

Discussion Cette étude met en évidence le potentiel du dispositif pour caractériser l'efficacité d'électroporation jusque dans le cœur de dizaines de sphéroïdes en une seule expérience. Une telle analyse n'est pas souvent réalisée sur les sphéroïdes et pourrait être très utile pour mieux comprendre l'effet du champ électrique pulsé sur les constructions 3D, ou pour caractériser l'effet des traitements à base d'EPN à l'intérieur des sphéroïdes. Comme indiqué dans les quelques études précédentes disponibles dans la littérature [Wasungu et al., 2009, Gibot, M.-P. Rols, 2013], les résultats montrent que la perméabilisation est efficace de la périphérie jusqu'au cœur des sphéroïdes, avec une légère diminution au centre du sphéroïde.

Concernant les paramètres d'EPN, une tension de 200 ou 300 V_{pp} sera choisie comme tension appliquée pour les tests d'ECT, car une tension de 200 V_{pp} permet tout de même une EPN relativement efficace et une mortalité plus faible que 300 V_{pp} . Ces valeurs correspondent respectivement à un champ effectif de 600 ou 900 V_{RMS}/cm , soit 805 ou 1030 V_{RMS}/cm si l'on ne tient pas compte de la chute de tension, ce qui est proche des valeurs utilisées pour des études similaires de l'efficacité de l'EPN sur des sphéroïdes [Choi et al., 2009, Frandsen, Gibot et al., 2015, Fiorentzis, Viestenz, Siebolts et al., 2019, Gibot, Montigny et al., 2020].

3.4.2 Application à l'électrochimiothérapie

Après la démonstration de la capacité du microsystème à réaliser une EPN réversible sur des sphéroïdes, une première application en tant que plateforme de test de traitement anticancéreux *in vitro* est réalisée. La même procédure d'EPN est utilisée, à l'exception de l'ajout d'un anticancéreux dans le tampon EPN à la place des fluorophores. Un anticancéreux couramment utilisé, la bléomycine, est choisi pour étudier l'effet de l'électrochimiothérapie (ECT) sur les sphéroïdes de cellules HT29, pour permettre la comparaison avec une étude antérieure similaire [Frandsen, Gibot et al., 2015]. Cette molécule a la particularité de ne pénétrer que dans les cellules perméabilisées, et de s'intercaler dans l'ADN pour stopper la division cellulaire.

L'intensité appliquée pour les expériences présentées sur la figure 3.14 est de 200 V_{pp} ou

300 V_{pp} , afin de comparer une tension plus élevée, qui induit une perméabilisation plus efficace, avec une tension plus faible, qui induit moins de mortalité cellulaire (figure 3.13).

Le suivi de la croissance après cette expérience (figure 3.14,a et b) montre que les sphéroïdes soumis à l'électroporation seulement, ou à la bléomycine sans EPN, présentent le même taux de croissance que les sphéroïdes contrôles sans EPN ni bléomycine. À l'inverse, pour les sphéroïdes traités avec l'EPN en présence de bléomycine, une inhibition de la croissance est observée, comme le montre la courbe en rouge sur le graphique et les images microscopiques correspondantes (figure 3.14,a et b).

Grâce à l'hydrogel micro-structuré dans lequel sont cultivés les sphéroïdes, il est possible de réaliser un marquage de la prolifération de tous les sphéroïdes en une seule étape, avec un kit commercial révélant l'incorporation d'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) dans les cellules (voir protocole en annexe H). Cela réduit donc considérablement la durée de l'expérience, évitant de répéter toutes les étapes du protocole pour chaque puits contenant un sphéroïde, comme c'est le cas pour les plaques multi-puits à très faible adhérence. Les noyaux sont également colorés avec le marqueur NucGreen, afin de pouvoir voir toutes les cellules en microscopie confocale, et pas uniquement celles qui prolifèrent. La tension d'EPN pour cette expérience est de 200 V_{pp} et les observations sont faites trois jours après l'expérience. Elles montrent que la prolifération cellulaire, apparaissant en jaune en raison de la superposition du noyau (vert) et du marquage à l'EdU de la prolifération (rouge), est similaire pour tous les groupes de contrôle (c'est-à-dire sphéroïdes non traités, bléomycine seule et EPN seule). Quelques couches de cellules prolifératives sont visibles sur les vues orthogonales réalisées sur le logiciel ImageJ (figure 3.14,c). Cependant, pour les sphéroïdes traités par électrochimiothérapie (c'est-à-dire EPN en présence de bléomycine), il n'y a presque pas de cellules prolifératives et les noyaux des cellules semblent détériorés.

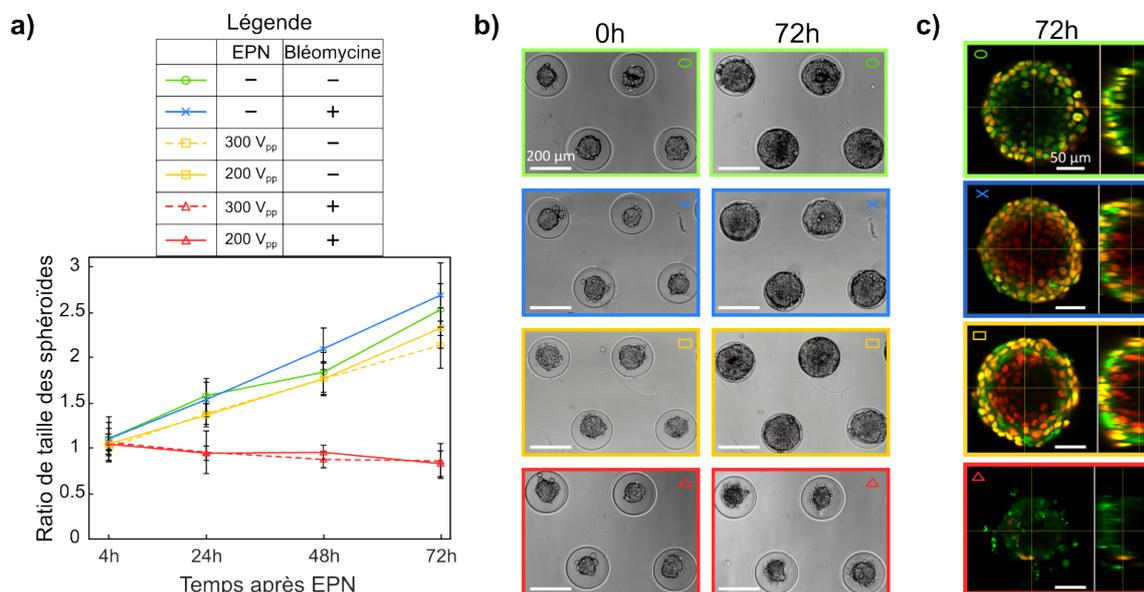


FIGURE 3.14 – Étude de l'effet d'un traitement par EPN avec de la bléomycine sur la croissance de sphéroïdes de cellules HT29 et la prolifération cellulaire. (a) Évolution du ratio de surface des sphéroïdes après expérience avec (+) et/ou sans (-) EPN et/ou bléomycine pour plusieurs conditions. Ligne pointillée = 300 V_{pp} , Ligne pleine = 200 V_{pp} , $N = [10 \text{ à } 15]$ sphéroïdes/expérience, en triplicata. (b) Images au microscope optique ($\times 4$) des sphéroïdes avant et 72h après l'expérience. Barre d'échelle = 200 μm . (c) Vues orthogonales d'images typiques de sphéroïdes au microscope confocal 72h après l'expérience, représentant les noyaux des cellules en vert et les cellules prolifératives en rouge. Vert = NucGreen, Rouge = EdU, Jaune = les deux, Barre d'échelle = 50 μm .

La prolifération est quantifiée à partir des images z-stack obtenues au microscope confocal. Grâce à une routine Matlab, le coefficient de corrélation de Pearson (PCC) entre EdU et NucGreen est calculé et tracé en fonction de la distance de la périphérie au cœur des sphéroïdes. Il évalue la colocalisation des deux canaux de fluorescence [Dunn et al., 2011] (voir annexe I). Dans ce cas, il permet de déterminer jusqu'à quelle profondeur à l'intérieur des sphéroïdes les cellules sont dans un état prolifératif ($PCC > 0.5$). Les résultats confirment ce qui est observé qualitativement dans la figure 3.15, à savoir que les 3 groupes de contrôle ont une proportion de couches prolifératives similaire : les cellules sont dans un état prolifératif jusqu'à environ 30% du diamètre du sphéroïde ($PCC > 0.5$), ce qui représente quelques couches prolifératives externes (1 à 3). Cela montre que l'EPN seule ou la bléomycine seule n'ont pas d'effet significatif sur la prolifération cellulaire. À l'inverse, pour les sphéroïdes traités avec l'EPN en présence de bléomycine, le coefficient de Pearson est réduit de plus de 70% dans les couches prolifératives de la périphérie, et reste inférieur à 0.2 pour tout le sphéroïde. Cela démontre l'effet attendu de la bléomycine sur les cellules électroporées : arrêt de la prolifération cellulaire dans l'ensemble du sphéroïde.

Ces résultats sont cohérents avec le caractère non perméable des cellules à la bléomycine, puisqu'on a bien observé une efficacité uniquement sur les cellules traitées par ECT. C'est une des raisons pour lesquelles cette molécule est particulièrement avantageuse pour les applications en ECT, car elle permet de réduire les effets secondaires de la chimiothérapie [Bloom et al., 2005, Geboers et al., 2020]. En effet, elle n'est pas toxique pour les cellules saines non perméabilisées autour de la tumeur, qui peuvent être en contact avec la bléomycine lors de son injection dans les tissus tumoraux. Par ailleurs, étant donné que cette dernière agit lors de la division des cellules, et que les cellules saines se divisent beaucoup plus lentement que les cellules tumorales, son effet est également limité sur la viabilité des cellules saines qui ont pu être électroporées autour de la tumeur.

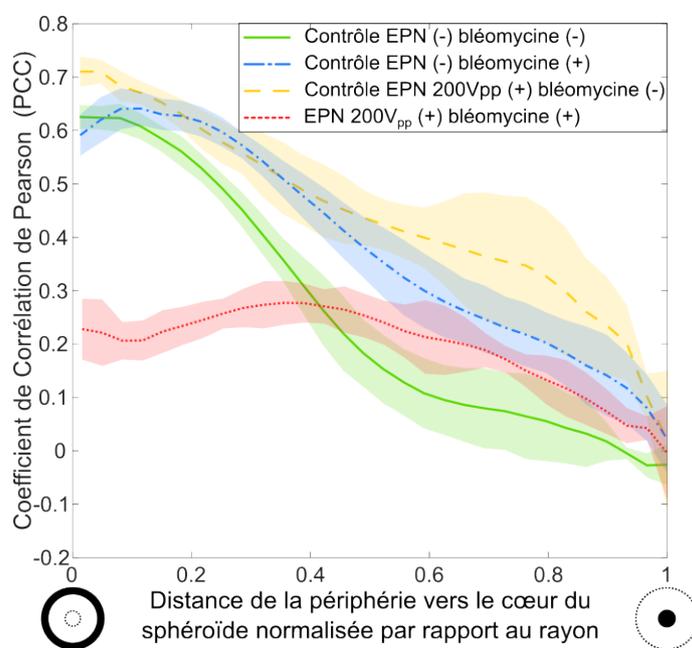


FIGURE 3.15 – Coefficient de corrélation de Pearson pour les sphéroïdes de cellules HT29 entre le marquage de la prolifération (EdU) et des noyaux (NucGreen) 3 jours après l'expérience avec (+) et/ou sans (-) EPN et/ou bléomycine, en fonction de la distance de la périphérie vers le cœur du sphéroïde. Zone ombrée = valeur SEM, $N = [7 \text{ à } 10]$ sphéroïdes/condition, une expérience.

Les résultats présentés sur la figure 3.14 confirment également la réversibilité des conditions

d'EPN utilisées ici, puisque l'électroporation n'a aucun impact sur la croissance et la prolifération des sphéroïdes électroporés sans ajout de bléomycine. Même si les deux tensions appliquées semblent avoir un effet différent sur la viabilité cellulaire (figure 3.13), elles induisent une évolution similaire de la croissance, comparable à celle des sphéroïdes non traités. Ces résultats sont cohérents avec la littérature [Gibot, M.-P. Rols, 2013, Frandsen, Gibot et al., 2015], montrant un effet d'inhibition de la croissance de l'anticancéreux uniquement pour les sphéroïdes traités par ECT.

On peut aussi remarquer que l'ECT a le même effet sur la croissance à trois jours après EPN pour les deux tensions d'EPN testées, bien qu'il ait été montré que l'EPN avec une tension de $300 V_{pp}$ était plus efficace (figure 3.12). Cela montre que même si une plus petite quantité de bléomycine pénètre dans les cellules, elle peut être suffisante pour arrêter leur division. De plus, même si nous avons utilisé une concentration de bléomycine de $14 \mu\text{M}$ pendant nos expériences, nous avons remarqué qu'une concentration bien plus faible de bléomycine résiduelle dans les capillaires du microsystème pouvait également inhiber la croissance des sphéroïdes trois jours après l'EPN, comme cela a déjà été montré dans la littérature [Jaroszeski et al., 2000]. Il est intéressant de noter que différentes concentrations de bléomycine ont été testées dans la littérature, de 1 mM [Gibot, M.-P. Rols, 2013], proche des concentrations utilisées in vivo, à $10 \mu\text{M}$ [Frandsen, Gissel et al., 2014], soit 100 fois moins. Ainsi, les concentrations de bléomycine utilisées in vitro rapportées dans la littérature pourraient être parfois trop élevées. Des études sont également en cours in vivo pour réduire les doses, ce qui permettrait de réduire la dose globale administrée dans le cas où plusieurs traitements consécutifs sont nécessaires, et pourrait permettre de limiter encore plus les éventuels effets secondaires de la bléomycine comme la fibrose pulmonaire [Bastrup et al., 2022].

Toutefois, si l'on s'intéresse à l'effet de la bléomycine sur les sphéroïdes à plus long terme, on peut remarquer que si la courbe de croissance est similaire pour les 3 premiers jours après ECT pour les deux tensions appliquées, ce n'est plus le cas à partir de 6 jours (figure 3.16). En effet, on constate une reprise de la croissance pour les sphéroïdes électroporés avec la tension la plus faible, mais pas pour ceux électroporés avec la tension la plus élevée. On peut aussi noter que l'écart-type devient plus grand au fil des jours. Cela est dû à l'incertitude sur la mesure de la taille des sphéroïdes qui grandit à cause de la présence de cellules mortes restantes dans les puits autour des sphéroïdes, empêchant de bien distinguer le contour des sphéroïdes.

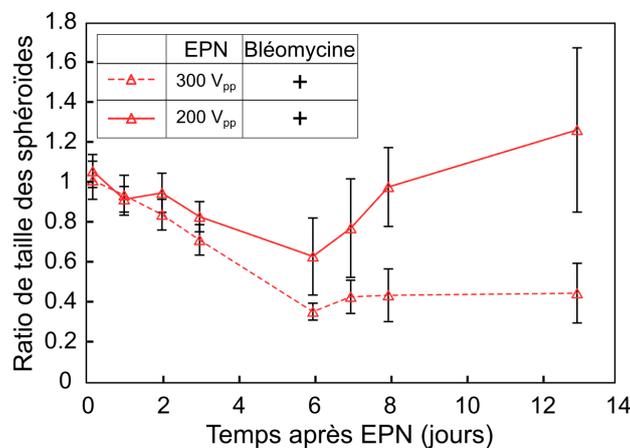


FIGURE 3.16 – Évolution du ratio de surface des sphéroïdes après expérience avec EPN et bléomycine (+) pour plusieurs conditions de tensions appliquées. Ligne pointillée = $300 V_{pp}$, Ligne pleine = $200 V_{pp}$, $N = 8$ sphéroïdes/condition, une expérience.

Ces résultats à long terme démontrent l'importance du choix des paramètres d'EPN pour

l'application à l'ECT. On les retrouve aussi *in vivo* avec par exemple la nécessité de faire plusieurs applications du traitement pour avoir une réponse complète, surtout pour des tumeurs volumineuses [Serŝa, 1998], la difficulté étant de tuer toutes les cellules cancéreuses, puisque même s'il en reste très peu, la tumeur est susceptible de repartir.

Conclusion

Le travail présenté dans ce chapitre montre que le microsysteme développé permet la culture, le suivi et l'EPN d'un grand nombre de sphéroïdes dans un systeme unique, et démontre son application comme plateforme de test de médicaments anticancéreux. En effet, l'hydrogel microstructuré intégré dans la chambre microfluidique permet la production de plusieurs centaines de sphéroïdes de taille et de forme similaires, et de localisation connue et reproductible, un atout important pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. Ces sphéroïdes imitent mieux les tissus tumoraux complexes que la culture cellulaire en 2D ou les cellules en suspension, ce qui permet de tester de manière pertinente les traitements basés sur l'EPN, comme l'électrochimiothérapie (ECT), qui peuvent améliorer les traitements contre le cancer.

Le microsysteme a été entièrement caractérisé, avec des mesures d'impédance et de la modélisation, montrant une distribution homogène du champ électrique. Elle garantit que tous les sphéroïdes sont soumis aux mêmes conditions d'EPN. Ces paramètres d'EPN ont pu être facilement déterminés grâce à l'observation *in situ* des sphéroïdes, avec plusieurs techniques allant de la simple microscopie optique à la microscopie épifluorescente et confocale, plus complexes, permettant d'évaluer l'efficacité de l'EPN même au cœur des sphéroïdes. Il a ensuite été montré que l'ECT des sphéroïdes ainsi produits avec les paramètres d'EPN déterminés était efficace et les résultats obtenus cohérents avec ceux décrits dans la littérature, obtenus avec d'autres systemes d'EPN.

Maintenant que l'efficacité du microsysteme a été démontrée sur une application classique d'ECT, nous allons nous intéresser à une application plus innovante dans le cadre du traitement du cancer par EPN : le cancer du pancréas. Pour cela, le modèle de sphéroïde va être complexifié, en ajoutant des fibroblastes, afin de mieux se rapprocher du micro-environnement tumoral qui existe *in vivo*, et qui est particulièrement important dans la chimiorésistance des tumeurs pancréatiques. D'autres anticancéreux seront également testés, comme la gemcitabine, utilisée classiquement en chimiothérapie pour le traitement de ce cancer.

CHAPITRE 4

EFFET DE LA COMPLEXIFICATION DE L'ENVIRONNEMENT TUMORAL SUR L'ÉLECTROCHIMIOTHÉRAPIE : LE CAS DU CANCER DU PANCRÉAS

Sommaire

4.1	Introduction : le cancer du pancréas	80
4.1.1	Méthodes de traitements existantes	80
4.1.2	Résistance au traitement et nouvelles voies thérapeutiques	81
4.1.3	Approche envisagée dans les travaux présentés	82
4.2	Mise au point d'un modèle de sphéroïde en co-culture	83
4.2.1	Protocole	83
4.2.2	Caractérisation des sphéroïdes produits	84
4.2.2.1	Répartition des fibroblastes au sein des sphéroïdes en co-culture	84
4.2.2.2	Environnement tumoral	85
4.2.2.3	Circularité	86
4.2.2.4	Prolifération	87
4.3	Application à l'électrochimiothérapie	88
4.3.1	Validation des paramètres d'électroporation à appliquer	88
4.3.2	Électrochimiothérapie : comparaison de la bléomycine avec la gemcitabine	91
4.3.3	Étude de l'impact du temps d'incubation de la gemcitabine sur son efficacité	93
4.3.4	Influence de l'environnement tumoral sur l'efficacité d'électroporation	95
	Conclusion	98

Ce chapitre présente une application concrète du microsystème : les travaux réalisés dans le cadre d'un projet InterCarnot (Impulse) à l'initiative d'un praticien de l'AP-HP, le professeur Frédéric Prat, spécialisé dans le traitement du cancer du pancréas, qui est à la recherche de méthodes physiques pour améliorer l'efficacité de ce traitement.

Après avoir présenté l'enjeu de la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer du pancréas, le développement et la caractérisation d'un modèle de sphéroïdes en co-culture de cellules cancéreuses et de fibroblastes sont présentés. Des tests d'EPN en présence d'anticancéreux sur des sphéroïdes monotypiques et en co-culture sont ensuite exposés, afin d'étudier l'impact de la présence de matrice extracellulaire (MEC) sur l'efficacité de ce traitement sur des sphéroïdes.

4.1 Introduction : le cancer du pancréas

Le cancer du pancréas est un des cancers ayant le pronostic le plus défavorable, avec un taux de survie à 5 ans de 10%. Il devrait même devenir la deuxième cause de mortalité lié à un cancer d'ici 2030 aux États-Unis [E. M. Anderson et al., 2021]. Une des particularités de ce cancer est son environnement tumoral (TME) complexe, composé principalement de fibroblastes activés (CAF ou "Cancer Associated Fibroblasts" en anglais), de cellules stellaires et de cellules inflammatoires, et d'une MEC dense. Ce TME favorise l'invasion et la croissance de la tumeur. Le faible taux de survie associé à ce cancer est en grande partie dû au diagnostic souvent tardif, à cause du manque de marqueurs permettant une détection plus précoce, et également de l'apparition tardive de symptômes identifiables. De plus, le pancréas est un organe profond difficile d'accès et à observer compte tenu de son emplacement très profond derrière l'estomac (figure 4.1). Le traitement du cancer du pancréas est un enjeu de santé publique majeur pour les prochaines décennies, mais d'importants efforts de recherche sont encore à fournir pour améliorer son efficacité.

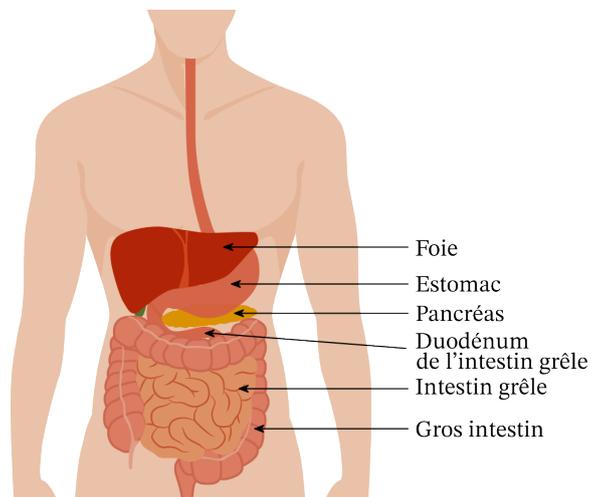


FIGURE 4.1 – Schéma indiquant la position du pancréas au sein du système digestif humain.
Source : www.nagwa.com

4.1.1 Méthodes de traitements existantes

Le choix de la méthode de traitement d'une tumeur pancréatique dépend de son stade au moment du diagnostic. Les stratégies employées majoritairement à ce jour sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Cependant, leur efficacité n'est pas suffisante pour traiter

durablement cette maladie. En effet, la chirurgie peut être utilisée principalement lors du diagnostic précoce de la tumeur, et dans seulement 10 à 15% des cas si la tumeur est localement avancée ou à 0% du stade métastatique [Bhosale et al., 2018]. De plus, dans 80% des cas, les patients traités par chirurgie subissent une rechute [E. M. Anderson et al., 2021].

Concernant la chimiothérapie, le traitement de référence comprend plusieurs molécules (l'acide FOLinique, le Fluorouracil aussi appelé 5FU, l'IRINotecan, et l'OXaliplatine, une combinaison nommée FOLFIRINOX) [Papadatos-Pastos et al., 2014], mais son utilisation *in vitro* pourrait nuire à l'interprétation des résultats, puisqu'il s'agit d'une combinaison de plusieurs anticancéreux. Toutefois, une autre molécule anticancéreuse utilisée pour ce type de traitement, souvent combinée à d'autres molécules, est la gemcitabine [Hajatdoost et al., 2018], et constitue un bon modèle expérimental car elle est active *in vitro* même lorsqu'elle est employée seule. C'est une molécule hydrophile qui a donc besoin de transporteur pour passer la membrane lipidique des cellules qui est, elle, hydrophobe [Sarvepalli et al., 2019]. De plus, c'est une pro-drogue analogue à un nucléoside, précurseur des nucléotides nécessaire pour la synthèse de l'ADN et de l'ARN, ayant besoin d'être métabolisée dans la cellule pour être efficace. Son mécanisme d'action repose sur des protéines membranaires jouant le rôle de transporteur de nucléoside permettant son internalisation dans les cellules. Ses principaux effets sont une inhibition de la synthèse d'ADN et de la prolifération, induisant la mort par apoptose des cellules [Sousa Cavalcante et al., 2014]. Cependant, la présence d'un TME dense contribue à favoriser une résistance au traitement en gênant l'accès des anticancéreux aux cellules tumorales.

4.1.2 Résistance au traitement et nouvelles voies thérapeutiques

La chimiorésistance se manifeste généralement par deux voies : intrinsèque, en raison de facteurs génétiques, et acquise, après une période d'exposition des cellules tumorales aux agents cytotoxiques. Plusieurs mécanismes sont impliqués, notamment la régulation enzymatique et les voies de signalisation métabolique, avec par exemple la dérégulation des transporteurs de nucléosides [Sarvepalli et al., 2019]. De plus, comme cela a été présenté dans la partie 1.4.1 mais en particulier pour les tumeurs pancréatiques, le TME est constitué dans une large proportion de fibroblastes associés au cancer, dérivés des fibroblastes préexistants dans les tissus environnants, à cause de la présence de certaines cytokines ou de certains facteurs de croissance comme le TGF- β dans le TME. Ces fibroblastes contribuent à synthétiser et remodeler la MEC et leur présence est généralement associée à un pronostic défavorable. En effet, la MEC est dense, notamment à cause de la présence de fibronectine et de collagène lui procurant ses propriétés mécaniques. Cela confère à la tumeur une architecture organisée constituant un obstacle physique à la pénétration des anticancéreux dans la tumeur, caractérisé notamment par une pression interstitielle et une dureté élevées [Bhosale et al., 2018]. De plus, tout comme les fibroblastes, les cellules stellaires présentes dans le TME contribuent également à la synthèse de MEC et à la réponse desmoplastique engendrant un environnement hypovasculaire propice à la prolifération et à la survie des cellules tumorales [Sarvepalli et al., 2019]. Le TME comprend également des cellules immunitaires telles que des cellules de la réponse adaptative (lymphocytes T et B) mais aussi de la réponse innée, comme les macrophages associés aux tumeurs qui participent aussi à la chimiorésistance et à la prolifération de la tumeur.

Compte-tenu de ces difficultés d'accès des anticancéreux aux cellules tumorales, les nouvelles thérapies doivent être multifformes et impliquer des stratégies visant à passer la barrière du TME, en le remodelant ou bien en utilisant des vecteurs permettant le ciblage et la délivrance de médicaments dans les cellules tumorales [Bhosale et al., 2018]. Elles peuvent être combinées à des approches immunothérapeutiques, telles que la piste prometteuse des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires ("checkpoint inhibitor" en anglais) [E. M. Anderson et al., 2021]. Les approches envisagées pour traverser la barrière du TME peuvent être basées sur des méthodes

pharmacologiques, enzymatiques ou utilisant des nanoparticules, mais plus récemment, d'autres stratégies reposant sur des méthodes physiques, telles que celles présentées sur la figure 4.2, font l'objet d'un effort de recherche croissant [Gouarderes, Mingotaud et al., 2020].

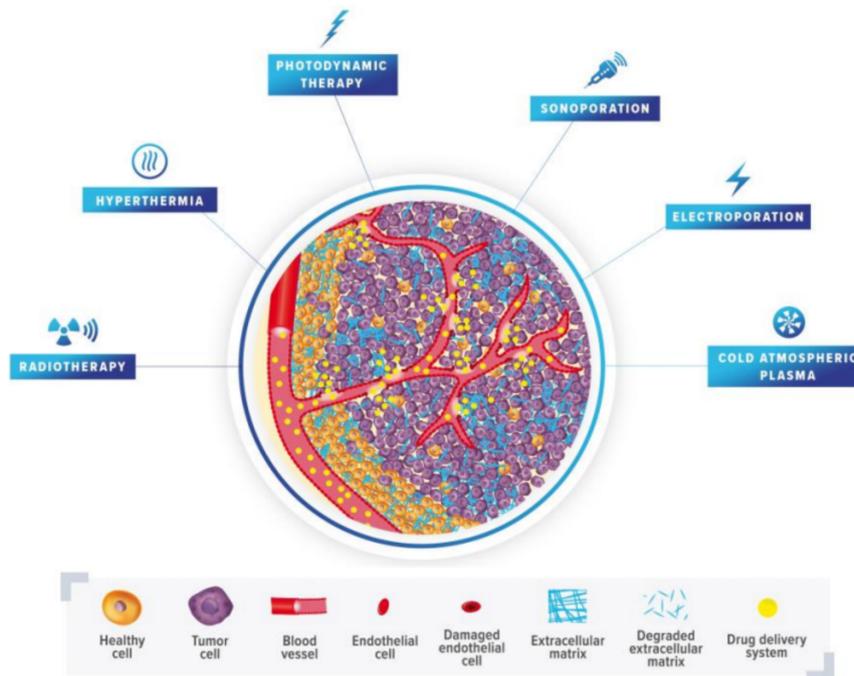


FIGURE 4.2 – Illustration des principales méthodes physiques pouvant favoriser le passage de la barrière de l'environnement tumoral par les molécules de traitement anticancéreux [Gouarderes, Mingotaud et al., 2020].

La dégradation du TME par ces méthodes permet de réduire la pression interstitielle et de rendre la diffusion des molécules plus facile au sein de la tumeur. Dans ce contexte, l'EPN apparaît comme une piste prometteuse permettant la perméabilisation des cellules et le phénomène de "vascular lock" permettant de maintenir disponibles plus longtemps les molécules utilisées pour le traitement. De plus, il a été montré récemment que l'application de champ électrique pulsé pouvait influencer la production de collagène et contribuer à remodeler la MEC [Gouarderes, Gibot, 2022], comme cela avait déjà été observé *in vivo* avec le constat d'une bonne cicatrisation des tissus après traitement par ECT. De nombreuses études sont en cours pour étendre l'application de l'ECT des tumeurs cutanées facilement accessibles aux tumeurs plus profondes telles que celles du cancer du pancréas. L'équipe de [Granata et al., 2015] a montré que l'ECT de l'adénocarcinome pancréatique localement avancé (PDAC), réalisée avec de la bléomycine au cours d'une chirurgie ouverte, pouvait être une modalité de traitement envisageable. L'équipe de [Rudno-Rudzińska, 2021] a récemment réalisé une étude clinique montrant que l'IRE et l'ECT avec du cisplatine administré par voie systémique ou du calcium par voie intratumorale avaient un potentiel d'efficacité pour le traitement du cancer du pancréas, avec une survie accrue par rapport à la chimiothérapie seule. En effet, d'autres pistes de traitement du cancer du pancréas étudiées reposent sur l'utilisation de techniques chirurgicales d'ablation plus ciblées que la radiothérapie, comme l'électroporation irréversible (IRE).

4.1.3 Approche envisagée dans les travaux présentés

Comme cela a été présenté dans la partie 1.4 de manière plus générale, les modèles tumoraux utilisés pour étudier le cancer du pancréas *in vitro* vont des cellules cultivées en 2D aux organoïdes voire aux coupes de morceaux de tumeurs extraits directement des patients, permettant d'avoir un TME bien plus développé que les sphéroïdes [Pham et al., 2021], afin

d'aller vers la médecine personnalisée. Concernant les sphéroïdes en co-culture, approche envisagée dans un premier temps ici, ils sont le plus souvent produits en utilisant des fibroblastes et/ou des cellules stellaires et/ou des cellules endothéliales en plus des cellules cancéreuses, avec la possibilité d'ajouter de la matrice en utilisant du Matrigel ou du collagène de type I [Lee et al., 2018, Lazzari et al., 2018, Leenhardt et al., 2019, Xie et al., 2020]. Le choix est fait de se concentrer tout d'abord sur l'ajout de fibroblastes uniquement, puisque c'est le type cellulaire majoritaire dans le TME des tumeurs pancréatiques. Ces sphéroïdes sont caractérisés en terme de prolifération, morphologie mais aussi de MEC produite, avec l'immunomarquage de la fibronectine, synthétisée par les fibroblastes. Il s'agit ensuite de réaliser des tests d'EPN avec et sans anticancéreux sur ces sphéroïdes et de comparer les résultats avec ceux obtenus sur des sphéroïdes de cellules cancéreuses seulement. Les anticancéreux testés ici sont la gemcitabine et la bléomycine. En effet, la gemcitabine est une molécule hydrophile donc l'EPN devrait lui permettre une internalisation plus efficace dans les cellules à travers les pores hydrophiles formés. De plus, elle a un effet sur les cellules même en l'absence d'EPN, à l'inverse de la bléomycine, même si les résultats *in vivo* et *in vitro* montrent une forte chimiorésistance. Cela devrait donc permettre d'étudier l'impact de l'EPN sur son efficacité. De plus, les tests avec ces deux anticancéreux devraient rendre possible la comparaison des résultats obtenus sur sphéroïdes monotypiques et en co-culture pour étudier l'incidence de la présence de MEC sur l'efficacité du traitement testé, et déterminer si la barrière du TME présente *in vivo* est en partie reproduite *in vitro*.

4.2 Mise au point d'un modèle de sphéroïde en co-culture

4.2.1 Protocole

L'objectif étant de produire des sphéroïdes en co-culture avec présence de MEC, il faut tout d'abord utiliser des micropuits plus grands que ceux utilisés précédemment, afin d'avoir la possibilité de faire croître les sphéroïdes sur un temps plus long. Un moule avec des puits de diamètre 300 μm et de profondeur 400 μm est alors fabriqué.

Les cellules utilisées pour produire ces sphéroïdes de cancer du pancréas sont issues d'une part de la lignée de cellules de cancer de pancréas PANC1 (Merck) et d'autre part de la lignée de fibroblastes MRC5 (Merck), couramment utilisés pour des modèles de co-culture de sphéroïdes tumoraux [Lazzari et al., 2018, Franchi-Mendes et al., 2021] et en particulier pour le cancer du pancréas [Ding et al., 2018]. Comme les fibroblastes se divisent moins rapidement que les cellules cancéreuses, il est nécessaire de les ensemercer dans les micropuits en proportion plus importante que les cellules cancéreuses. Le ratio de 1:3 est utilisé [Yakavets et al., 2020], en conservant le même nombre total de cellules ensemençées entre les sphéroïdes monotypiques et hétérotypiques. La quantité totale de cellules à ensemercer déterminée grâce à des essais préliminaires, pour les micropuits de diamètre 300 μm , est de 1.88×10^5 cellules. Pour les sphéroïdes monotypiques, 400 μL d'une solution de cellules PANC1 de concentration 4.7×10^5 cellules/mL est déposée au-dessus des puits avant d'agiter avec un agitateur orbital pendant 15 min à 100 rotations/min. Il faut ensuite enlever l'excédent de cellules puis mettre les sphéroïdes en culture dans l'incubateur. Pour la co-culture, l'ensemencement est réalisé en deux temps, avec d'abord les cellules PANC1 puis les fibroblastes MRC5, en suivant à chaque fois le même protocole d'ensemencement que pour les sphéroïdes monotypiques, sans délai entre les deux ensemencements.

Pour être en mesure de distinguer les deux types cellulaires utilisés, les cellules MRC5 ont été transfectées avec un plasmide commercial (Incucyte NucLight Green Lentivirus Puro, Sartorius) afin que leur noyau apparaisse en vert lors de l'observation en fluorescence. Le protocole utilisé est décrit dans l'annexe J.

Durant la mise au point du protocole de co-culture, plusieurs biomolécules ont été testées afin d'améliorer la pertinence du modèle de tumeur fibreuse :

- Le collagène de type I (queue de rat, Corning) est d'abord testé lors de l'ensemencement des MRC5, avec une concentration de 0.1 mg/mL [Xie et al., 2020], dans le but d'ajouter un élément très présent dans la MEC. Cependant, les sphéroïdes ne semblaient pas très cohésifs et les MRC5 disparaissaient très rapidement (moins de 3 jours), peut-être à cause de l'origine animale de ce collagène (rat) alors que les cellules utilisées sont d'origine humaine.
- L'acide ascorbique (Merck) avec une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$, afin de stimuler la production de collagène par les fibroblastes [Pillet et al., 2017], mais avec lequel aucun signal n'est détecté après 9 jours de co-culture lors de l'immunomarquage du collagène de type I.
- Le facteur de croissance TGF- β (Abcam), jouant un rôle dans l'activation des fibroblastes et donc la synthèse de tissu fibreux, est également testé, avec une concentration de 10 ng/mL [Yakavets et al., 2020].

Même si les deux premières pistes sont intéressantes, les études présentées ici se concentrent uniquement sur l'utilisation du facteur de croissance TGF- β car les résultats obtenus en termes de développement de MEC sont les plus prometteurs par rapport aux autres pistes envisagées.

4.2.2 Caractérisation des sphéroïdes produits

Avant d'effectuer des tests d'EPN sur les sphéroïdes produits, il est important de les caractériser afin de déterminer la pertinence de ce modèle par rapport à l'objectif visé, à savoir reproduire un environnement fibreux.

4.2.2.1 Répartition des fibroblastes au sein des sphéroïdes en co-culture

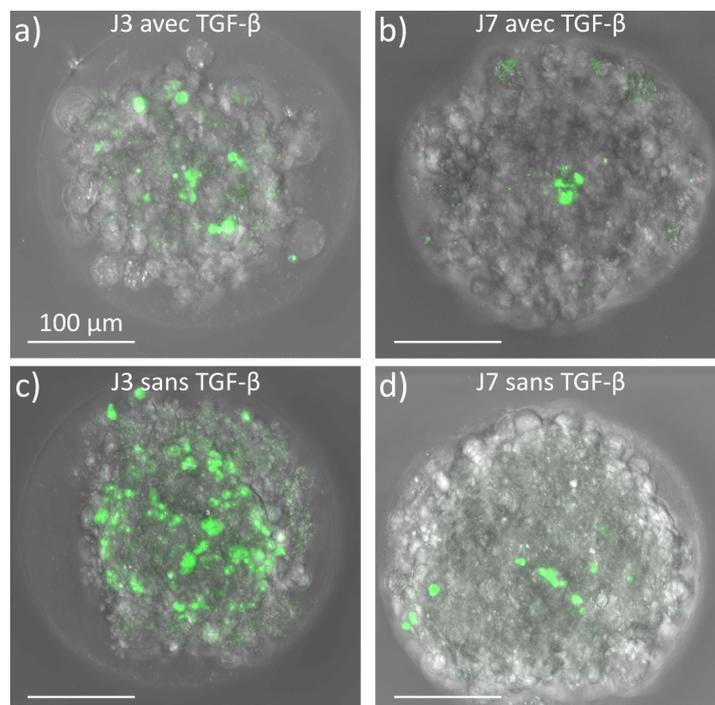


FIGURE 4.3 – Proportion de cellules MRC5 dans des sphéroïdes en co-culture de cellules PANC1 et MRC5 : MIP de z-stack typiques réalisés au microscope confocal ($\times 25$) de sphéroïdes cultivés 3 jours (a) ou 7 jours (b) avec facteur de croissance TGF- β (10 ng/mL), et 3 jours (c) ou 7 jours (d) sans TGF- β . Vert = MRC5.

Lors de la mise au point de la production de sphéroïdes en co-culture, la répartition et la quantité de fibroblastes au cours du temps est observée, grâce au marquage vert des noyaux des cellules MRC5. La tendance observée est une diminution de la proportion de MRC5 au cours de la culture (figure 4.3 a et c à 3 jours de culture en comparaison avec b et d à 7 jours de culture). On constate également une plus forte densité de MRC5 au centre du sphéroïde, ce qui est cohérent avec ce qui est observé dans la littérature [Lazzari et al., 2018].

Bien que la même quantité de MRC5 soitensemencée au départ dans les deux cas, on remarque également une différence de proportion de MRC5 au cours de la co-culture avec TGF- β (figure 4.3,a) par rapport à la co-culture sans TGF- β (figure 4.3,c), qui semble se lisser avec le temps (figure 4.3,b et d).

4.2.2.2 Environnement tumoral

L'objectif ici est d'obtenir des sphéroïdes avec un environnement tumoral complexe. Pour l'étudier, l'immunomarquage de la fibronectine est réalisé avec un protocole classique de fixation, perméabilisation et marquage avec anticorps primaires et secondaires, adapté aux sphéroïdes (voir annexe K). En effet, cette glycoprotéine très présente dans la MEC des tumeurs pancréatiques contribue à la régulation de ses propriétés mécaniques et à la chimiorésistance qui peut se mettre en place [Lazzari et al., 2018].

Dans un premier temps, et afin de mieux visualiser le signal lié à la présence de fibronectine et celui lié aux noyaux des cellules MRC5, aucun marquage fluorescent des noyaux n'est réalisé contrairement à ce qui est fait classiquement, pour ne pas risquer de confondre le signal des noyaux et celui de la fibronectine, même s'ils ne sont en théorie pas aux mêmes endroits dans le sphéroïde (noyau des cellules ou espace intercellulaire). En effet, compte tenu des longueurs d'onde des lasers disponibles sur le microscope confocal utilisé, et puisque la fibronectine est marquée dans le rouge lointain et les MRC5 dans le vert, il faudrait marquer les noyaux dans le rouge, mais il existerait alors un risque de présence de bruit lié au marquage des noyaux sur le signal de la fibronectine observé dans le rouge lointain.

Les images des sphéroïdes typiques obtenues sont présentées sur la figure 4.4. Elles montrent qu'en l'absence de TGF- β , la fibronectine est synthétisée uniquement au centre du sphéroïde (figure 4.4,a). Il semble qu'elle soit sécrétée autour des fibroblastes, apparaissant en vert sur l'image, ce qui est cohérent, même s'il reste peu de fibroblastes, comme vu au paragraphe précédent, étant donné que les sphéroïdes ont été fixés au bout de 7 jours de culture.

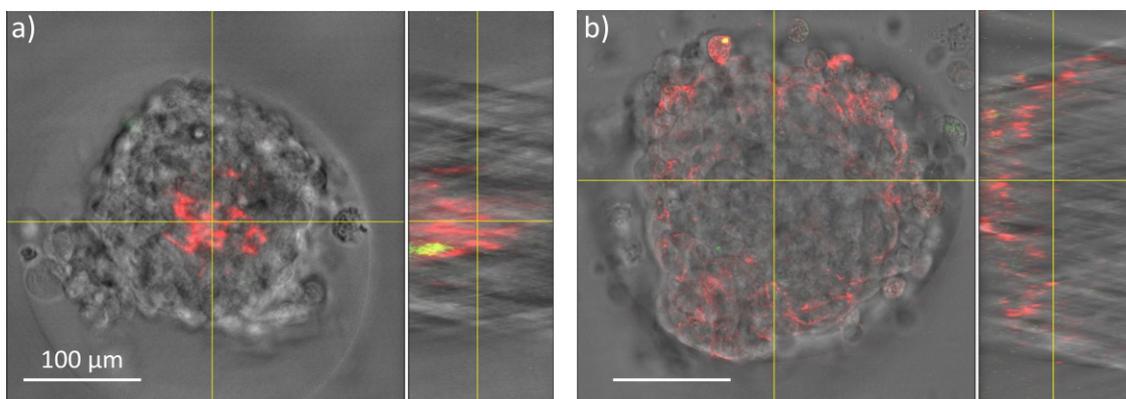


FIGURE 4.4 – MIP d'images typiques réalisées au microscope confocal ($\times 25$) après immunomarquage de la fibronectine synthétisée après 7 jours de co-culture sans (a) ou avec (b) TGF- β . Vert = MRC5, Rouge = fibronectine.

En ce qui concerne les sphéroïdes cultivés en présence de TGF- β (figure 4.4,b), on observe une répartition de la fibronectine nettement plus homogène principalement en périphérie du

sphéroïde, formant comme une coque autour du cœur du sphéroïde. De plus, le signal est bien localisé dans l'espace intercellulaire, comme attendu. Il apparait donc que la co-culture en présence de TGF- β permet une synthèse homogène de MEC au bout de 7 jours de culture.

Par ailleurs, l'immunomarquage du collagène de type I a aussi été réalisé sur des sphéroïdes en co-culture avec et sans TGF- β et des sphéroïdes de PANC1 après 7 jours de culture, mais les observations au microscope confocal n'ont pas permis de mettre en avant la présence de collagène, avec l'obtention d'un signal de très faible intensité. De plus, la α -SMA ("Smooth Muscle Actin"), protéine reflétant l'activation des fibroblastes en myofibroblastes, a également été marquée sur des sphéroïdes au bout de 3 jours de co-culture sans TGF- β , car ce marquage a été effectué avant l'ajout de TGF- β dans le protocole de culture, mais aucun signal n'a été détecté.

4.2.2.3 Circularité

Pour étayer la caractérisation des sphéroïdes, l'étude de la circularité peut permettre de déterminer l'impact de la co-culture sur la morphologie des sphéroïdes dans notre cas, même si ce paramètre n'est pas forcément synonyme de production de MEC. Elle est définie par la relation suivante [Hwang et al., 2019] :

$$\mathcal{C} = 4\pi \frac{\mathcal{A}}{\mathcal{P}^2}, \quad (4.1)$$

avec \mathcal{C} la circularité d'un sphéroïde, \mathcal{A} son aire et \mathcal{P} son périmètre, forme parfaitement circulaire si $\mathcal{C} = 1$.

Afin d'effectuer ce calcul, on utilise des images réalisées en champ clair au microscope à épifluorescence ($\times 2.5$) et le logiciel ImageJ avec la fonctionnalité "Analyze particle", pour déterminer de manière automatique le contour des sphéroïdes, puis la fonctionnalité de mesure, pour que le logiciel affiche l'aire et le périmètre de chaque sphéroïde. On réalise cette étude sur des sphéroïdes de PANC1 et des sphéroïdes en co-culture avec du TGF- β , au bout de 7 et 9 jours de culture.

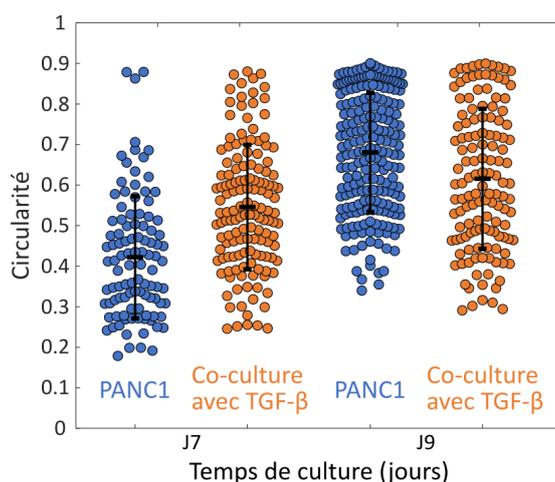


FIGURE 4.5 – Étude de la circularité moyenne de sphéroïdes de PANC1 ou en co-culture (PANC1+MRC5) avec TGF- β au bout de 7 et 9 jours de culture. Barre = écart-type standard, $N = [100-200]$ sphéroïdes/condition.

Les résultats présentés sur la figure 4.5 montrent d'une manière globale que la circularité des sphéroïdes est assez faible et qu'il y a une forte disparité dans la morphologie des sphéroïdes. En

effet, contrairement aux cellules HT29, il a été observé sur les images réalisées au microscope que les cellules PANC1 donnaient des sphéroïdes moins cohésifs et moins sphériques.

On constate aussi une augmentation de la circularité avec le temps de culture, pour arriver à une valeur moyenne entre 0.6 et 0.7, ce qui est de l'ordre de grandeur de la valeur obtenue par une autre équipe pour des sphéroïdes de cellules PANC1 [Monteiro et al., 2021]. De plus, il semble y avoir un effet de la co-culture sur la morphologie à 7 jours de culture, avec une légère augmentation de la circularité, comme cela avait également été constaté par cette équipe, même si elle avait utilisé un autre type de fibroblastes que les MRC5 pour la co-culture (fibroblastes associés au cancer du pancréas de lignée humaine immortalisée). Cet effet semble s'atténuer et même s'inverser à 9 jours de culture, avec une forte augmentation de la circularité des sphéroïdes monotypiques. Cela pourrait être dû au fait que ces sphéroïdes ont une croissance plus rapide, puisqu'ils sont uniquement composés de cellules cancéreuses, et comme ils se trouvent dans des micropuits de section circulaire, cela pourrait contribuer à contraindre leur forme sphérique.

4.2.2.4 Prolifération

Afin d'étudier le caractère invasif des sphéroïdes produits, un marquage de la prolifération est réalisé avec le même protocole que celui décrit pour les sphéroïdes de cellules HT29 dans la partie 3.4.2 (voir annexe H). Afin de repérer en rouge les noyaux des cellules fixées et perméabilisées et de pouvoir analyser quantitativement la prolifération pour les différents groupes testés, on ajoute également de l'IP à l'issue du marquage de la prolifération, qui est faite dans le rouge lointain à 647 nm. Le protocole utilisé pour ce marquage des noyaux consiste à incuber les sphéroïdes 30 min à température ambiante avec une solution d'IP à 30 μM dans du PBS, puis à réaliser 3 rinçages de 5 min au PBS. Le signal de l'IP n'est cependant pas représenté sur les images présentées (figure 4.6,a-c) afin de mieux visualiser le signal lié à la prolifération.

Les résultats de ces marquages, présentés sur la figure 4.6 montrent une diminution de la prolifération au cours de la culture des sphéroïdes, que ce soit pour des sphéroïdes de PANC1 seulement (figure 4.6,a) ou des sphéroïdes en co-culture (figure 4.6,b), si bien qu'il ne semble pas possible de caractériser l'impact sur la prolifération de traitements d'ECT sur des sphéroïdes en co-culture en présence de TGF- β , puisque la synthèse de matrice nécessite 7 jours et que le signal de prolifération est presque nul au bout de 9 jours pour un contrôle non traité (figure 4.6,c). Il ne sera donc pas possible, après avoir attendu quelques jours pour que le traitement fasse effet, de caractériser son impact sur la prolifération de tels sphéroïdes.

On réalise tout de même une quantification de la prolifération au jour 9 de culture. Pour cela, on utilise la même routine Matlab que celle présentée dans l'annexe G, mais en définissant le contour des sphéroïdes avec le signal des noyaux (IP) et en quantifiant l'intensité liée à la prolifération (EdU). On trace alors l'intensité de l'EdU en fonction de la profondeur dans le sphéroïde et on prend la valeur maximale de cette intensité, atteinte en périphérie du sphéroïde, zone où sont présentes les couches prolifératives comme on peut le voir sur les images au microscope confocal de la figure 4.6. La comparaison des intensités, globalement faibles, en fonction des conditions de culture (figure 4.6,d) montre que la prolifération est plus faible pour la co-culture que pour les sphéroïdes monotypiques, mais de manière significative uniquement pour les sphéroïdes en co-culture en présence de TGF- β (voir annexe F pour l'explication des tests statistiques effectués). Cette diminution de la prolifération est cohérente avec ce qui est observé dans la littérature [Jeong et al., 2016]. Une piste d'explication réside dans l'apparition d'une hypoxie au cœur du sphéroïde au cours de sa croissance pouvant contribuer à étouffer la prolifération, de même que la présence de cellules moins prolifératives (fibroblastes).

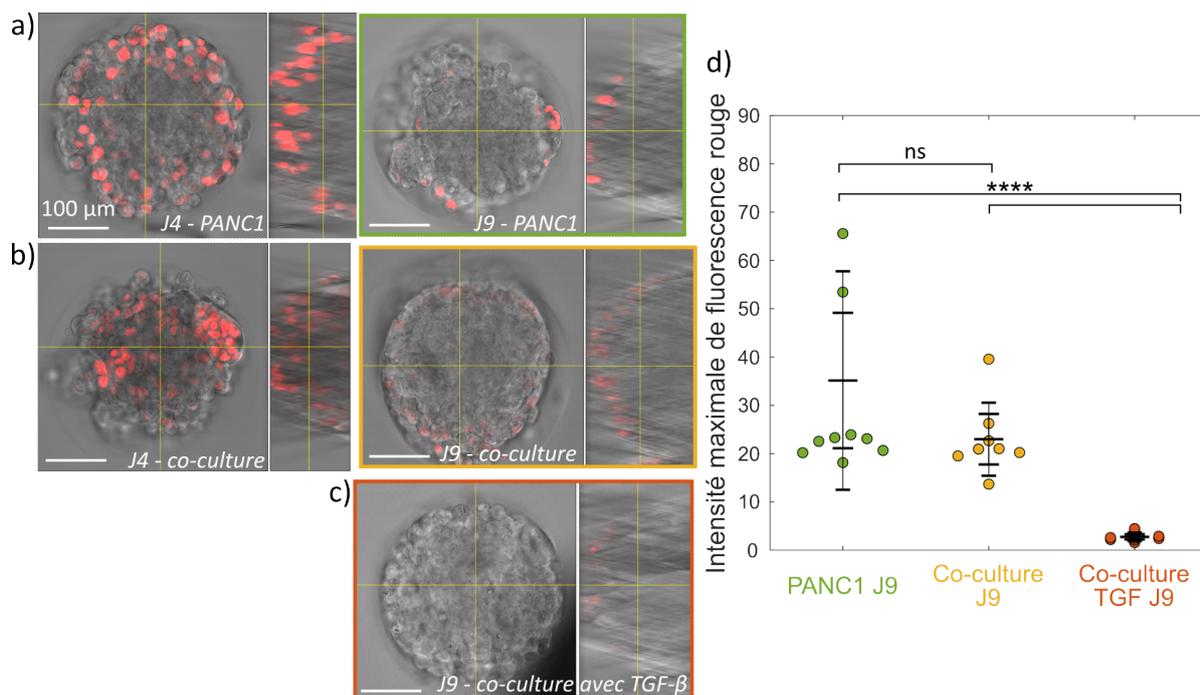


FIGURE 4.6 – Caractérisation de la prolifération de sphéroïdes de PANC1 seules ou en co-culture (PANC1+MRC5) avec ou sans TGF- β . (a-c) Vues orthogonales d'images typiques de sphéroïdes au microscope confocal ($\times 25$) de PANC1 seules à 4 et 9 jours de culture (a), de sphéroïdes en co-culture après 4 et 9 jours (b) et de sphéroïdes en co-culture en présence de TGF- β après 9 jours (c). Rouge = EdU (cellules proliférative). (d) Quantification de l'intensité maximale de fluorescence rouge (EdU) pour les différentes conditions après 9 jours de culture. **** $p < 0.0001$.

4.3 Application à l'électrochimiothérapie

Après avoir caractérisé les sphéroïdes produits, des tests d'EPN sont effectués afin de déterminer les paramètres permettant une EPN réversible et efficace, en utilisant des protocoles similaires à ceux testés au chapitre 3, puis de tester l'efficacité des différentes molécules anti-cancéreuses étudiées.

4.3.1 Validation des paramètres d'électroporation à appliquer

Afin d'avoir une première idée du champ à appliquer pour électroporer les sphéroïdes de cellules PANC1, on s'intéresse au potentiel transmembranaire (TMP) après application d'un champ d'intensité connue sur ces cellules. Pour cela, on utilise les propriétés des cellules PANC1 données par [Lannin et al., 2016] (rayon $R=12.1 \mu\text{m}$, permittivité de la membrane cellulaire $\varepsilon_m=20.2 \times 10^{-11}$, conductivité du cytoplasme $\sigma_{cyt}=0.476 \text{ S/m}$), auxquelles on ajoute une estimation de l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la membrane ($d=5 \text{ nm}$) et de sa conductivité, qu'on prend arbitrairement égale à celle des cellules HT29 précédemment utilisées ($\sigma_m=1.1 \times 10^{-4} \text{ S/m}$), cette donnée n'étant pas trouvée dans la littérature mais n'influençant que très peu le résultat final. On utilise alors la relation 3.3, présentée dans la partie 3.3.2 lors du calcul pour les cellules HT29, pour déterminer le TMP pour une fréquence de 10 kHz pour différentes intensités de champ électrique appliquées. Pour les cellules HT29 (de propriétés $R=6.6 \mu\text{m}$, $d=5 \text{ nm}$, $\varepsilon_m=6.8 \times 10^{-11}$, $\sigma_m=1.1 \times 10^{-4} \text{ S/m}$, $\sigma_{cyt}=0.18 \text{ S/m}$ [L. Wu et al., 2012]), la valeur du TMP était de 0.9 V pour les paramètres d'EPN réversible et efficace déterminés expérimentalement (2 impulsions sinusoïdales de 300 V_{pp} , 10 kHz, 5 ms, espacées de 1 s), ce qui est dans la plage de valeurs rapportée dans la littérature [Teissié et al., 1993]. Ici pour les cellules PANC1, un

TMP de 0.9 V est atteint pour un champ appliqué d'environ 500 V/cm. Si on prend en compte le fait que les pertes liées aux contacts et aux électrodes dans le microsystème utilisé sont de 13% environ pour le microsystème utilisé dans ce chapitre (estimées avec la même méthode que dans la partie 3.3.1), il faudra appliquer une impulsion sinusoïdale d'amplitude $163 V_{pp}$ pour atteindre cette valeur de champ dans la chambre contenant les sphéroïdes. Cela correspond à une intensité de champ électrique inférieure à celle utilisée pour électroporer les cellules HT29, pour lesquelles il fallait un champ de $900 V_{RMS}/cm$. Ceci est cohérent puisque les cellules PANC1 sont plus volumineuses que les cellules HT29 (diamètre $24.2 \mu m$, intervalle de confiance à 95% = [11.7-12.6] [Lannin et al., 2016] contre $13.2 \mu m$ [L. Wu et al., 2012]) et que le TMP est directement relié à la taille des cellules.

Grâce à cette estimation, on teste alors trois valeurs de champ perçu par les sphéroïdes : $500 V_{RMS}/cm$, $700 V_{RMS}/cm$ et $900 V_{RMS}/cm$, correspondant respectivement à des amplitudes d'impulsions sinusoïdales de $163 V_{pp}$, $228 V_{pp}$ et $293 V_{pp}$. Afin d'évaluer l'efficacité d'EPN, on réalise une première série de tests avec ces trois jeux de paramètres sur des sphéroïdes de cellules PANC1 en utilisant l'IP et la FDA comme marqueurs fluorescents respectivement des cellules électroporées et vivantes, avec le protocole décrit dans la partie 3.4.1.1. Les sphéroïdes sont observés au microscope à épifluorescence en $\times 2.5$ et en $\times 10$, en réalisant des z-stack de 10 images et en quantifiant l'intensité rouge (IP) sur les MIP (Maximum Intensity Projection), grâce au logiciel ImageJ (voir annexe E). Cette quantification est réalisée sur les images en $\times 2.5$, afin d'avoir un plus grand nombre de données. Les résultats de ce test sont présentés sur la figure 4.7.

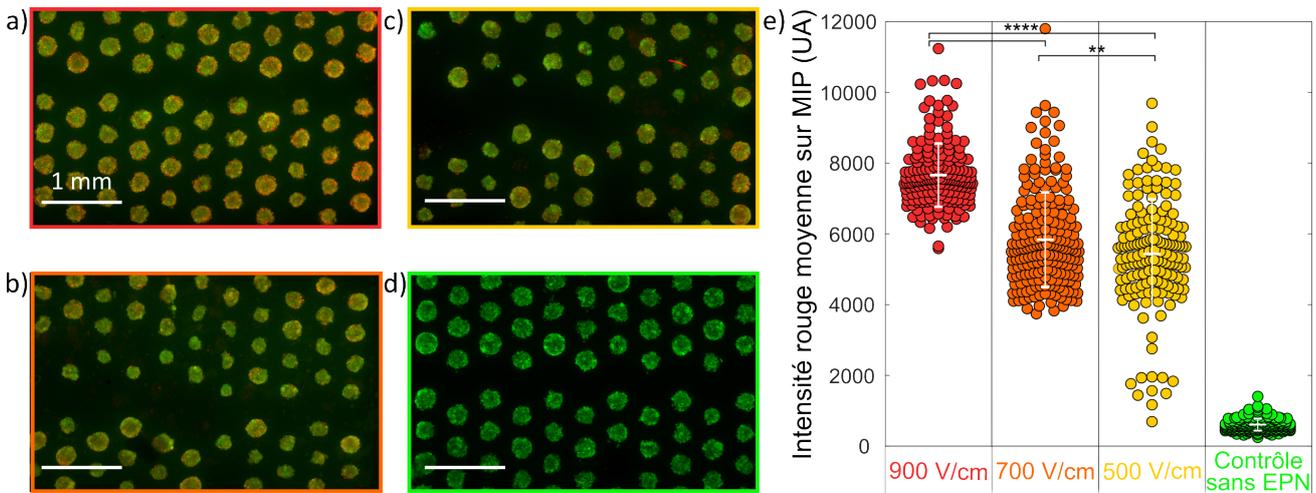


FIGURE 4.7 – Étude de l'efficacité d'EPN d'impulsions sinusoïdales d'amplitudes croissantes sur des sphéroïdes de cellules PANC1. (a-c) MIP d'images au microscope à épifluorescence ($\times 2.5$) réalisées 5 min après EPN avec un champ de (a) $900 V_{RMS}/cm$, (b) $700 V_{RMS}/cm$, (c) $500 V_{RMS}/cm$ et (d) contrôle sans EPN. Rouge = IP, Vert = FDA, Jaune = les deux. (e) Quantification de l'intensité de fluorescence rouge (IP) sur ces MIP. Point = valeur pour un sphéroïde, Barre = Moyenne +/- écart-type standard, **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, $N = [150 \text{ à } 200]$ sphéroïdes/condition, une expérience.

Les images au microscope à épifluorescence (figure 4.7,a-c) montrent qu'avec la diminution de l'intensité du champ appliqué (respectivement 900, 700 ou $500 V_{RMS}/cm$), l'intensité rouge liée à la quantité de cellules électroporées diminue, et donc visuellement la couleur jaune correspondant à la superposition des cellules vivantes et électroporées, laisse place à une teinte plus verte, correspondant à des cellules non électroporées. Cela se retrouve sur la courbe donnant l'évolution de l'intensité rouge par sphéroïde pour les différentes conditions testées (figure 4.7,d). On constate également sur cette courbe qu'il y a très peu d'écart en termes d'efficacité

entre 700 et 500 V_{RMS}/cm (valeur-p associée au test de Student supérieure de deux ordres de grandeur à celle du groupe électroporé avec un champ de 900 V_{RMS}/cm , voir annexe F pour son calcul). La quantification de l'intensité rouge sur le contrôle non traité montre bien qu'il y a très peu de cellules marquées par l'IP en l'absence d'EPN, car seules les quelques cellules mortes par sphéroïde sont marquées en rouge (voir annexe D sur la double utilisation de l'IP comme marqueur fluorescent).

Il faut ensuite étudier la réversibilité de la perméabilisation induite par ces conditions d'EPN. Pour cela, on réalise un marquage de la viabilité des cellules 2h après EPN de sphéroïdes de cellules PANC1 avec les mêmes paramètres d'EPN que ceux utilisés dans l'étude précédente (protocole décrit dans la partie 3.4.1.1). On réalise la quantification de la fluorescence rouge, associée ici aux cellules mortes, de la même manière que cela a été réalisé pour quantifier l'efficacité d'EPN, ce qui permet d'obtenir les résultats présentés sur la figure 4.8.

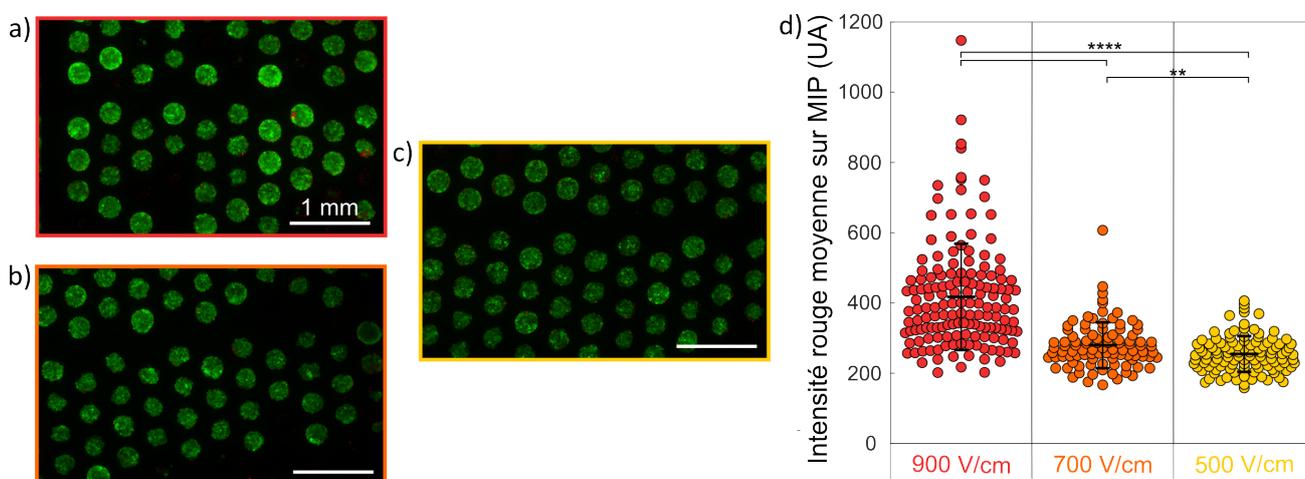


FIGURE 4.8 – Étude de la viabilité cellulaire 2h après EPN de sphéroïdes de cellules PANC1 avec des impulsions sinusoïdales d'amplitudes croissantes. (a-c) MIP d'images au microscope à épifluorescence ($\times 2.5$) réalisées 5 min après le marquage de la viabilité cellulaire 2h après EPN avec un champ de (a) 900 V_{RMS}/cm , (b) 700 V_{RMS}/cm , (c) 500 V_{RMS}/cm . Rouge = IP, Vert = FDA. (d) Quantification de l'intensité de fluorescence rouge (IP) sur ces MIP. Point = valeur pour un sphéroïde, Barre = Moyenne +/- écart-type standard, **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, $N = [150 \text{ à } 200]$ sphéroïdes/condition, une expérience.

De manière qualitative, on constate sur les images réalisées au microscope à épifluorescence (figure 4.8,a-c) que la proportion de cellules rouges donc perméabilisées est très faible, ce qui va dans le sens d'une perméabilisation réversible. Si on compare quantitativement les intensités rouges mesurées pour ces trois amplitudes de champ testées (figure 4.8,d), il apparait que pour 900 V_{RMS}/cm , celle-ci est significativement plus élevée que pour 700 et 500 V_{RMS}/cm (valeur-p associée au test de Student largement inférieure à 10^{-4}). Cela peut en partie expliquer la différence d'intensité observée pour l'étude de l'efficacité de l'EPN (figure 4.7,d), lors de laquelle l'intensité rouge mesurée pouvait être plus élevée pour 900 V_{RMS}/cm à cause de la présence de cellules mortes, marquées elles aussi en rouge. Par ailleurs, étant donné que pour 500 V_{RMS}/cm et 700 V_{RMS}/cm l'intensité rouge est similaire (figure 4.8,d), l'amplitude de champ choisie pour la suite est 700 V_{RMS}/cm car elle permet une efficacité d'EPN légèrement supérieure (figure 4.7,d).

4.3.2 Électrochimiothérapie : comparaison de la bléomycine avec la gemcitabine

Le protocole d'EPN à appliquer pour les sphéroïdes de cellules PANC1 ayant été déterminé, il s'agit maintenant d'étudier le traitement par ECT de ces derniers, dans un premier temps sans ajout de matrice extracellulaire. Deux molécules anticancéreuses sont testées et comparées : la bléomycine, molécule classiquement utilisée pour l'ECT, et la gemcitabine, un anticancéreux classique dans le traitement chimiothérapeutique du cancer du pancréas, comme cela a été vu précédemment (partie 4.1).

Afin d'évaluer simplement l'effet de ces deux molécules, des marquages de viabilité cellulaire sont effectués trois jours après EPN en présence des anticancéreux avec le protocole d'EPN déterminé dans la partie précédente (2 impulsions sinusoïdales espacées de 1 s, 700 V_{RMS}/cm soit 228 V_{pp} appliqués, 10 kHz, 5 ms).

Les résultats (figure 4.9) montrent qu'en ce qui concerne la bléomycine, son effet correspond à celui attendu, puisque plusieurs couches de cellules en périphérie des sphéroïdes apparaissent comme mortes même après seulement trois jours de traitement (figure 4.9,c). Cela rejoint les premières études *in vivo* testant des traitements d'ECT sur des patients atteints de cancer du pancréas [Granata et al., 2015].

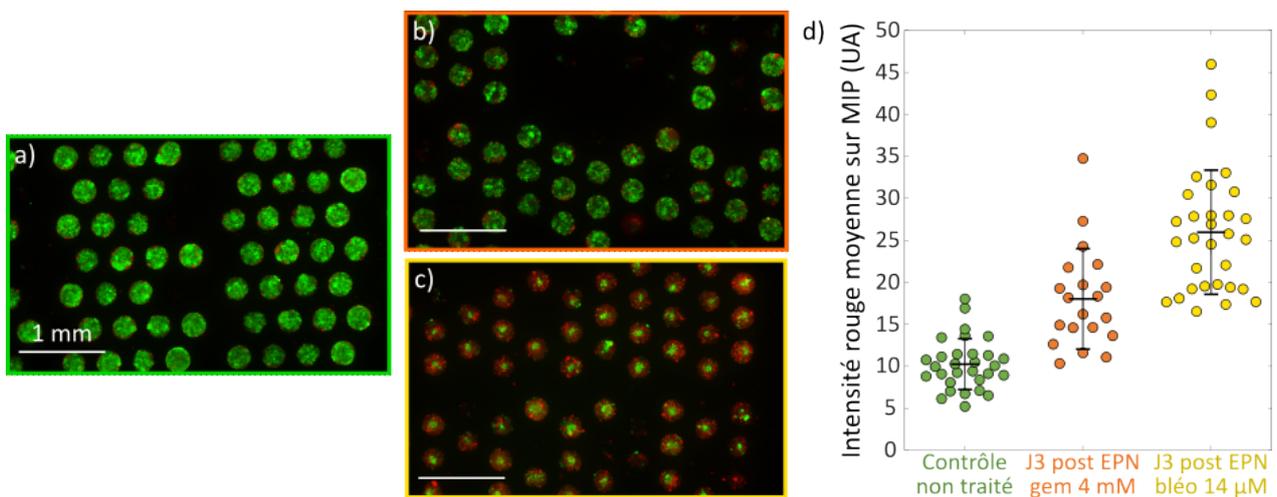


FIGURE 4.9 – Étude de la viabilité de sphéroïdes de cellules PANC1 trois jours après EPN en présence de gemcitabine ou de bléomycine. (a-c) Images au microscope à épifluorescence ($\times 2.5$) de sphéroïdes (a) non traités (sans EPN ni anticancéreux), (b) 3 jours après EPN en présence de gemcitabine (4 mM) et (c) 3 jours après EPN en présence de bléomycine (14 μM), tous les sphéroïdes étant à 6 jours de culture au total. Rouge = cellule morte (IP), Vert = cellule vivante (FDA). (d) Moyenne et écart-type standard de la quantification de l'intensité rouge (IP) sur les MIP en $\times 10$. $N = [20 \text{ à } 30]$ sphéroïdes/condition, une expérience.

En revanche, la gemcitabine semble quant à elle n'avoir que très peu d'effet sur la viabilité des cellules à court terme (3 jours) en comparaison avec la bléomycine, et ce même avec une concentration très élevée. En effet, la concentration de gemcitabine utilisée dans le cadre du traitement de cellules ou sphéroïdes est le plus souvent autour de 100 à 300 μM [Sundararajan et al., 2016, Lee et al., 2018, Xie et al., 2020]. Or ici, cette concentration a volontairement été augmentée d'un facteur de plus de 10 pour atteindre 4 mM, après avoir constaté l'absence d'effet sur la viabilité après trois jours pour une concentration de 100 μM dans nos conditions. Cependant, l'effet sur la viabilité ne reste que très peu visible, ce qui semble être en concordance avec les résultats trouvés sur sphéroïdes par [Lee et al., 2018] et [Xie et al., 2020], rapportant une forte chimiorésistance des cellules PANC1 à la gemcitabine, même si leurs études sont réalisées

sans EPN. Une des raisons pouvant expliquer ce temps plus long d'action de la gemcitabine pourrait aussi venir de la nature même de cette molécule, puisque c'est une pro-drogue ayant besoin d'être métabolisée dans la cellule pour agir, ce qui peut prendre du temps et ralentir l'effet observée sur la mortalité. Il faut donc réaliser une étude de l'impact de l'EPN sur l'efficacité de la gemcitabine en suivant les sphéroïdes sur un temps plus long, permettant de déterminer si un effet significatif sur la viabilité est alors visible.

Cette étude à plus long terme des sphéroïdes (7 jours après traitement) est alors réalisée, avec une faible concentration de gemcitabine (5 μM), comme c'était le cas dans les études de [Abou Ali et al., 2018] et [Leenhardt et al., 2019], portant sur l'utilisation d'ultrasons pour améliorer l'efficacité de la gemcitabine sur des sphéroïdes, auxquelles le professeur Prat a participé. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.10, en normalisant l'intensité rouge (cellules mortes) des sphéroïdes après le marquage de la viabilité par celle mesurée sur un contrôle non traité.

On constate une nouvelle fois un effet plus important de la bléomycine, avec un ratio autour de 6 fois plus de cellules mortes dans le groupe traité avec cette molécule que dans le contrôle non traité, en comparaison avec la gemcitabine, pour laquelle ce ratio est seulement entre 2 et 4 alors que les sphéroïdes ont été suivis quatre jours de plus. Toutefois, il est intéressant de remarquer que cette étude met en avant une efficacité significativement plus importante de la gemcitabine lorsque son internalisation est favorisée par l'EPN (valeur-p largement inférieure à 10^{-4}). Ces résultats montrent que même si la bléomycine semble rester la molécule de choix pour l'ECT, l'utilisation de l'EPN pour augmenter l'efficacité de la gemcitabine déjà utilisée dans le traitement de ce type de cancer est tout de même prometteuse.

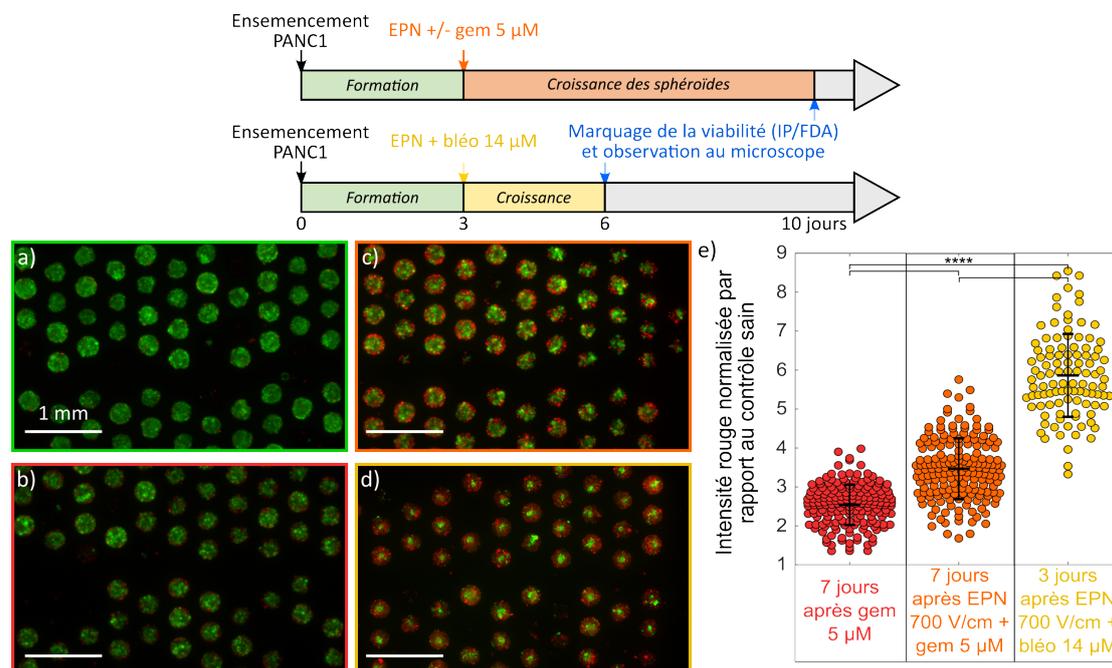


FIGURE 4.10 – Étude de l'effet de la gemcitabine à long terme sur les sphéroïdes de cellules PANC1. (a-d) Images au microscope à épifluorescence ($\times 2.5$) de sphéroïdes (a) non traités, (b) 7 jours après ajout de gemcitabine (gem, 5 μM), (c) 7 jours après EPN en présence de gemcitabine (5 μM), (d) 3 jours après EPN en présence de bléomycine (bléo, 14 μM). Rouge = cellule morte (IP), Vert = cellule vivante (FDA). (e) Proportion de cellules mortes (intensité rouge) en comparaison à un contrôle non traité pour les sphéroïdes étudiés. Point = valeur pour un sphéroïde, Barre = Moyenne +/- écart-type standard, **** $p < 0.0001$, $N = [150 \text{ à } 200]$ sphéroïdes/condition, une expérience. Le contrôle non traité pour les groupes gem et le groupe bléo n'est pas le même puisque la durée totale de culture est différente.

Afin d'approfondir l'étude de l'effet de la gemcitabine et de la bléomycine sur les sphéroïdes de cellules PANC1, la même expérience est réalisée, mais en marquant la prolifération au lieu de la viabilité, trois jours après EPN en présence d'un de ces deux anticancéreux, en utilisant le protocole décrit dans l'annexe H. Pendant les premiers essais avec une concentration de gemcitabine de 100 μM , un effet radical a été montré sur la prolifération des sphéroïdes, même en l'absence d'EPN. Ici, une plus faible concentration de gemcitabine (5 μM) est utilisée, afin de se placer dans les mêmes conditions que l'étude précédente de l'effet de la gemcitabine sur la viabilité à long terme (figure 4.10). Les observations au microscope confocal (figure 4.11) montrent que même avec cette faible concentration de gemcitabine, il n'y a plus aucune cellule proliférative après 3 jours de traitement avec la gemcitabine, que ce soit avec ou sans EPN. À l'inverse, en ce qui concerne la bléomycine, comme cela avait été observé sur les sphéroïdes de cellules HT29 (figure 3.14,c), et en accord avec la littérature, la bléomycine n'a d'effet sur la prolifération que lorsque l'EPN l'aide à pénétrer dans les cellules. Si l'internalisation naturelle de la bléomycine par les cellules est un processus long et limité [Pron et al., 1999], cela ne semble pas être le cas pour la gemcitabine, malgré la nature hydrophile de ces deux molécules. La chimiorésistance observée *in vivo* est en grande partie liée au manque d'accessibilité de la gemcitabine dans les cellules à cause de l'environnement tumoral, et également à cause d'une dérégulation des transporteurs de nucléosides [Sarvepalli et al., 2019]. En effet, la gemcitabine a besoin de ces transporteurs pour être internalisée dans les cellules et métabolisée pour exercer son action, ce qui signifie qu'elle peut être efficace même sans EPN. Étant donné qu'ici seules des cellules PANC1 composent les sphéroïdes, il semblerait que le modèle ne permette pas de retrouver la chimiorésistance observée *in vivo*, en tout cas si l'on s'intéresse à l'effet de la gemcitabine sur la prolifération.

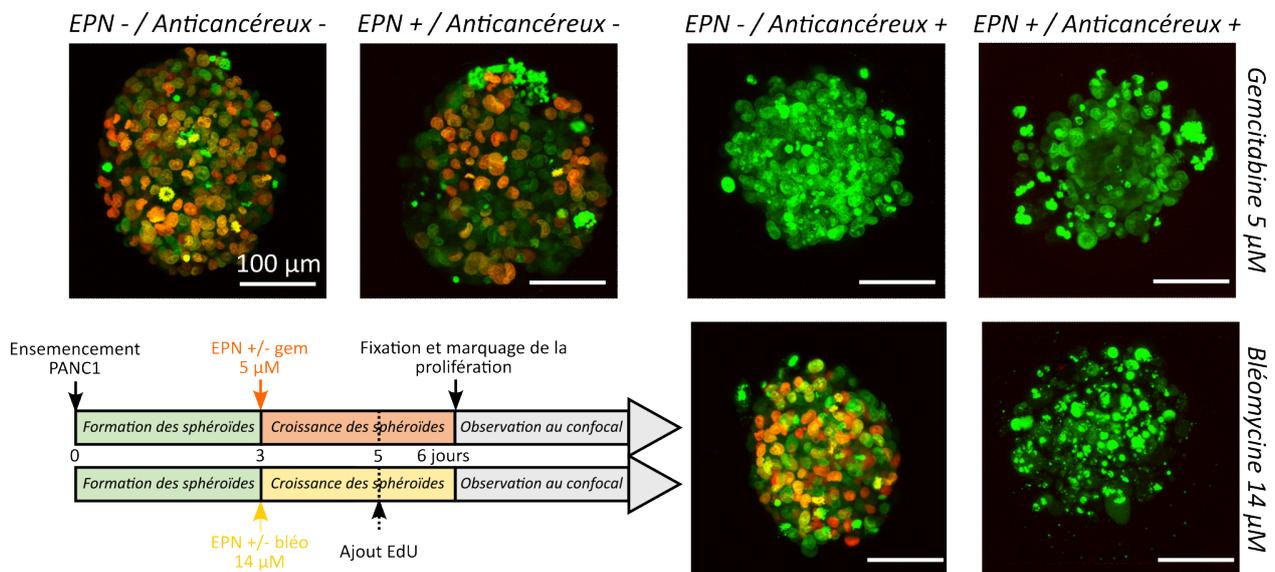


FIGURE 4.11 – Effet de la gemcitabine et de la bléomycine sur la prolifération de sphéroïdes de cellules PANC1 : MIP de z-stack de sphéroïdes typiques réalisés au microscope confocal ($\times 25$) après marquage de la prolifération 3 jours après ajout ou non de gemcitabine (5 μM) ou bléomycine (14 μM) avec ou sans EPN. Rouge = EdU (cellule proliférative), Vert = NucGreen (noyau des cellules).

4.3.3 Étude de l'impact du temps d'incubation de la gemcitabine sur son efficacité

Dans les expériences précédentes, la gemcitabine ajoutée pour le contrôle gemcitabine sans EPN est restée dans le milieu de culture pendant toute la durée du suivi. Cependant, lorsque

cette molécule est utilisée in vivo en chimiothérapie par voie systémique, elle est éliminée ou inactivée assez rapidement, notamment par le foie (temps de demi-vie de 5 à 20 minutes), et les concentrations maximales mesurées dans le plasma vont de 24 à 512 μM selon la dose administrée [Ciccolini et al., 2016]. Le temps d'incubation précédemment utilisé n'est donc pas représentatif de ce qui est effectué in vivo. Les concentrations utilisées in vitro sont nettement inférieures, mais cela peut se justifier par le fait que le modèle cellulaire est moins complexe que le tissu tumoral in vivo.

Si on réduit le temps d'incubation de la gemcitabine à seulement 3h, pour laisser le temps à la gemcitabine de diffuser correctement dans l'hydrogel, on observe une réduction de l'effet sur la mortalité des cellules au bout de 7 jours d'environ 30%, comme le montre la figure 4.12, qui représente l'intensité rouge (IP) normalisée par rapport à un contrôle non traité.

De plus, quel que soit le temps d'incubation, l'effet reste nettement inférieur à celui de la gemcitabine en présence d'EPN pour la même concentration, alors que dans ce cas, la gemcitabine étant présente uniquement dans le milieu servant pour l'EPN, elle ne reste que très peu de temps en contact avec les cellules. De surcroît, lorsque l'on teste une concentration 10 fois plus élevée de gemcitabine (50 μM) sans EPN, même si on la laisse dans le milieu de culture pendant toute la durée du suivi, la mortalité mesurée au bout de 7 jours est de l'ordre de celle observée pour 5 μM , ce qui montre que même avec une concentration plus élevée, cela semble être le faible transport de la gemcitabine dans les cellules qui réduit son efficacité, ce dernier étant grandement amélioré grâce à l'EPN. Ces résultats démontrent une fois de plus le potentiel de l'EPN et l'intérêt du microsystème développé ici pour son étude sur un grand nombre de sphéroïdes en parallèle.

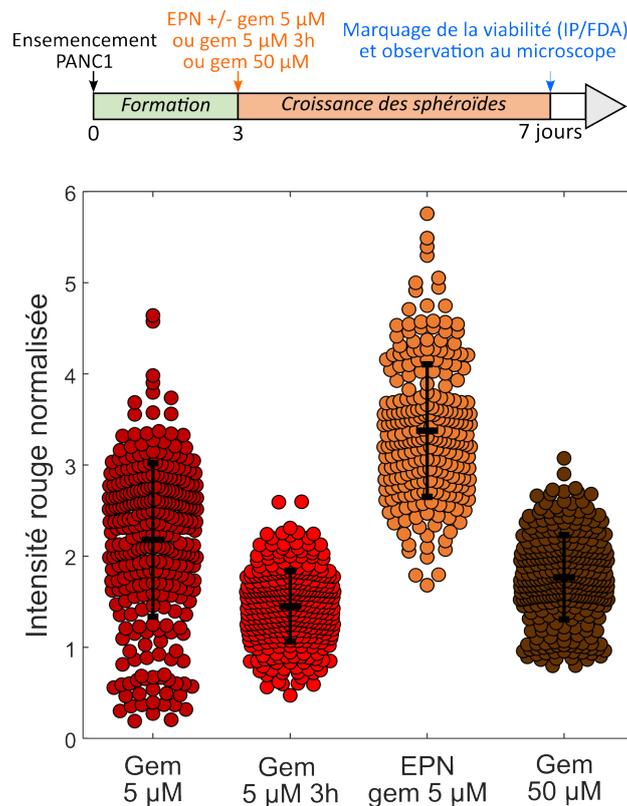


FIGURE 4.12 – Étude de l'effet de la gemcitabine à long terme (7 jours après ajout) sur la viabilité (IP et FDA) de sphéroïdes de PANC1 pour différentes concentrations et temps d'incubation. Point = valeur pour un sphéroïde, Barre = Moyenne +/- écart-type standard, $N = [250 \text{ à } 335]$ sphéroïdes/condition, deux expériences.

4.3.4 Influence de l'environnement tumoral sur l'efficacité d'électroporation

Pour l'étude de l'EPN des sphéroïdes en co-culture, les paramètres du champ électrique utilisés sont les mêmes que ceux utilisés pour les sphéroïdes de PANC1, puisque le seuil d'EPN ne devrait pas être trop impacté par la co-culture étant donnée la faible proportion de fibroblastes au bout de quelques jours. Cela a été vérifié visuellement lors d'un test d'EPN avec fluorophores et également indirectement par les résultats présentés dans cette partie, puisque la mortalité associée à l'EPN seule est bien du même ordre de grandeur que celle du contrôle non traité.

Une première étude préliminaire est réalisée sur des sphéroïdes en co-culture sans TGF- β au bout de 3 jours de culture. Elle consiste à tester l'EPN avec ou sans anticancéreux, et à réaliser un marquage de la prolifération un jour après. En effet, au-delà de 4 jours de culture, le signal de prolifération est très faible même pour le contrôle non traité, comme cela a été souligné précédemment (figure 4.6). Tout comme les expériences menées sur les sphéroïdes de cellules PANC1, la quantification de la prolifération (figure 4.13) montre que la gemcitabine a un effet quasi immédiat que ce soit avec (orange) ou sans EPN (rouge), alors que la bléomycine n'a d'effet que lorsqu'elle est associée à l'EPN (jaune). Le contrôle non traité (vert), le contrôle avec EPN seulement (bleu) ou bléomycine seulement (marron) présentent quant à eux des niveaux de prolifération similaires, comme on pouvait s'y attendre, ce qui confirme notamment que les paramètres utilisés permettent bien une EPN réversible.

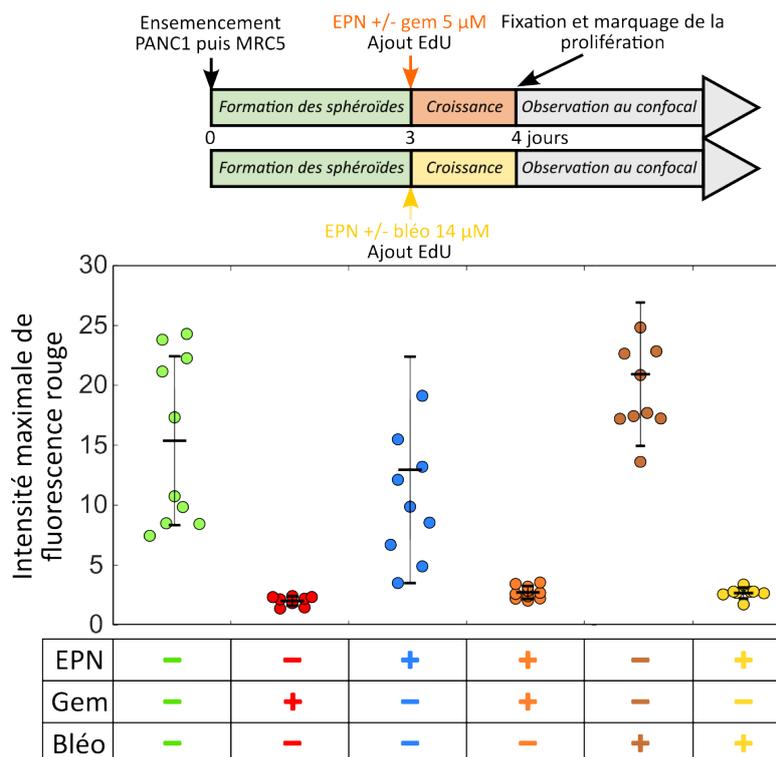


FIGURE 4.13 – Étude de la prolifération de sphéroïdes en co-culture sans TGF- β un jour après EPN avec ou sans anticancéreux (gemcitabine ou bléomycine). Point = valeur pour un sphéroïde, Barre = Moyenne +/- écart-type standard, N = 10 sphéroïdes/condition, une expérience.

Cependant, il faut désormais s'intéresser aux sphéroïdes plus complexes obtenus après 7 jours de co-culture en présence de TGF- β , puisqu'ils permettent d'obtenir un environnement tumoral riche en fibronectine, afin de mieux s'approcher d'une tumeur fibreuse, en comparaison avec ces sphéroïdes en co-culture obtenus après seulement 3 jours de culture. Pour cela, on réalise des tests d'EPN avec ou sans gemcitabine sur ces sphéroïdes à 7 jours de culture, et

on attend ensuite 6 jours pour voir l'effet du traitement sur la viabilité des cellules, puisque le marquage de la prolifération n'est pas possible.

Les résultats obtenus (figure 4.14) montrent que la mortalité pour le contrôle non traité est anormalement élevée. Cela est lié au fait que les sphéroïdes ont eu une trop forte croissance et ont atteint la taille des micropuits. Des contraintes mécaniques sont alors appliquées par l'agarose lors de la croissance de ces sphéroïdes, ce qui modifie leur comportement notamment en termes de prolifération [Prunet, 2020] et peut modifier leur réponse à un traitement [Rizzuti et al., 2020]. Cependant, si on compare les groupes gemcitabine seule (rouge) et EPN avec gemcitabine (orange), pour lesquels les sphéroïdes sont moins impactés par ce phénomène, puisque leur croissance a été ralentie par l'anticancéreux, on constate une efficacité plus importante lors de l'utilisation de l'EPN, comme c'était le cas pour les sphéroïdes de PANC1 (figure 4.10).

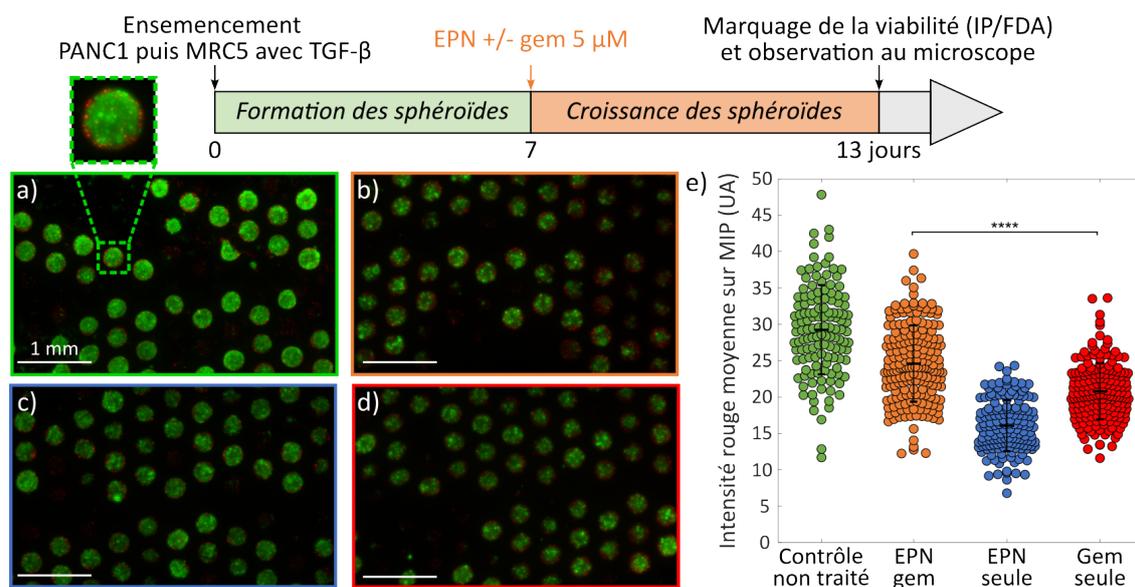


FIGURE 4.14 – Étude de l'impact de la gemcitabine combinée à l'EPN sur des sphéroïdes en co-culture avec TGF- β au bout de 6 jours. (a-d) Images au microscope à épifluorescence ($\times 2.5$) du marquage de la viabilité 6 jours après expérience pour des sphéroïdes (a) non traités (et zoom sur un sphéroïde), (b) soumis à une EPN en présence de gemcitabine (EPN gem, 5 μM), (c) soumis uniquement à une EPN (EPN seule), (d) après ajout de gemcitabine (gem seule, 5 μM). Rouge = cellule morte (IP), Vert = cellule vivante (FDA). (e) Proportion de cellules mortes obtenue en mesurant l'intensité rouge moyenne sur les MIP des images d'épifluorescence. Barre = Moyenne +/- écart-type standard, **** $p < 0.0001$, $N = [150 \text{ à } 200]$ sphéroïdes/condition, une expérience.

Afin de pouvoir évaluer l'impact de la MEC sur l'efficacité de l'ECT, une autre expérience est réalisée en testant cette fois la bléomycine, qui a l'avantage d'avoir un effet sur la viabilité en seulement 2 à 3 jours. Cela permet de comparer la viabilité des sphéroïdes de PANC1 et des sphéroïdes en co-culture avec TGF- β après leur EPN avec ou sans bléomycine (EPN au bout de 7 jours de culture et viabilité 2 jours après). La quantification de la mortalité, révélée en épifluorescence par l'intensité rouge correspondant à l'IP, est présentée sur la figure 4.15,a. Ces résultats montrent, comme attendu, que les sphéroïdes soumis à une EPN en présence de bléomycine ont une mortalité significativement plus élevée que les sphéroïdes non traités, que ce soit pour les sphéroïdes monotypiques ou en co-culture. On constate aussi qu'il y a bien une faible différence de mortalité entre les contrôles bléomycine seule ou EPN seule et le contrôle non traité. De manière plus globale, si on compare la mortalité obtenue pour les deux types de sphéroïdes pour les groupes contrôles non traités, on constate qu'elle est significativement plus

élevée pour les sphéroïdes en co-culture. Cela signifie que si l'on regarde la part de mortalité induite par l'EPN en présence de bléomycine par rapport au contrôle non traité pour les deux types de sphéroïdes, il semble y avoir un effet plus important pour les sphéroïdes de PANC1 que pour les sphéroïdes en co-culture. Cela pourrait être lié à la présence de MEC, qui peut gêner l'accès de la bléomycine aux cellules. Cependant, les écart-types étant assez importants pour cette expérience, il semble nécessaire de la répéter afin de vérifier cette tendance.

Afin de déterminer si les différences de viabilité observées pourraient venir d'une différence de taille entre les deux types de sphéroïdes au moment de l'EPN, on s'intéresse également à la croissance des sphéroïdes étudiés dans cette expérience (figure 4.15,b). Pour cela, on mesure l'évolution de l'aire des sphéroïdes à partir des images réalisées au microscope optique ($\times 4$), grâce au logiciel ImageJ, puis on en déduit un diamètre apparent en approximant la section du sphéroïde observé à celle d'un cercle. On constate alors que la taille des deux types de sphéroïdes est similaire au bout de 7 jours de culture, au moment où l'EPN est réalisée pour les groupes correspondants, excepté pour le groupe contrôle EPN des sphéroïdes de PANC1, pour lequel la taille des sphéroïdes est plus importante, mais elle l'est également au jour 9 de culture. La taille des sphéroïdes de PANC1 et en co-culture n'étant pas différente au moment de l'EPN, il semble que les différences d'efficacité relative 2 jours après ECT ne soient pas liées à une différence d'efficacité d'EPN due à la taille des sphéroïdes. En effet, on aurait pu penser que si les sphéroïdes de PANC1 étaient plus petits au moment de l'EPN, celle-ci aurait été plus efficace que sur des sphéroïdes plus gros, puisque nous avons montré précédemment que l'efficacité pouvait être réduite au cœur des sphéroïdes (figure 3.12 du chapitre 3).

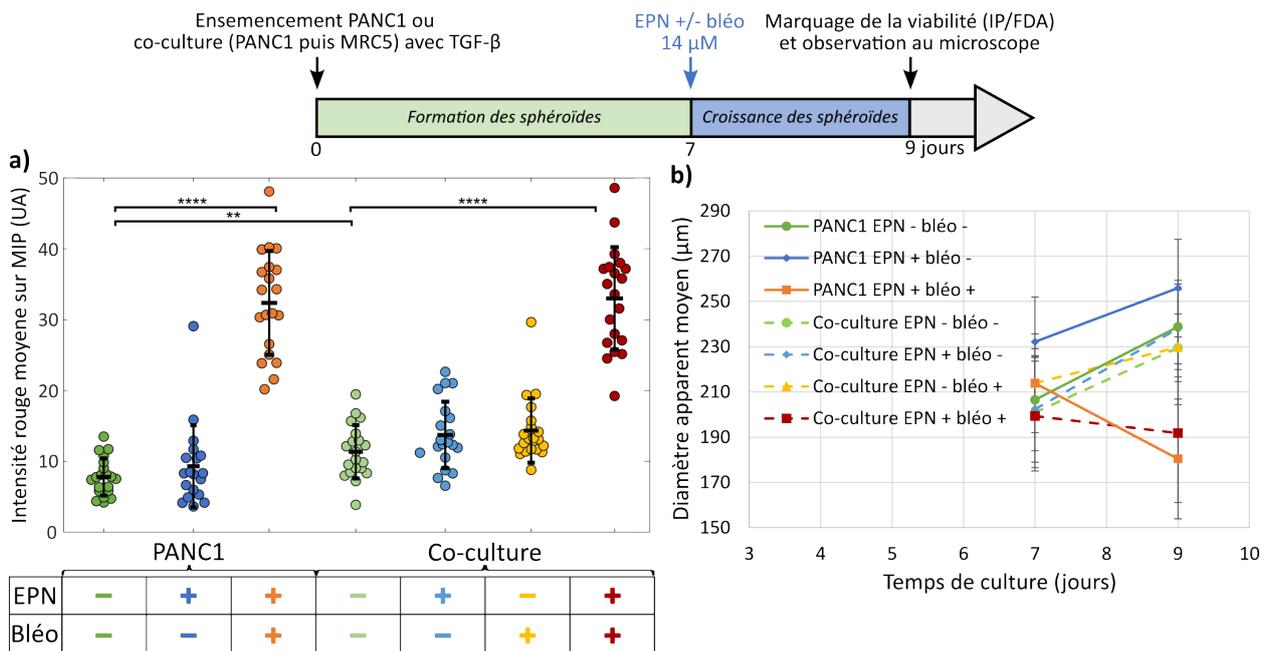


FIGURE 4.15 – Étude d'impact de l'EPN en présence de bléomycine sur la mortalité de sphéroïdes de PANC1 et de sphéroïdes en co-culture avec TGF- β à 7 jours de culture. (a) Quantification de la mortalité 2 jours après EPN avec ou sans bléomycine. (b) Diamètre apparent moyen des sphéroïdes étudiés à 7 et 9 jours de culture. Barre = Moyenne +/- écart-type standard, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, $N = 20$ sphéroïdes/condition, une expérience.

De plus, il est à noter que l'écart-type moyen observé pour le diamètre de ces sphéroïdes est de 22 μm en moyenne, soit une valeur supérieure à celle obtenue précédemment avec les sphéroïdes de cellules HT29 (voir partie 3.1.2), pour lesquels il était de 17 μm seulement. Cela confirme la plus faible régularité des sphéroïdes obtenus avec les cellules PANC1. On constate également qu'il ne semble pas y avoir de différence de croissance entre les sphéroïdes non traités

et ceux soumis uniquement à l'EPN, ce qui confirme la réversibilité des paramètres utilisés même pour les sphéroïdes en co-culture.

Ces résultats montrent aussi une diminution plus importante de la taille des sphéroïdes de cellules PANC1 traités avec EPN et bléomycine que celle observée pour les sphéroïdes en co-culture pour le même traitement (courbes orange et rouge), ce qui est cohérent avec la plus forte mortalité relative observée pour les sphéroïdes de PANC1 sur la figure 4.15,a.

Toutefois, ces résultats sont préliminaires, le principal inconvénient étant que l'étude de la prolifération n'est pas possible à un temps de culture aussi long, ce qui a contraint à utiliser le marquage de la viabilité pour étudier l'effet de l'EPN en présence d'anticancéreux sur les sphéroïdes en co-culture. Cependant, cette étude de la viabilité est elle aussi limitée à cause de la croissance des sphéroïdes, qui finissent par atteindre la taille des micropuits, ce qui modifie leur phénotype. Il faut donc envisager de trouver d'autres méthodes permettant d'étudier l'effet des anticancéreux ou bien d'augmenter la taille des micropuits à au moins 500 μm de diamètre, afin de pouvoir produire des sphéroïdes plus complexes et d'augmenter leur temps de suivi.

Conclusion

Le travail présenté dans ce chapitre s'est concentré sur une application concrète du micro-système dans le cadre d'une collaboration avec un praticien de l'AP-HP, le professeur Prat (projet InterCarnot Impulse). Les résultats présentés montrent que des sphéroïdes comportant un réseau de fibronectine dans leur MEC ont pu être produits grâce à la co-culture de cellules de cancer du pancréas (PANC1) et de fibroblastes (MRC5), en présence du facteur de croissance TGF- β , ce qui permet de se rapprocher de la MEC très dense observée *in vivo* pour les tumeurs pancréatiques.

Des tests d'EPN ont ensuite pu être réalisés, d'abord sur des sphéroïdes de cellules cancéreuses seulement, afin de déterminer les paramètres d'EPN efficace et réversible, en utilisant le même type de protocole que celui utilisé au chapitre 3 sur les sphéroïdes de cellules HT29, lors de la preuve d'efficacité du micro-système. Deux molécules anticancéreuses ont ensuite été testées, la bléomycine, classiquement utilisée en ECT, et la gemcitabine, classiquement utilisée en chimiothérapie du cancer du pancréas. Les résultats montrent que la gemcitabine a un effet quasi immédiat sur la prolifération mais à plus long terme (7 jours) sur la viabilité des cellules, contrairement à la bléomycine qui a un effet sur la viabilité dès 2 à 3 jours après traitement.

De plus, à l'inverse de la bléomycine, dont l'effet est visible uniquement en présence d'EPN, comme attendu, la gemcitabine entraîne quant à elle un effet même en l'absence de perméabilisation des cellules, même s'il est de moindre importance. Une étude de l'influence du temps d'incubation et de la concentration de la gemcitabine sur son efficacité sur la viabilité des sphéroïdes a notamment permis de mettre en avant que cela semble être l'accès de la gemcitabine aux cellules qui limite son efficacité, puisque sans EPN, la mortalité n'est pas modifiée en augmentant la concentration, voire est diminuée si on réduit le temps d'incubation, alors qu'en présence d'EPN, la mortalité est significativement plus élevée même pour une faible concentration. Cela permet de conclure que l'EPN permet d'améliorer l'efficacité de la gemcitabine, molécule déjà classiquement utilisée dans le traitement du cancer du pancréas, ce qui n'a été qu'assez peu étudié dans la littérature pour cet organe jusqu'à maintenant. Cela pourrait permettre de diminuer les doses afin de réduire les effets secondaires, voire d'avoir un meilleur effet antitumoral en conservant les mêmes doses, si les effets secondaires sont acceptables.

En réalisant des tests avec des concentrations de gemcitabine plus élevées que celle testée ici, il serait même possible de déterminer la concentration permettant le même effet sur la viabilité que lors de l'EPN en présence d'une faible concentration, afin de quantifier la réduction de concentration permise par l'EPN. De plus, les résultats présentés ici semblent montrer que

l'efficacité de l'EPN en présence d'anticancéreux est réduite par la présence de MEC dans les sphéroïdes en co-culture, dans des expériences préliminaires.

Toutefois, de plus amples recherches sont nécessaires pour confirmer cette tendance, et notamment en complexifiant davantage le modèle *in vitro* utilisé pour avoir une MEC plus dense, avec par exemple l'ajout de collagène de type I concentré sur les sphéroïdes en co-culture une fois formés, ou encore l'ajout d'autres types cellulaires présents dans le TME *in vivo*, comme les cellules endothéliales ou stellaires. Cela devrait permettre de mieux modéliser cette barrière constituée par le TME et observée *in vivo*, un élément clé à étudier puisque pouvoir passer cette barrière est crucial pour améliorer l'efficacité du traitement du cancer du pancréas.

Une autre piste intéressante à exploiter, grâce à la collaboration avec l'AP-HP, serait d'étudier des sphéroïdes produits à partir de cellules primaires ou de patients voire directement des coupes de morceaux de tumeurs pancréatiques maintenues en culture pendant quelques jours. Il faudrait également envisager d'ajouter des cellules immunitaires dans les sphéroïdes produits, comme cela a été fait récemment par [Zhou et al., 2023] dans leur modèle dérivé de cellules de patients, afin d'aller vers une étude de l'intérêt de l'EPN pour l'efficacité de la combinaison de chimiothérapie et d'immunothérapie, notamment en testant les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires comme le fait cette équipe, puisque des essais cliniques ont montré que ce type de traitement combiné était prometteur [Padrón et al., 2022].

CHAPITRE 5

VERS UNE ÉTUDE MULTIMODALE DES SPHÉROÏDES : L'APPORT DE LA MESURE DE BIO-IMPÉDANCE

Sommaire

Introduction	101
5.1 Démonstration de l'adaptabilité du microsysteme à la mesure d'impédance	101
5.1.1 Protocole de mesure : importance des paramètres expérimentaux . . .	101
5.1.2 Amélioration de la sensibilité de la mesure : utilisation d'électrodes interdigitées	103
5.1.2.1 Configuration d'électrode utilisée	103
5.1.2.2 Simulation COMSOL de la mesure d'impédance	103
5.1.2.3 Vers le couplage avec l'électroporation	104
5.1.2.4 Micro-fabrication des électrodes	107
5.1.3 Caractérisation du microsysteme pour la mesure d'impédance	108
5.1.3.1 Évaluation de la répétabilité liée à l'injection de milieu . . .	108
5.1.3.2 Évaluation de la répétabilité liée aux branchements	111
5.1.3.3 Évaluation de la répétabilité liée au montage	111
5.1.3.4 Stabilité avec la température	112
5.1.3.5 Mesure de conductivité	112
5.2 Mesures sur modèle simplifié : cellules en suspension	114
5.2.1 Détermination du protocole de mesure	114
5.2.2 Influence de la configuration d'électrodes	115
5.2.3 Influence de la conductivité du milieu	116
5.3 Culture de sphéroïdes sous perfusion : application au suivi de croissance par impédance	121
5.3.1 Mise au point du protocole de culture sous perfusion	121
5.3.2 Suivi de croissance de sphéroïdes : intérêt d'une mesure différentielle .	123
5.3.3 Caractérisation de l'effet de la perméabilisation des sphéroïdes sur la mesure d'impédance	126
5.4 Étude de l'effet de l'électroporation sur les sphéroïdes par suivi d'impédance	129
Conclusion	132

Introduction

Les chapitres précédents ont démontré la fonctionnalité du microsystème en tant que plateforme de production de sphéroïdes de plus en plus complexes et de test de traitements d'électrochimiothérapie. Cependant, le suivi des sphéroïdes par méthode optique au cours de leur croissance représente une contrainte dans le choix des matériaux pour les électrodes, puisqu'ils doivent alors être transparents. Comme cela a été démontré dans la partie 1.5.4, les matériaux conducteurs transparents tels que l'ITO utilisé ici peuvent ne pas être résistants aux réactions électrochimiques, et il faut alors employer des impulsions bipolaires afin d'éviter ces réactions. Toutefois, cela limite le champ d'application. En effet, pour aller vers des applications telles que l'électrotransfert de gènes (ETG), il faut pouvoir appliquer des impulsions unipolaires afin d'augmenter l'efficacité de la transfection, car pour des molécules volumineuses comme les plasmides, le mécanisme d'internalisation dans les cellules n'est pas le même que pour des petites molécules (voir partie 1.3.2.2) et nécessite notamment l'aide de forces électrophorétiques, apparaissant lors de l'application d'impulsions unipolaires. Pour cela, des matériaux comme l'acier inoxydable, le platine ou le titane sont préférables, car ils résistent mieux aux réactions électrochimiques, mais la transparence est alors perdue. Des méthodes de suivi autres que les méthodes optiques peuvent alors être nécessaires, et comme le microsystème permet déjà de réaliser des mesures électriques, les travaux réalisés dans cette thèse ont été axés sur l'adaptation du dispositif à la mesure in situ et en temps réel de la bio-impédance électrique.

Ce chapitre a pour objectif de détailler ces adaptations, mises en place suite au constat de l'importance de certains paramètres expérimentaux sur la précision de la mesure, avant de présenter les résultats obtenus d'abord sur modèle simplifié, les cellules en suspension, puis sur les sphéroïdes.

La détermination des paramètres du protocole impactant la sensibilité de la mesure a fait l'objet d'un stage de master que j'ai co-encadré durant cette thèse, réalisé par Théo Le Berre. Ce stage a également permis de dégager les problématiques inhérentes à la mesure d'impédance sur les cellules en suspensions, avant d'aborder au cours de cette thèse la mesure sur sphéroïdes.

5.1 Démonstration de l'adaptabilité du microsystème à la mesure d'impédance

5.1.1 Protocole de mesure : importance des paramètres expérimentaux

L'impédance a été mesurée à l'aide d'un analyseur d'impédance de précision (4294A, Agilent Technologies) connecté au microsystème par l'intermédiaire du circuit imprimé. Un logiciel a été codé en Java par un chercheur du laboratoire Ampère, Olivier Fabrègue, afin de piloter l'analyseur d'impédance, permettant d'automatiser la mesure et la sauvegarde des spectres avec les paramètres choisis (gamme de fréquences, nombre de spectres, temps entre les mesures...). En ce qui concerne l'amplitude du signal de mesure, des équipes ont démontré qu'au-delà de 500 mV, l'application du faible champ sinusoïdal permettant la mesure pouvait entraîner des non linéarités, surtout en basse fréquence (< 1000 Hz) [Das et al., 2014, Olariu et al., 2022]. On se place donc ici juste à ce seuil de 500 mV pour éviter ces distorsions tout en ayant une bonne sensibilité.

Une première caractérisation a été effectuée en utilisant des tampons salins de chlorure de potassium (KCl) dont la conductivité a été mesurée avec le conductimètre S230 (Mettler-

Toledo). Ces premiers tests, réalisés durant le stage de Théo Le Berre, ont permis de mettre en avant l'importance des paramètres expérimentaux sur la mesure.

Le premier paramètre à contrôler est la température, puisque celle-ci joue directement sur la conductivité d'une solution, avec une augmentation de la conductivité de l'ordre de 2% par °C [Schwan, 1957]. Une enceinte fermée permettant le contrôle de la température a été achetée afin de faire les mesures à température contrôlée (cuveuse Borotto Lumia 8). La figure 5.1,a met en avant cette influence de la température en montrant l'évolution du module de l'impédance dans le microsystème avec des électrodes pleines plaques parallèles en ITO et un milieu de conductivité 0.03 S/m. On constate que le temps de chauffe, en partant de la température ambiante (22°C) pour atteindre les 37°C de l'enceinte chauffée, est d'environ 8 minutes. Il faudra donc prendre en compte ce temps par la suite.

Un autre paramètre important pouvant influencer les mesures est la présence de bulles d'air dans la chambre. En effet, ces bulles d'air changent localement la conductivité et entraînent un biais sur la mesure d'impédance, comme on peut le voir sur la figure 5.1,b. Par la suite, un contrôle visuel sera systématiquement effectué afin de ne pas prendre en compte les mesures pour lesquelles des bulles sont présentes dans la chambre. De plus, afin de prévenir ce phénomène, la forme du joint en silicone scellant la chambre microfluidique a été modifiée. En effet, au lieu d'une forme ovale simple, une forme de goulot d'étranglement a été donnée au joint au niveau du capillaire de sortie afin de favoriser l'évacuation des bulles lorsqu'elles se forment dans la chambre. Il faut également bien sûr veiller à retirer tout l'air de la seringue permettant l'injection du milieu avant de l'utiliser.

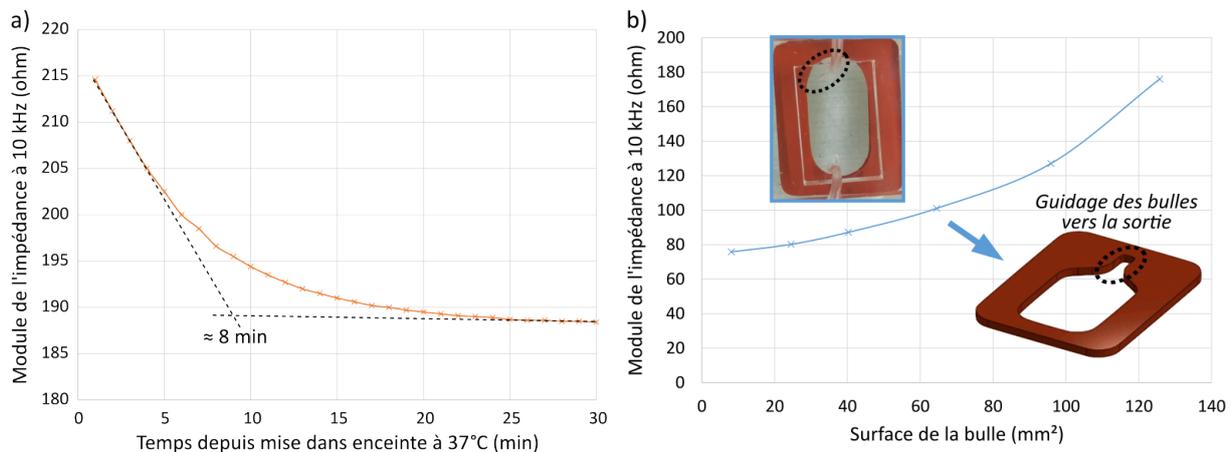


FIGURE 5.1 – Importance des paramètres expérimentaux sur la mesure d'impédance. (a) Évolution du module de l'impédance à 10 kHz durant une montée en température du système entre 22°C et 37°C. (b) Évolution du module de l'impédance à 10 kHz en fonction de la surface des bulles d'air dans la chambre.

Enfin, il faut également veiller à utiliser toujours le même protocole de montage du microsystème, afin de ne pas changer la position du joint par rapport aux électrodes et le serrage des écrous assurant l'étanchéité et le contact électrique. Ce dernier n'étant pas réalisé à un couple fixé, l'impact du montage sur la répétabilité de la mesure est étudié par la suite. Pour les contacts électriques, le choix s'est porté sur des contacts à ressort, en or pour ses bonnes propriétés électriques, ce qui permet une modulation de leur hauteur lors du serrage, assurant ainsi un bon contact grâce à leur mise en tension mécanique. La configuration des contacts électriques est détaillée sur la figure 3.4 du chapitre 3.

5.1.2 Amélioration de la sensibilité de la mesure : utilisation d'électrodes interdigitées

Dans la première version du microsystème, utilisée dans les chapitres 3 et 4, la configuration des électrodes était deux électrodes parallèles pleines plaques recouvertes d'une fine couche d'ITO (134 nm), afin de pouvoir électroporer les sphéroïdes avec un champ uniforme tout en gardant la transparence. Ici, le paradigme a changé puisque nous voulons mesurer l'impédance électrique d'échantillons biologiques. De fait, la conception et le matériau des électrodes doivent être étudiés pour obtenir une mesure précise et reproductible [Gerasimenko et al., 2020].

5.1.2.1 Configuration d'électrode utilisée

L'une des configurations les plus utilisées pour mesurer l'impédance sur des monocouches et des suspensions cellulaires sont les électrodes interdigitées ("InterDigitated Electrodes" en anglais ou IDE) [Heileman et al., 2013], dont le principe a été présenté dans la partie 2.3.2.2.

Avec cette configuration (figure 5.2,a), un champ électrique apparaît dans la région au-dessus et entre les doigts des peignes interdigités, créant une zone de sensibilité près des électrodes dont la portée dépend de la géométrie des IDE. En effet, la géométrie des IDE (largeur w , longueur L , espace entre les doigts des peignes e et nombre d'électrodes N) peut avoir un impact sur la répartition du champ électrique et principalement sur la hauteur de la zone de sensibilité au-dessus des électrodes.

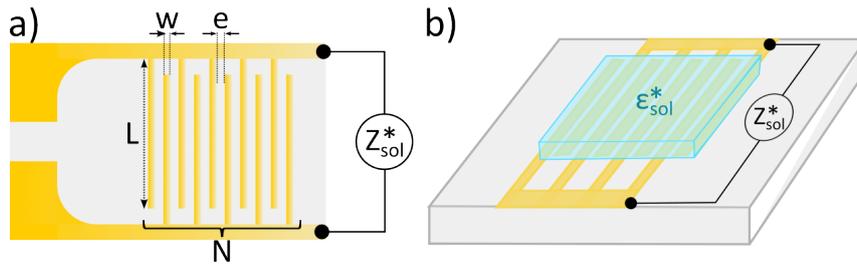


FIGURE 5.2 – Représentation schématique des électrodes interdigitées en 2D (a) et principe en 3D (b).

La géométrie des IDE permet notamment de déterminer et optimiser la constante d'électrode K_{IDE} qui relie l'impédance aux propriétés électriques de la solution étudiée et à la pulsation du signal appliqué :

$$Z_{sol}^* = \frac{K_{IDE}}{j\omega\epsilon_{sol}^*}, \quad (5.1)$$

où Z_{sol}^* est l'impédance complexe de la solution, ω la pulsation, et ϵ_{sol}^* sa permittivité complexe (figure 5.2,b).

La méthode de détermination de cette constante et une étude de son optimisation, pour rendre la mesure plus sensible à la détection d'échantillons biologiques, sont détaillées dans [Thanh-Tuan, 2015]. À partir des paramètres géométriques des IDE et à l'aide du logiciel Matlab pour approximer l'intégrale elliptique apparaissant dans l'équation de cette constante (fonction "integral" de Matlab, réalisant une intégration numérique reposant sur une méthode de quadrature adaptative), il est possible d'avoir une approximation numérique de la valeur théorique de cette constante. Le détail du calcul et le code sont présentés dans l'annexe L.

5.1.2.2 Simulation COMSOL de la mesure d'impédance

Les IDE ont été modélisées sur le logiciel COMSOL Multiphysics par une couche de 100 nm d'épaisseur ayant les propriétés de l'or en utilisant la même géométrie que les masques utilisés

pour fabriquer les électrodes. Un bloc de 1 mm de haut et de 2 cm² de surface représentant la chambre microfluidique est positionné en contact avec les IDE, avec les propriétés du tampon conducteur utilisé pour effectuer les mesures d'impédance, tampon Hépès de conductivité 0.03 S/m et de permittivité relative 78, utilisé précédemment pour l'EPN, de composition décrite dans la partie 3.2.4. Les couches ont été modélisées avec la physique "Electric current in layered shells", avec isolation électrique sur les bords, et le bloc a été modélisé avec "Electric current", avec conservation du courant sur les frontières en contact avec les électrodes et isolation électrique sur les autres frontières. Pour la modélisation de la mesure d'impédance, la tension appliquée aux IDE était de 1 V pour un côté des peignes et de -1 V pour l'autre (figure 5.3,a).

Les résultats de la modélisation COMSOL (figure 5.3,b), permettent de montrer qu'un champ électrique (représenté par les flèches rouges) se développe jusqu'à 400 μm au-dessus des IDE et traverse la zone où se trouvent les sphéroïdes (sphères noires).

5.1.2.3 Vers le couplage avec l'électroporation

L'objectif final étant de combiner l'EPN et la mesure d'impédance, il est nécessaire de trouver un moyen d'utiliser la configuration des IDE afin d'obtenir un champ électrique homogène dans la zone où se trouvent les sphéroïdes. La configuration utilisée pour cela consiste à court-circuiter les IDE et à placer une contre-électrode parallèle (figure 5.3,c), pour se rapprocher de la configuration pleine plaque parallèle employée précédemment, qui donnait un champ homogène. Afin de garder la transparence dans un premier temps, cette contre-électrode est modélisée par une couche de 134 nm ayant les propriétés de l'ITO. Pour la modélisation de l'EPN, la tension appliquée est de 100 V pour les IDE court-circuitées et de 0 V pour la contre-électrode.

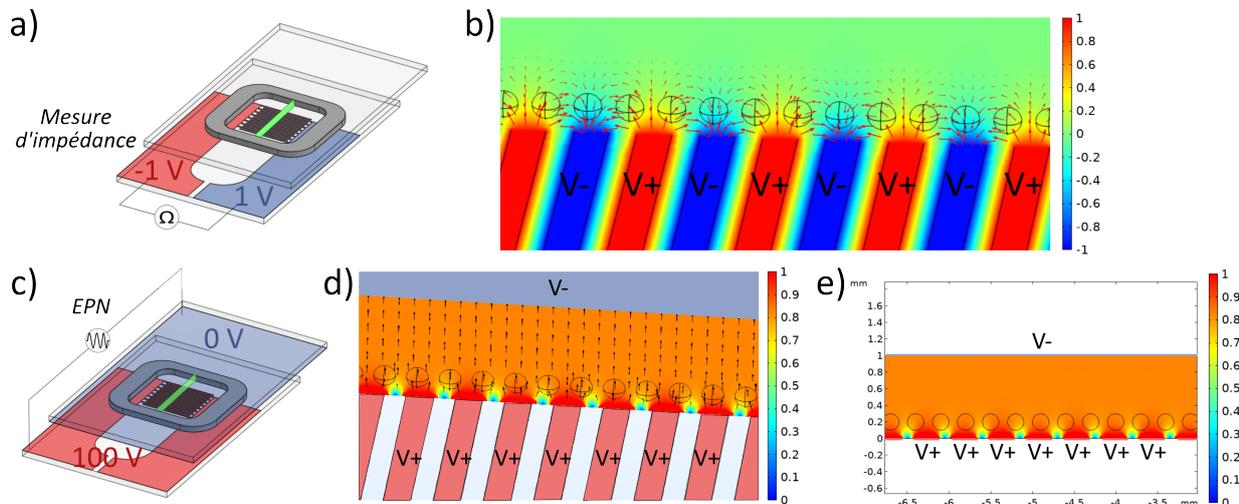


FIGURE 5.3 – Simulation du champ électrique pour les configurations de spectroscopie d'impédance et d'électroporation. (a) Chambre microfluidique en configuration de mesure d'impédance avec des électrodes interdigitées coplanaires (IDE) de 250 μm de largeur espacées de 200 μm . Bleu = tension négative. Rouge = tension positive. Vert = plan de coupe pour les simulations. (b) Simulation COMSOL du potentiel dans la chambre pendant une mesure d'impédance. Flèche = direction des lignes de champ électrique. Échelle de couleur = potentiel appliqué (V). (d) Chambre microfluidique en configuration d'électroporation. (e) Simulation COMSOL de la distribution du champ électrique pour un potentiel appliqué de 100 V. Flèche = ligne de champ. Échelle de couleur = norme du champ électrique normalisée par rapport au maximum. (f) Coupe verticale de la distribution du champ électrique normalisé. La position des sphéroïdes (non simulés) dans la chambre est représentée par des sphères/cercles noirs de 200 μm de diamètre.

Tout comme c'était le cas précédemment, il faut toutefois noter que les sphéroïdes ne sont

ici pas simulés. Il pourrait être intéressant de rajouter des inclusions sphériques les représentant dans le modèle, mais les propriétés de ces inclusions ne sont pas aisées à déterminer. La distribution réelle du champ est en réalité influencée par la présence des sphéroïdes, puisque leurs propriétés électriques sont différentes de celle du milieu extérieur.

Les résultats de cette simulation (figure 5.3,d et e) montrent l'apparition d'effets de bords, avec un champ maximal au-dessus des IDE et minimal entre les IDE. Cependant, lorsqu'on s'éloigne des électrodes, le champ devient plus homogène, comme le montrent les lignes de champ représentées par des flèches noires. Cette distribution du champ électrique dépend des paramètres géométriques des IDE : plus les IDE sont larges, plus il faut être à une hauteur importante au-dessus des électrodes pour avoir un champ homogène, et plus les IDE sont éloignées, plus l'effet de bord entre les IDE est important. Il faut donc réaliser une étude paramétrique sur les paramètres des IDE afin de choisir une géométrie donnant un bon compromis entre la mesure d'impédance et l'homogénéité du champ lors de l'EPN.

Cette étude a été réalisée, en partant des simulations COMSOL présentées précédemment. Pour cela, on fait varier la largeur des électrodes entre 200 et 500 μm , par pas de 50 μm , et la distance inter-électrodes entre 150 μm et w , la largeur des électrodes, par pas de 50 μm également. En effet, un écart entre les peignes des IDE de moins de 150 μm voire même 200 μm est difficilement réalisable en pratique dans les conditions expérimentales disponibles pour ces travaux, car cela donne lieu à des courts-circuits liés à un manque de précision pour la lithographie (manipulation en salle grise). Pour descendre à des distances inter-électrodes plus faibles, il faudrait manipuler en salle blanche afin de limiter la présence de poussière.

Dans un premier temps, la simulation est paramétrée dans la configuration de mesure d'impédance (figure 5.3,a) en mettant deux terminaux à + ou - 1 V et en affichant l'impédance entre ces deux terminaux, résultant du calcul du rapport des tensions et courants obtenus avec la simulation. Deux simulations sont comparées : la première avec une conductivité de 0.03 S/m et une permittivité de 78 pour le milieu situé dans le bloc au-dessus des électrodes et représentant la chambre microfluidique, et une deuxième avec comme conductivité et permittivité les courbes extraites du logiciel MyDEP pour une solution de milieu 0.03 S/m avec 2% en fraction volumique de cellules HT29. Ce logiciel, développé au cours de la thèse d'un ancien doctorant de l'équipe [Cottet, Fabregue et al., 2019], permet de tracer la conductivité d'un mélange de cellules et milieu de conductivité donnée en fonction des propriétés électriques des cellules et de la solution, en se basant sur le modèle de Maxwell-Wagner (voir équation 2.9). Dans la base de données du logiciel, on peut trouver les propriétés électriques des cellules HT29 qui ont été déterminées par [L. Wu et al., 2012] dans des milieux de conductivité proche de celle du milieu Hépès. On obtient alors deux valeurs d'impédance pour la fréquence étudiée, ici 10 kHz pour se situer sur le plateau résistif. On réalise la différence de ces deux valeurs, car l'objectif est de déterminer la géométrie d'électrode permettant de détecter de la manière la plus performante la présence des cellules. Les résultats sont présentés sur la figure 5.4,a. On constate que les écarts d'impédance modélisés sont assez faibles et ne varient pas beaucoup en fonction de la géométrie, même si des électrodes larges et espacées semblent être une configuration plus appropriée pour avoir un écart d'impédance avec/sans cellules plus important. En effet, d'après le modèle de Maxwell-Wagner, les variations de conductivité liées à la présence de cellules en faible fraction volumique dans un milieu n'entraînent que de faibles variations d'impédance, même si nous verrons plus tard dans ce chapitre que ce n'est pas ce qui est observé expérimentalement et de manière répétable. Il semble donc difficile de dégager de cette simulation une géométrie optimale permettant une mesure d'impédance plus sensible que les autres.

En ce qui concerne la configuration d'EPN (figure 5.3,c), les valeurs du champ généré lors de l'application d'une différence de potentiel de 100 V sont calculées le long d'une droite située dans un plan horizontal au niveau de la hauteur où sont situés les sphéroïdes (0.2 mm au-dessus

des IDE), droite représentée par la double flèche noire sur le schéma de la figure 5.4,b. Cela permet de se placer à la hauteur des sphéroïdes et dans une zone de la surface modélisée éloignée des bords, pour lesquels les erreurs sont surévaluées à cause des effets de bords. On compare alors les écarts-types relatifs de ces valeurs de champ pour les différentes géométries testées. La figure 5.4,b montre que les géométries permettant les plus faibles variations de champ sont celles pour lesquelles la distance inter-électrodes est faible, ce qui est cohérent puisque la géométrie se rapproche alors de deux plaques parallèles.

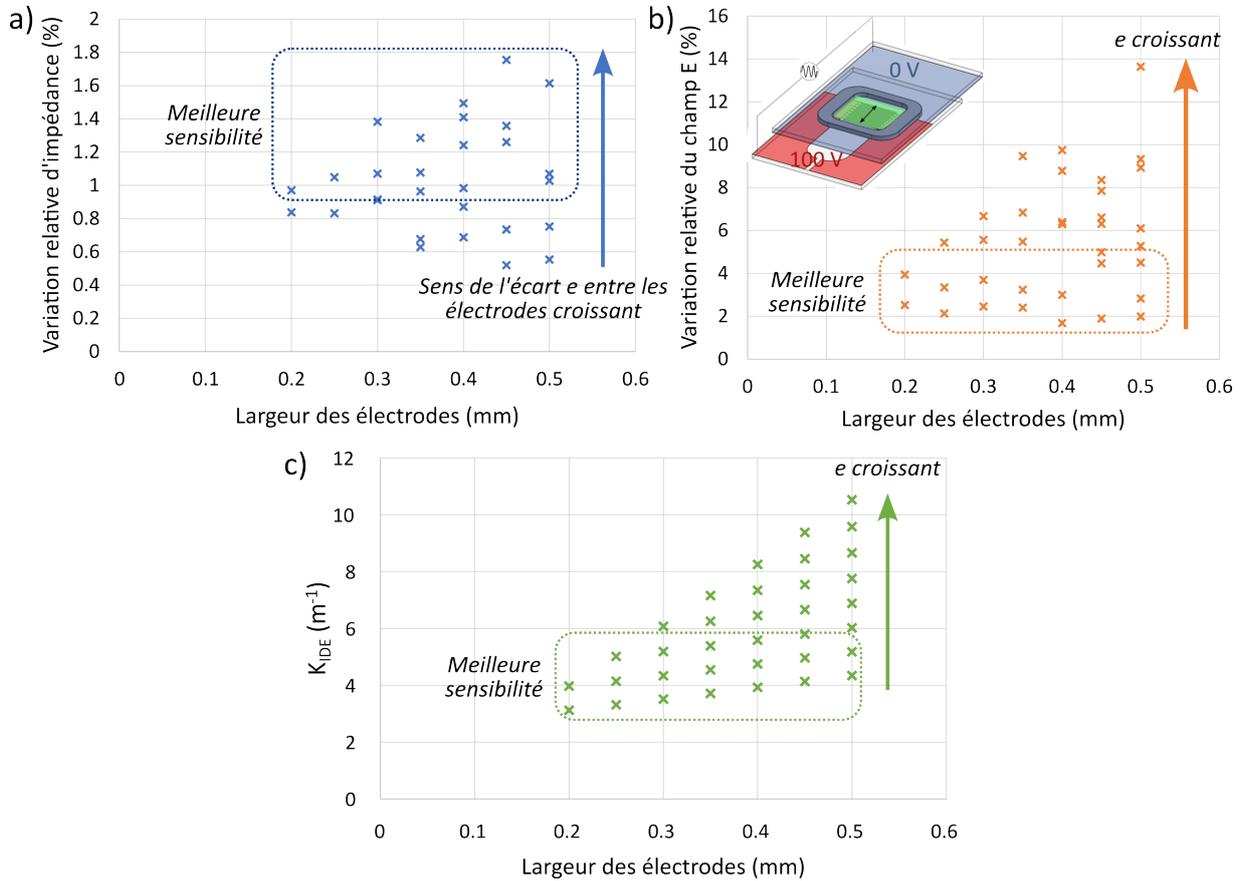


FIGURE 5.4 – Étude paramétrique de la géométrie des IDE pour des largeurs allant de 200 à 500 μm . (a) Variation relative de l'impédance modélisée sur COMSOL entre un milieu sans cellules et un milieu avec 2% de cellules HT29 en fonction de la géométrie. (b) Variation relative de la norme du champ électrique E modélisé pour la configuration d'EPN sur une droite (double flèche noire) située dans un plan horizontal à la hauteur des sphéroïdes (plan vert) en fonction de la géométrie. (c) Constante géométrique des IDE en fonction de la géométrie. Cadre en pointillés = zone de meilleure sensibilité, Flèche = sens de l'écart inter-électrodes croissant.

Il est également pertinent de s'intéresser à la valeur de la constante géométrique des électrodes K_{IDE} , dont la méthode de calcul est détaillée dans la partie 5.1.2.1 complétée par l'annexe L. En effet, d'après [Thanh-Tuan et al., 2014], la capacité d'interface électrode-électrolyte est inversement proportionnelle à K_{IDE} . Ainsi, minimiser cette constante permet de réduire l'influence de la polarisation des électrodes et donc de réduire les erreurs de mesures en basse fréquence. La figure 5.4,c montre que cette constante est la plus faible lorsque la distance inter-électrodes est petite.

D'après cette étude, il apparaît donc qu'une géométrie convenable pour les applications visées de mesure d'impédance et d'EPN consiste à utiliser un écart inter-électrode faible, entre 150 et 200 μm , peu importe la largeur des électrodes, afin de permettre une meilleure homogénéité du champ et une constante géométrique d'électrode faible, sans vraiment prendre en

compte le critère de la mesure d'impédance puisque ses variations en présence de cellules sont faibles dans tous les cas en ce qui concerne la modélisation.

Par la suite, deux géométries d'IDE seront utilisées, l'une pour les mesures sur suspensions ($w = 200 \mu\text{m}$, $e = 200 \mu\text{m}$, $L = 19 \text{ mm}$, $N = 36$), appelée IDE-200, et l'autre pour les mesures sur sphéroïdes ($w = 250 \mu\text{m}$, $e = 200 \mu\text{m}$, $L = 19 \text{ mm}$, $N = 28$), appelée IDE-250. Cette dernière est composée de deux zones de mesure, permettant de réaliser une mesure de la variation relative entre une chambre contrôle sans sphéroïdes et une chambre contenant les sphéroïdes, ce qui est justifié plus tard dans la partie 5.1.3. Ces données sur la géométrie des IDE permettront de calculer la constante de géométrie des électrodes K_{IDE} (équation 5.1) avec la méthode détaillée dans l'annexe L.

5.1.2.4 Micro-fabrication des électrodes

Le choix du matériau pour les IDE s'est porté sur l'or d'une part pour sa conductivité supérieure à celle de l'ITO ($0.7 \times 10^6 \text{ S/m}$ pour l'ITO contre $45 \times 10^6 \text{ S/m}$ pour l'or), qui permet un meilleur contact et une plus faible chute de tension dans les IDE, et d'autre part car le protocole de gravure de l'ITO pour la fabrication des IDE ne permet pas d'obtenir des peignes bien définis et de la largeur voulue (figure 5.5,a) dans notre cas.

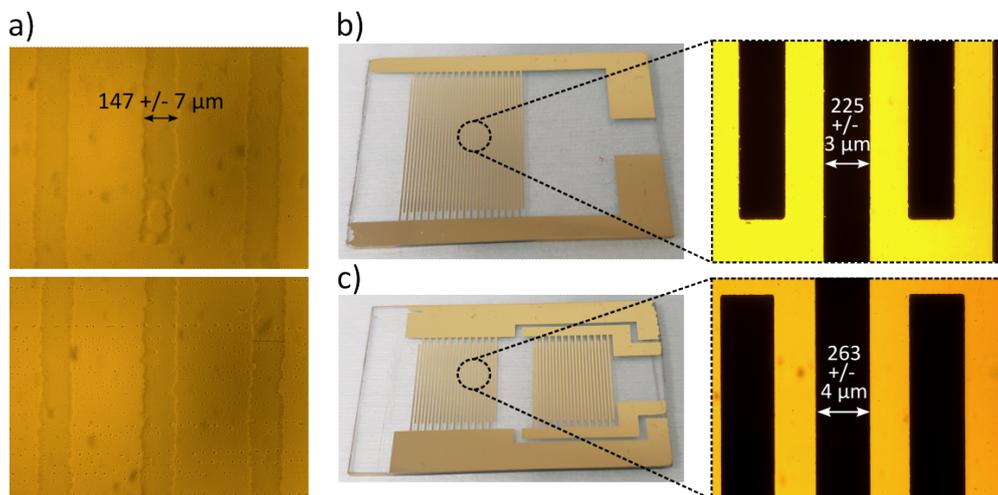


FIGURE 5.5 – (a) Image au microscope optique ($\times 4$) des IDE en ITO pour un masque avec une largeur de $250 \mu\text{m}$ et un écart de $250 \mu\text{m}$. (b) Photo et image au microscope optique ($\times 4$) des IDE en or utilisées pour les mesures sur suspensions de cellules (IDE-200). (c) Photo et image au microscope optique ($\times 4$) des IDE en or utilisées pour les mesures sur sphéroïdes (IDE-250), avec deux zones pour réaliser une mesure relative.

Les électrodes utilisées pour les mesures d'impédance sont des électrodes en or à motifs interdigités (IDE) obtenues par photolithographie et par une technique de gravure humide, dont les principes sont présentés dans l'annexe A. La lame de verre de $40 \times 25 \times 1.1 \text{ mm}$ recouverte de 100 nm d'or sur 50 nm de chrome (Neyco) est d'abord protégée avec la résine photosensible AZ 5214 E (Microchemicals) déposée par spin-coating, et un photomasque imprimé sur film transparent (parties opaques correspondant au motif souhaité) est utilisé pour protéger le motif souhaité de l'irradiation par la lumière UV. La résine photosensible sensibilisée par la lumière UV est ensuite enlevée avec le développeur AZ726MIF (Merck), selon le protocole donné par le fournisseur. La partie non protégée de la couche métallique est gravée avec du gold etchant (30 s , Sigma) pour la couche d'or et du chromimum etchant (5 s , Sigma) pour la couche d'accroche en chrome, pour obtenir le motif désiré. La dernière étape consiste à retirer le masque de résine présent sur la couche métallique en utilisant un remover ou de l'acétone.

Afin d'avoir une meilleure idée de la géométrie réelle des électrodes, celles-ci sont caractérisées par des mesures optiques. Pour cela, plusieurs images sont réalisées pour chaque IDE, afin de mesurer la largeur de 10 peignes avec le logiciel ImageJ, permettant de calculer la largeur moyenne et l'écart-type. On constate qualitativement que les peignes des IDE sont bien définis (figure 5.5,b et c), en comparaison avec ce qui avait été obtenu pour l'ITO (figure 5.5,a). Cependant la largeur des peignes est supérieure à celle attendue par rapport au dessin du masque. Une caractérisation des masques a révélé que cet écart entre les dimensions expérimentales et théoriques des peignes venait en réalité du masque, comme le montrent les mesures dans le tableau 5.1.

	Électrode	
	Largeur moyenne (μm)	Ecart-type (μm)
IDE-200	225	3
IDE-250	263	4
	Masque	
	Largeur moyenne (μm)	Ecart-type (μm)
IDE-200	223	2
IDE-250	271	5

TABLE 5.1– Caractérisation optique de la géométrie des électrodes interdigitées en or et des masques servant à les fabriquer. $N = 10$ peignes/conditions.

Il est alors possible de calculer les valeurs de K_{IDE} pour ces deux électrodes en or, à partir de la relation donnée par [Thanh-Tuan, 2015], en prenant la largeur et l'espacement des peignes mesurés sur les électrodes fabriquées, ainsi que le nombre de peignes et leur longueur dans la zone de mesure, définie par le joint en silicone formant la chambre microfluidique. On trouve des valeurs de 4.97 m^{-1} pour les IDE-200 et 4.44 m^{-1} pour les IDE-250.

5.1.3 Caractérisation du microsystème pour la mesure d'impédance

Les électrodes de mesure ayant été conçues, fabriquées et caractérisées, il est nécessaire d'évaluer les performances du microsystème dans le cadre de la mesure d'impédance avec ces électrodes, afin de pouvoir prendre en compte les incertitudes liées au protocole et au système dans l'interprétation des résultats obtenus.

Cette caractérisation est réalisée sur le microsystème en configuration double chambre, puisqu'il s'agit de celui utilisé pour les applications de suivi de croissance de sphéroïdes visées, mais il faut savoir que des résultats similaires ont été obtenus lors de la caractérisation du microsystème en configuration simple chambre.

5.1.3.1 Évaluation de la répétabilité liée à l'injection de milieu

Comme la croissance de sphéroïdes dans le système implique un renouvellement du milieu de culture (consommé par les cellules), une étude de la répétabilité permet de rendre compte de l'impact de l'injection de milieu sur la précision de la mesure. Pour cela, on réalise 10 injections du volume de la chambre (0.2 mL) d'un milieu de conductivité constante par chambre, en mesurant à chaque fois l'impédance immédiatement après injection sur tout le spectre en fréquence (40 Hz - 100 MHz). Cette étude est réalisée pour deux tampons KCl de conductivités différentes, $343 \mu\text{S}/\text{cm}$ soit $0.0343 \text{ S}/\text{m}$ (figure 5.6) et $12.5 \text{ mS}/\text{cm}$ soit $1.25 \text{ S}/\text{m}$ (figure 5.7), respectivement dans les gammes de conductivités du milieu Hépès et du milieu de culture.

L'allure générale du module (figures 5.6,a et 5.7,a) et de la phase (figures 5.6,b et 5.7,b) de l'impédance montre l'influence en basse fréquence (< 1000 Hz) de la double couche ionique qui se forme à la surface des électrodes, qui a un comportement globalement capacitif (phase proche de -90°). Il y a ensuite un plateau résistif (phase proche de 0°) correspondant à la résistance de l'électrolyte, sur une plage plus étendue en fréquence (10 kHz - 1 MHz) pour l'électrolyte de conductivité faible (figure 5.6,b) que pour l'électrolyte de conductivité élevée (100 kHz - 1 MHz, figure 5.7,b). Cela peut être attribué au fait que la double couche ionique a un impact sur une plus grande plage de fréquences pour des solutions de conductivités élevées (ordre de grandeur de 1 S/m).

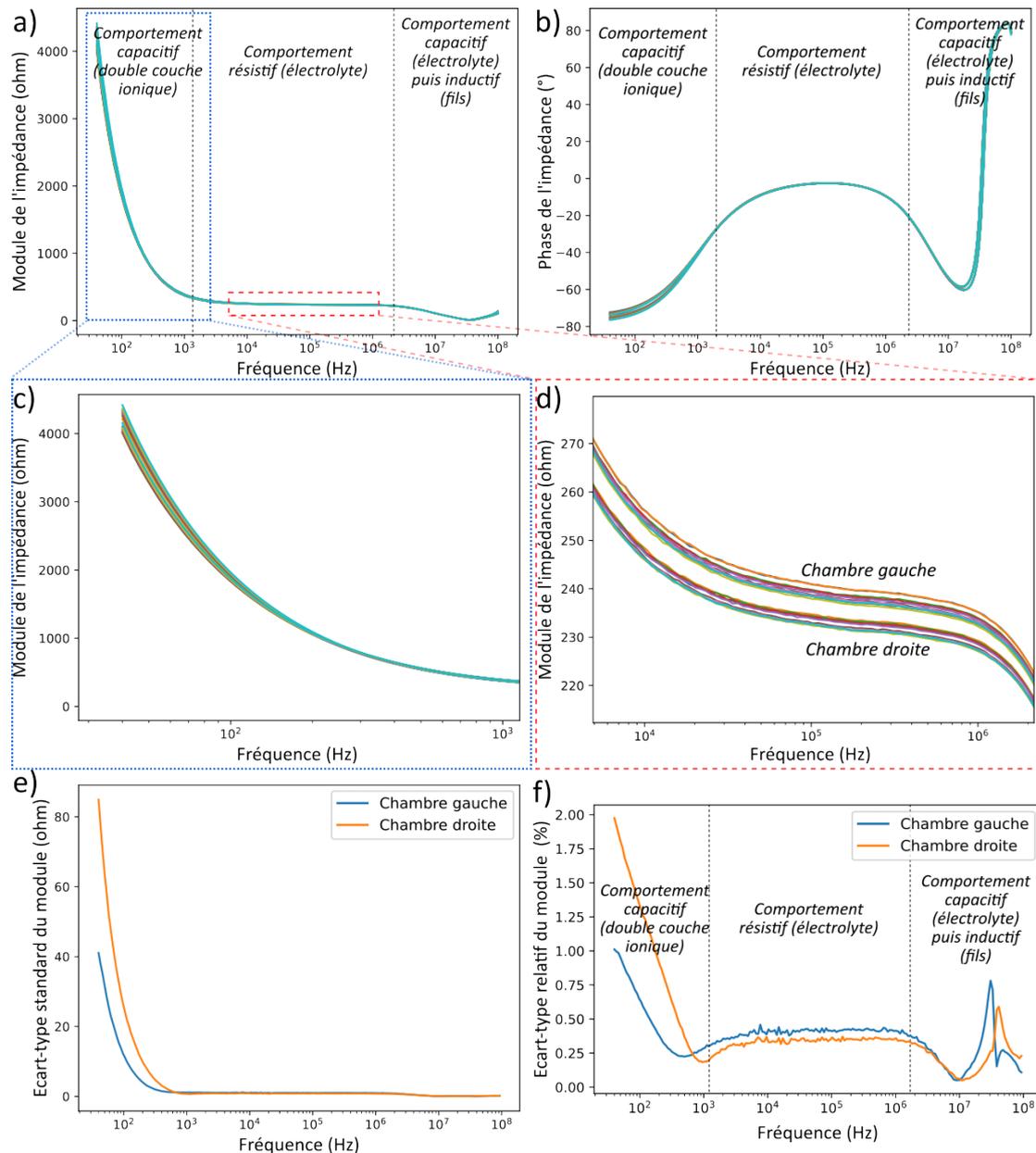


FIGURE 5.6 – Étude de la répétabilité des mesures dans le microsysteme avec IDE en or double chambre (IDE-250) durant l'injection de milieu de conductivité 0.0343 S/m. (a) Module de l'impédance. (b) Phase de l'impédance. (c) Zoom sur la partie basse fréquence du module de l'impédance. (d) Zoom sur le plateau résistif du module de l'impédance. (e) Écart-type standard du module de l'impédance. (f) Écart-type relatif du module de l'impédance. $N = 10$ mesures/chambre.

Plus haut en fréquence, on distingue ensuite l'influence du comportement capacitif de l'électrolyte, mais uniquement pour le milieu de faible conductivité. On observe également le début d'un effet inductif sans doute lié aux fils encore plus haut en fréquence. Cependant pour ces valeurs de fréquences élevées (> 10 MHz), nous ne prendrons pas en compte les mesures car le protocole ne permet pas d'en assurer la fiabilité.

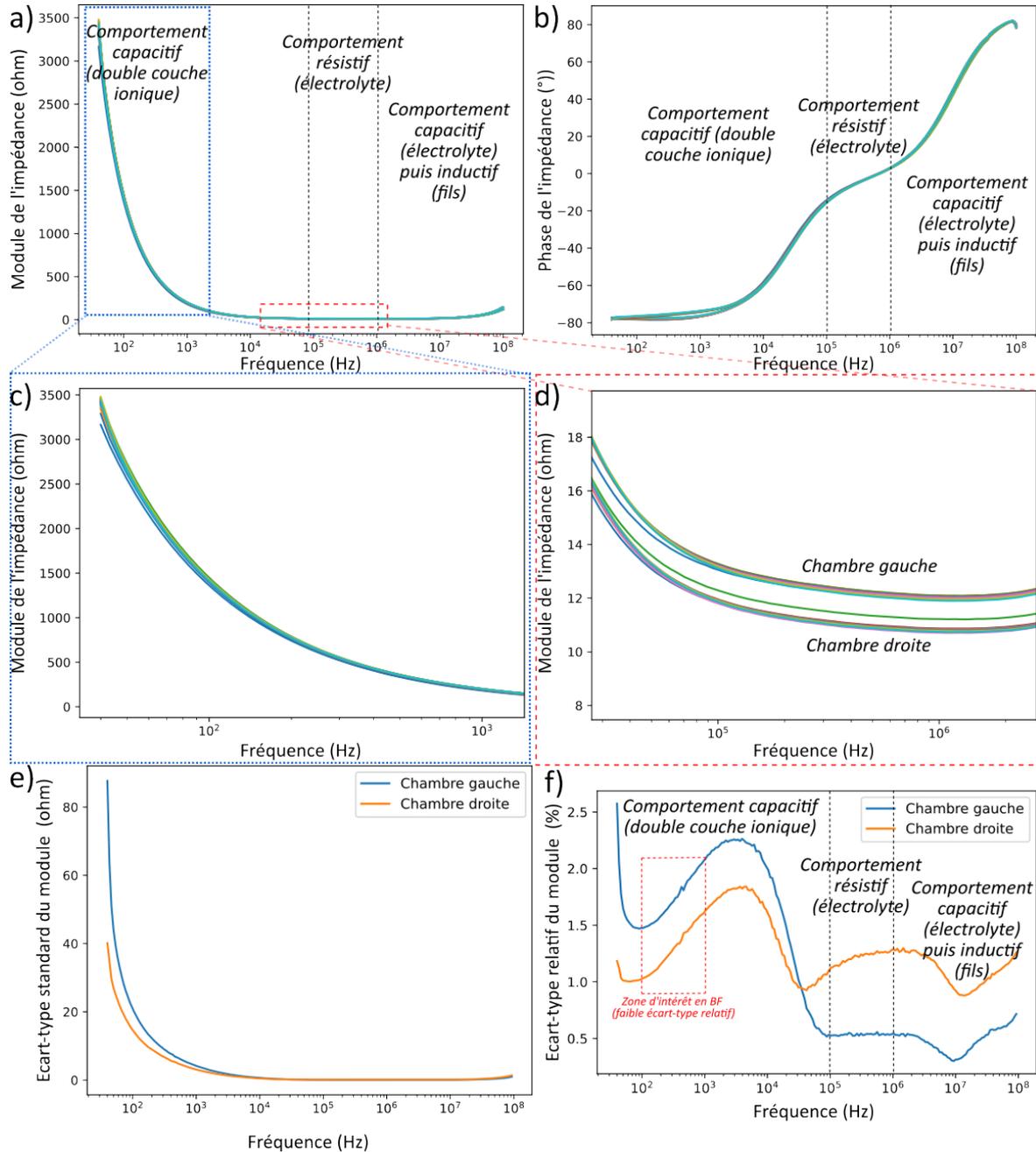


FIGURE 5.7 – Étude de la répétabilité des mesures dans le microsysteme avec IDE en or double chambre (IDE-250) durant l'injection de milieu de conductivité 1.25 S/m. (a) Module de l'impédance. (b) Phase de l'impédance. (c) Zoom sur la partie basse fréquence du module de l'impédance. (d) Zoom sur le plateau résistif du module de l'impédance. (e) Écart-type standard du module de l'impédance. (f) Écart-type relatif du module de l'impédance. $N = 10$ mesures/chambre.

En s'intéressant plus précisément au comportement en basse fréquence (figure 5.6,c et 5.7,c), on remarque que la valeur de l'impédance est élevée (plusieurs milliers d'ohms) et qu'il existe une variation donnant lieu à un écart-type en ohm élevé, jusqu'à 40 à 80 Ω (figure 5.6,e et 5.7,e). Cependant, si l'on raisonne en terme d'écart-type relatif (figure 5.6,f et 5.7,f), il est alors autour de 1 à 2.5 %, ce qui est une valeur acceptable. On remarque qu'il est préférable de ne pas regarder avant 100 Hz mais plutôt de s'intéresser à la plage de fréquences entre 100 et 1000 Hz, afin de réduire l'écart-type à moins de 2%, et ne pas aller trop haut en fréquence (entre 1 et 100 kHz) car il y a alors un important écart-type relatif (pour l'électrolyte de conductivité élevée) qui semble lié au passage du comportement capacitif au comportement résistif (figures 5.7,b et f).

Par ailleurs, sur le plateau résistif, entre 10 ou 100 kHz et 1 MHz (figure 5.6,d et 5.7,d), il est possible de distinguer deux faisceaux de courbes correspondant aux deux chambres de mesure. L'écart entre les deux chambres peut être dû à la résistance des contacts et à l'impact des électrodes (différence de chemin pour aller à l'une ou l'autre des électrodes car les contacts sont d'un seul côté). En termes d'écart-type sur cette zone au comportement résistif, il est proche de 0 en valeur absolue : autour de 1 Ω pour la conductivité faible (figure 5.6,e) et de 0.1 Ω pour la conductivité élevée (figure 5.7,e). Cela donne un écart-type relatif ne dépassant pas 0.5% pour la conductivité faible (figure 5.6,f) et 1.5% pour la conductivité élevée (figure 5.7,f).

En conclusion, la mesure d'impédance semble être la plus précise sur le plateau résistif qui s'étend de 10 kHz à 1 MHz pour les milieux de faible conductivité et de 100 kHz à 1 MHz pour les milieux de conductivité élevée, avec un écart-type relatif supérieur pour les conductivités élevées, du fait de la faible valeur d'impédance. En ce qui concerne le comportement en basse fréquence, même si l'écart-type absolu est relativement élevé, l'écart-type relatif reste tout de même acceptable (inférieur à 2% sur la plage 100-1000 Hz), du fait de la valeur d'impédance élevée.

5.1.3.2 Évaluation de la répétabilité liée aux branchements

Un autre paramètre pouvant influencer la mesure est le branchement et débranchement des fils permettant la mesure, qui est réalisé lors de chaque mesure. Pour tester ce paramètre, on mesure l'impédance après avoir débranché et rebranché les fils 5 fois par chambre, avec un milieu de conductivité 0.0343 S/m. On obtient un écart-type relatif en fonction de la fréquence ayant la même allure que la figure 5.6,e, avec une valeur ne dépassant pas les 1% quelle que soit la fréquence. Les branchements n'ont donc pas un impact significatif sur la précision de la mesure.

5.1.3.3 Évaluation de la répétabilité liée au montage

Une autre étape du protocole pouvant influencer la précision de la mesure est le montage du microsysteme. En effet, comme cela a été évoqué dans la partie 5.1.1, la position du joint permettant de sceller la chambre de mesure et le serrage des vis dans les éléments en plexiglas permettant d'assurer l'étanchéité et les contacts n'est pas calibrée de manière quantitative. Cela peut donc entraîner des différences de montage, même si le protocole de montage du microsysteme est bien défini. Pour étudier l'impact de ce biais, 5 montages/démontages du microsysteme ont été effectués, et des mesures d'impédance ont été réalisées pour chaque montage, après avoir injecté une solution KCl de conductivité 0.0355 S/m. L'écart-type standard est d'environ 1.7 Ω , soit un écart-type relatif pour chaque chambre sur tout le spectre en fréquence (pour des fréquences inférieures à 10 MHz) de moins de 1.75%. Ces valeurs sont légèrement supérieures aux écarts-types relatifs précédents, témoignant d'une plus grande variabilité de la mesure liée au montage du microsysteme.

Cependant, si l'on réalise la même expérience avec une solution de conductivité 1.27 S/m, l'écart-type standard est de l'ordre de 0.9Ω sur le plateau résistif, ce qui en valeur relative donne un pourcentage de l'ordre de 7%, soit une valeur bien plus élevée que pour les plus faibles conductivités. En effet, cette erreur de montage apparait systématiquement et comme pour les conductivités élevées, la valeur de l'impédance est faible, l'erreur influence donc la mesure de manière plus importante. La piste envisagée pour réduire ce biais, évoquée dans la partie 2.3.1.4, est l'utilisation de deux chambres de mesure, pour avoir une chambre contrôle et réaliser des mesures différentielles, afin de s'affranchir de cette erreur.

5.1.3.4 Stabilité avec la température

Étant donné que les mesures sur cellules sont réalisées à 37°C , il est nécessaire d'étudier la stabilité de la mesure lors du passage de la température ambiante à 37°C . Pour cela, on injecte une solution de KCl, ici de conductivité 0.0615 S/m, à température ambiante dans le système, on le place dans une enceinte à 37°C , et on réalise des mesures d'impédance toutes les minutes pendant 40 min lors de la montée en température de cette solution. On constate sur la figure 5.8 que le temps de stabilisation de la mesure est de l'ordre de 10 à 12 minutes, ce qui est cohérent avec ce qui avait été observé avec la précédente configuration d'électrodes (figure 5.1,a). Lors des mesures réalisées à 37°C , le protocole devra donc prendre en compte ce temps. Après ce temps, l'écart-type relatif sur la valeur du module de l'impédance est inférieur à 1% quelle que soit la fréquence considérée, ce qui est du même ordre de grandeur que l'écart-type déterminé lors de la caractérisation de la répétabilité de la mesure liée à l'injection de milieu.

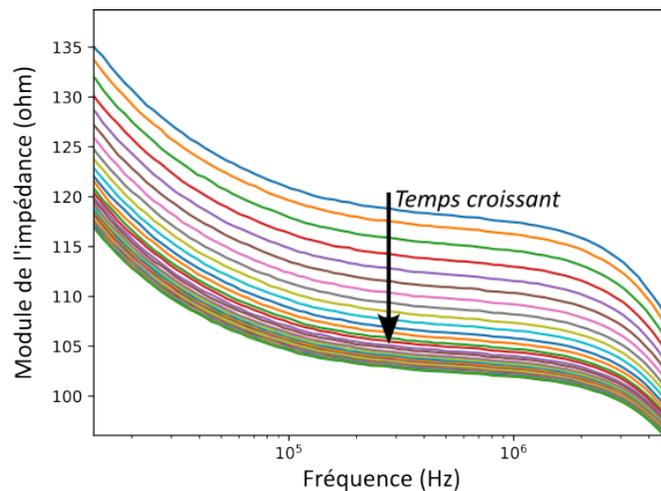


FIGURE 5.8 – Évolution avec le temps du module de l'impédance d'une solution KCl (0.0615 S/m) mesuré dans le microsystème avec les IDE-250 lors de sa montée en température de 23°C à 37°C avec un pas de temps de 1 min pendant 40 min.

5.1.3.5 Mesure de conductivité

Pour caractériser la capacité du microsystème à estimer la conductivité d'un échantillon grâce aux mesures d'impédance, des mesures ont été réalisées sur deux gammes de conductivités : des conductivités faibles, proches de celle du tampon Hepes (300-900 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ou 0.03-0.09 S/m), et des conductivités élevées, proches de celle du milieu de culture (8-20 mS/cm ou 0.8-2 S/m). Les mesures ont été effectuées dans une pièce de température contrôlée (22°C). Deux séries de mesures sont réalisées avec un nombre de solutions différentes testées (entre 5 et 12 par série). La configuration d'IDE utilisée est la configuration IDE-200. Les valeurs du module de l'impédance sont prises à une fréquence de 30 kHz afin d'être sur le plateau résistif,

là où l'impédance traduit le comportement résistif de l'électrolyte. On peut alors considérer que l'impédance est proportionnelle à l'inverse de la conductivité (résistivité) selon la relation suivante :

$$R_{sol} = \frac{K_{IDE}}{\sigma_{sol}} = K_{IDE} \times \rho, \quad (5.2)$$

avec R_{sol} la résistance de l'électrolyte (Ω), K_{IDE} la constante liée à la géométrie des électrodes (m^{-1}), σ_{sol} la conductivité de l'électrolyte (S/m) et ρ la résistivité de l'électrolyte ($\Omega.m$).

Il y a donc théoriquement une relation linéaire entre le module de l'impédance sur le plateau résistif et la résistivité. Cette résistivité est calculée à partir de la conductivité des solutions KCl, mesurée au conductimètre.

Les résultats obtenus (figure 5.9) permettent de mieux visualiser un phénomène déjà évoqué précédemment : les variations d'impédance sont faibles pour des solutions de conductivité élevée (donc résistivité faible) et inversement. La dispersion des mesures est également différente entre ces deux plages de conductivités. On retrouve cela dans le manuel du conductimètre utilisé (Mettler Toledo S230) puisque la précision pour une gamme de conductivité de 200 à 1999 $\mu S/cm$ est de 1 $\mu S/cm$ alors que pour une gamme de 0.2 à 20 mS/cm , elle est de 0.1 mS/cm soit 100 $\mu S/cm$. Les erreurs liées à cette mesure au conductimètre sont ajoutées en abscisse sur la figure 5.9, mais elles ne sont que très peu visibles. En ce qui concerne l'erreur en ordonnée, sur le module de l'impédance, comme les séries de mesures impliquent un démontage du système, on considère les erreurs déterminées dans le paragraphe 5.1.3.3, qui ne sont visibles sur la figure que pour les faibles résistivités (fortes conductivités).

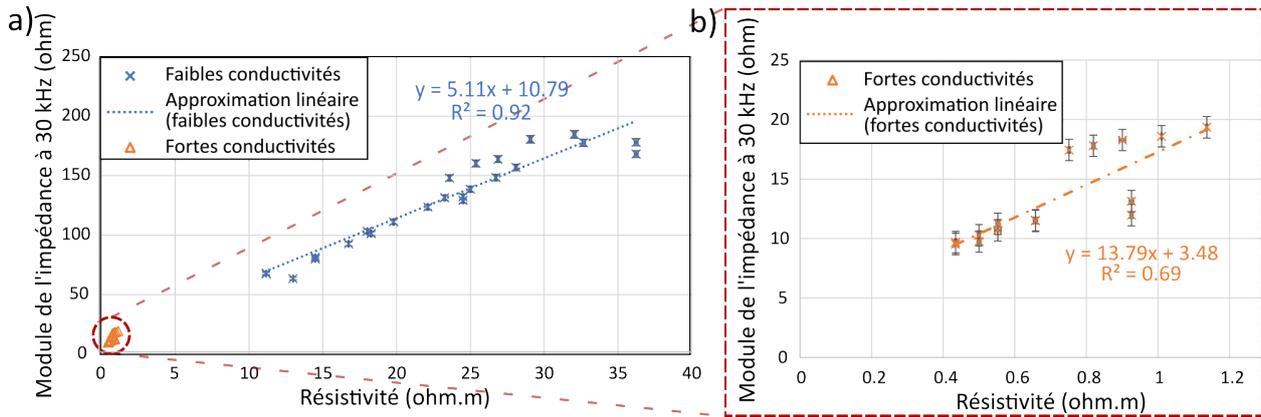


FIGURE 5.9 – (a) Évolution du module de l'impédance à 30 kHz pour plusieurs solutions d'ions KCl de conductivités faibles (bleu, 300-900 $\mu S/cm$) et élevées (orange, 8-20 mS/cm) correspondant respectivement à des résistivités élevées (10-35 $\Omega.m$) et faibles (0.4-1.2 $\Omega.m$). Erreur en x sur la résistivité calculée d'après la fiche technique du conductimètre, Erreur en y sur l'impédance = 1.7 Ω pour les faibles conductivités et 0.9 Ω pour les fortes conductivités (d'après la caractérisation du système). (b) Zoom sur les valeurs pour les conductivités élevées/résistivités faibles.

Il apparaît alors que pour les faibles conductivités, la plage de résistivité étant plus étendue que pour les fortes conductivités, la régression linéaire de la série de valeurs donne une relation affine, avec une valeur de K_{IDE} expérimentale proche de la valeur calculée, respectivement $5.11 m^{-1}$ contre $4.97 m^{-1}$, et un coefficient de corrélation satisfaisant (0.92). Cette différence peut être attribuée au fait que la géométrie du joint (goulot d'étranglement) entraîne que certains peignes ont une longueur plus importante que d'autres sur la zone de mesure (chambre microfluidique), or le calcul de K_{IDE} dépend de cette longueur. La capacité du microsystème à mesurer la conductivité d'une solution dans cette plage de mesure semble donc fiable, avec une erreur de seulement 3% sur la valeur de la constante liée à la géométrie de l'électrode. De

plus, on constate que la régression linéaire donne une droite affine avec une valeur à l'origine de 10.79Ω . Ce décalage entre théorie et expérience correspond à la résistance en série avec l'électrolyte dans le modèle électrique du système présenté précédemment (voir figure 3.5), traduisant l'impact des contacts électriques et des fils sur la mesure. Le système permet donc de déduire la conductivité à partir de l'impédance de l'électrolyte étudié avec une faible erreur, et cette caractérisation permet de connaître la résistance des contacts et des fils à prendre en compte dans la suite des expérimentations.

En revanche, pour les fortes conductivités, à cause de l'importante erreur liée au montage du système et du fait que la valeur d'impédance soit faible, la régression linéaire dans cette gamme de résistivité ne donne pas un coefficient de corrélation satisfaisant pour confirmer la relation linéaire de la série de mesures (0.69).

5.2 Mesures sur modèle simplifié : cellules en suspension

Une fois le microsystème caractérisé, des mesures sur des suspensions de cellules HT29 de faible fraction volumique dans du milieu de culture et du milieu Hépès ont été réalisées, afin d'étudier la précision de la mesure réalisée dans le microsystème développé sur un modèle biologique plus simple que les sphéroïdes.

5.2.1 Détermination du protocole de mesure

À partir de la suspension obtenue après passage, comptage et centrifugation des cellules, le culot est dilué dans la quantité de milieu nécessaire à l'obtention de la fraction volumique recherchée. La fraction volumique ρ est obtenue par la relation suivante :

$$\rho = \frac{N_{cell} \times v_{cell}}{v_{med}}, \quad (5.3)$$

avec N_{cell} le nombre de cellules, $v_{cell} = 1.767 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^3$ le volume d'une cellule HT29 de rayon mesuré de $7.5 \mu\text{m}$ (approximée à une sphère), et v_{med} le volume de milieu (en mm^3).

Lorsque des suspensions dans le milieu Hépès de faible conductivité sont réalisées, un premier rinçage avec 3 mL de ce milieu, suivi d'une seconde centrifugation, sont effectués afin d'éliminer tout le milieu de culture qui pourrait fausser la conductivité de la suspension cellulaire, étant donné la différence importante de conductivité entre le milieu de culture (1.32 S/m) et le milieu Hépès (0.03 S/m). En effet, la conductivité du surnageant d'une suspension de 0.63% de cellules dans du milieu Hépès (0.0306 s/m) après centrifugation, mesurée lors des premiers tests, était de 0.0433 S/m. Après avoir resuspendu le culot de cellules dans du milieu Hépès et réalisé une deuxième centrifugation, le surnageant a cette fois une conductivité de 0.0319 S/m. Les mesures d'impédance réalisées sur ce 2^{ème} surnageant et sur le milieu seul montrent que le rinçage permet d'obtenir une suspension de cellules dont le milieu surnageant a une conductivité proche du milieu seul (figure 5.10). Cependant, ces centrifugations peuvent conduire à une légère surestimation de la fraction volumique en cellules à cause de la mortalité qu'elles induisent, mais on suppose qu'elle sera comparable pour toutes les expériences puisque le protocole suivi est le même.

Les mesures sont effectuées à 37°C , afin de garder les cellules vivantes le temps des mesures. L'injection de la suspension cellulaire est réalisée avec une seringue de 1 mL et une aiguille 21G. Un test de viabilité a été effectué sur des suspensions de cellules avant et après 3 injections avec une seringue 21G afin de déterminer son impact. La variation de fraction volumique induite par la mortalité et mesurée par un test de viabilité est de moins de 0.3%.

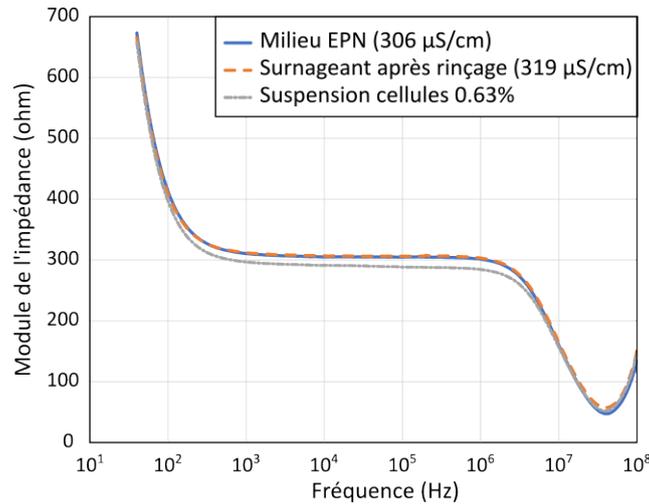


FIGURE 5.10 – Module de l'impédance pour une suspension de cellules HT29 de fraction volumique 0.63% dans du milieu Hépès (0.0306 S/m) en comparaison au milieu seul et au surnageant de la suspension après rinçage.

Les mesures sont réalisées 10 min après cette injection. Ce temps a été déterminé expérimentalement (figure 5.8) et est nécessaire pour assurer une stabilisation de la température et donc de la mesure. Deux mesures sur chaque suspension sont réalisées par expérience, les suspensions sont donc maintenues à 37°C entre les mesures et homogénéisées avec une micropipette de 1000 μL avant d'être injectées dans la chambre microfluidique pour réaliser la mesure.

5.2.2 Influence de la configuration d'électrodes

Afin d'illustrer leurs différences en termes de sensibilité de la mesure d'impédance, des études préliminaires ont été réalisées avec plusieurs configurations d'électrodes. Des mesures sont d'abord réalisées sur des électrodes pleines plaques parallèles et interdigitées coplanaires en ITO ($w = 250 \mu\text{m}$, $e = 250 \mu\text{m}$) avec comme solution étudiée une suspension de cellules dans du milieu Hépès de fraction volumique 1%. Ces mesures montrent une meilleure précision de la mesure d'impédance avec les IDE (figure 5.11, courbe verte) qu'avec la configuration pleine plaque (figure 5.11, courbe orange). En effet, il est possible avec les IDE de distinguer la dispersion β due à la présence des cellules dans le milieu. Cette dispersion, située autour de 100 kHz, est caractéristique du phénomène de polarisation ayant lieu au niveau de la membrane cellulaire, isolante, séparant les milieux intra et extracellulaire, conducteurs. Pour la configuration pleines plaques parallèles, la dispersion n'est que très faiblement visible, comme on peut le voir sur la partie zoomée à droite de la figure 5.11. La configuration IDE permet donc d'obtenir plus d'informations sur l'échantillon biologique étudié.

Comme ces mesures sont réalisées au bout de 10 min, afin de permettre une stabilisation de la mesure, on peut penser qu'il y a un effet de sédimentation des cellules qui joue sur la précision de la mesure. Des mesures sont alors réalisées sur les électrodes pleines plaques parallèles avec un hydrogel moulé sur l'électrode du bas, pour permettre aux cellules de s'y déposer et de créer une couche de cellules à une hauteur donnée. Cela ne semble pas améliorer la précision de la mesure, si l'on compare les courbes jaune et orange sur la figure 5.11. En effet, on observe uniquement une translation de l'impédance due à la présence de l'hydrogel qui joue sur la résistance de l'électrolyte.

Dans la suite, le matériau utilisé pour les IDE sera de l'or plutôt que de l'ITO, car, comme cela a été montré dans la partie 5.1.2.4, cela permet d'obtenir des électrodes mieux définies et d'améliorer la prise de contact. Sur ces IDE en or, on observe bien le même phénomène de mise en avant de la dispersion β (figure 5.11, courbes bleues) qu'avec les IDE en ITO, l'impédance

est juste plus faible à cause de la meilleure conductivité de l'or.

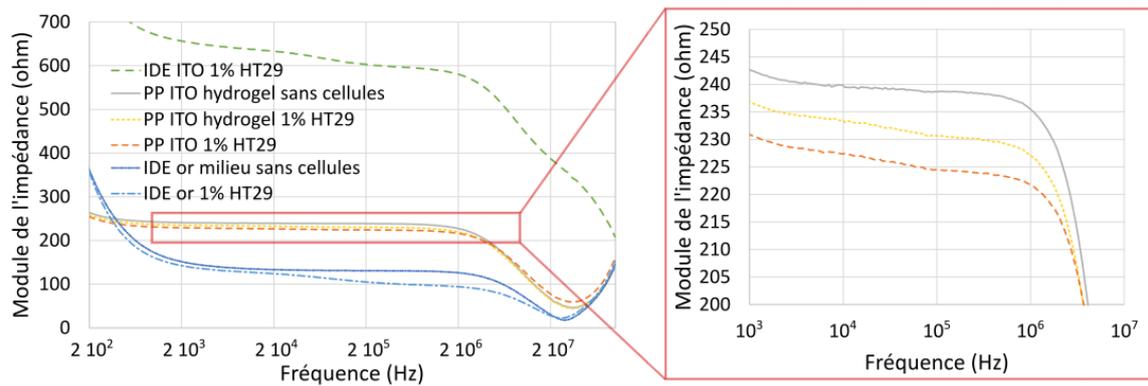


FIGURE 5.11 – Module de l'impédance d'une solution de tampon Hépès 0.03 S/m avec et sans cellules HT29 (1% en fraction volumique) pour des électrodes pleines plaques (PP) parallèles en ITO avec ou sans hydrogel de 500 μm d'épaisseur, et des IDE en ITO (largeur 250 μm espacées de 250 μm) et en or (IDE-200).

5.2.3 Influence de la conductivité du milieu

En plus de la structuration des électrodes, un autre phénomène permettant d'améliorer la sensibilité de la mesure a été mis en avant pendant ces expériences sur suspensions cellulaires : la réduction de la conductivité du milieu dans lequel sont placées les cellules.

Configuration d'électrodes pleines plaques parallèles Dans un premier temps, des mesures sont réalisées sur des suspensions de cellules HT29 de fraction volumique entre 1 et 3% dans deux milieux différents, le milieu de culture (1.3 S/m) et le milieu Hépès de faible conductivité (0.03 S/m), en utilisant deux électrodes pleines plaques parallèles en ITO. Les résultats présentés sur la figure 5.12 montrent bien que la variation de fraction volumique est uniquement visible dans le milieu de faible conductivité.

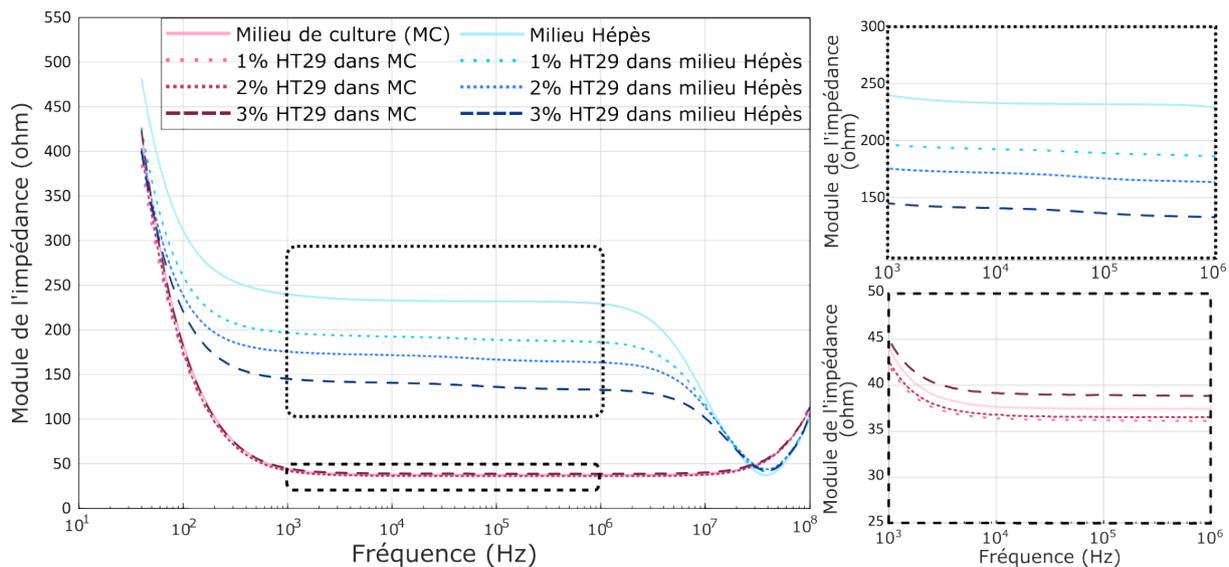


FIGURE 5.12 – Mesures d'impédance sur des suspensions de cellules HT29 avec des électrodes pleines plaques parallèles en ITO et pour deux milieux de conductivité faible (milieu Hépès) ou élevée (milieu de culture) et zoom sur le plateau pour chaque milieu (droite).

Configuration d'électrodes interdigitées coplanaires Afin de combiner avec le changement de configuration d'électrodes étudié précédemment, des mesures sont effectuées sur des suspensions cellulaires de 1 à 3% en utilisant les IDE en or (IDE-200) précédemment évaluées comme étant la configuration d'électrodes permettant la meilleure précision parmi les différentes configurations testées. Ces fractions volumiques correspondent à la gamme de fractions volumiques équivalentes attendues lors de la croissance des sphéroïdes dans les micropuits en agarose utilisés (500 puits de diamètre 300 μm), en calculant le volume maximal des sphéroïdes par rapport au volume total de la chambre microfluidique. Lorsque les cellules sont dans du milieu de culture (figure 5.13,a et c), les mesures d'impédance obtenues montrent que la dispersion entre les quatre mesures, réalisées au cours des deux expériences, est importante en basse fréquence, comme cela avait été observé lors de la caractérisation du microsysteme. Sur le plateau résistif, les valeurs d'impédance sont très faibles, de l'ordre de la dizaine d'ohms, et il n'y a pas de différence significative entre les différentes fractions volumiques, comme c'était le cas avec la configuration pleine plaque, puisque l'erreur sur l'impédance pour cette gamme de conductivité, déterminée dans la partie 5.1.3.3, est d'environ 1Ω , ce qui est de l'ordre de grandeur des variations observées ici.

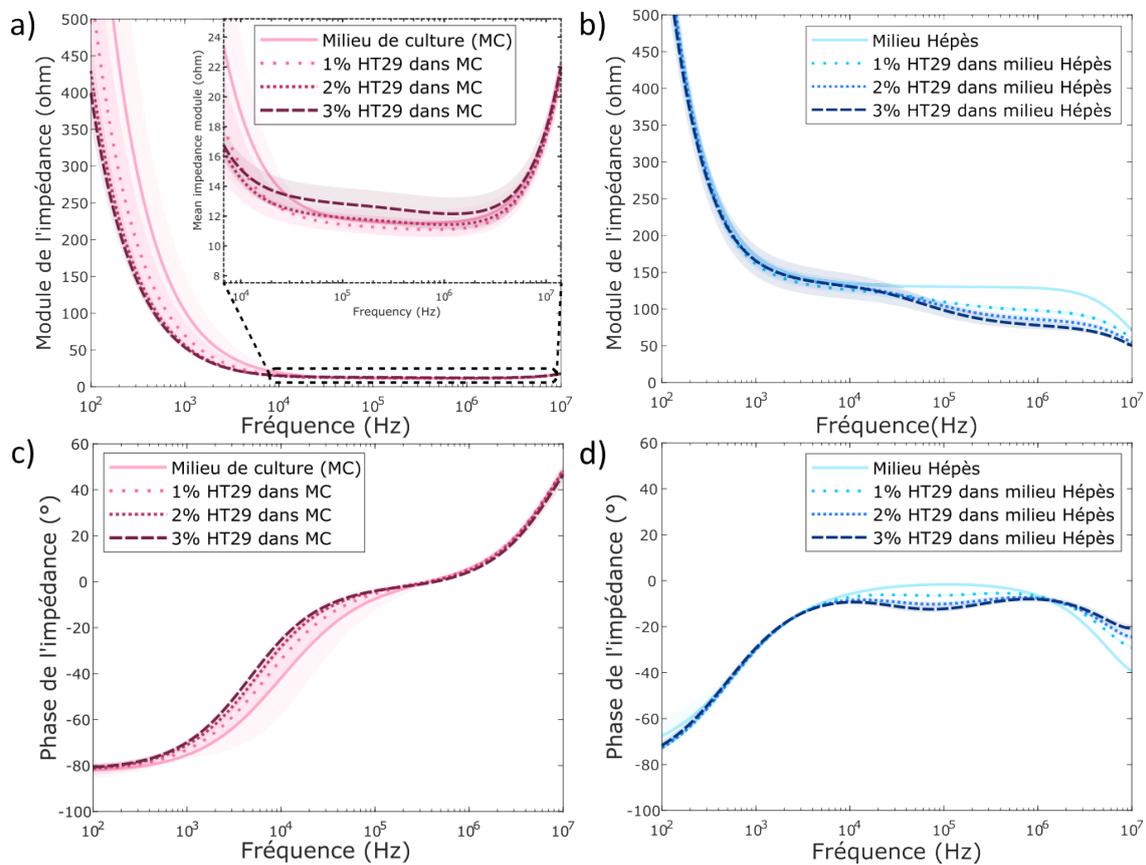


FIGURE 5.13 – Mesures d'impédance sur des suspensions de cellules HT29 sur IDE en or de 200 μm de largeur et espacement pour deux milieux de conductivité faible ou élevée. (a,c) Module et phase de l'impédance pour une suspension de 1 à 3% de fraction volumique dans du tampon Hépès (0.03 S/m). (b,d) Module et phase de l'impédance pour une suspension de 1 à 3% de fraction volumique dans du milieu de culture (1.32 S/m). Ligne = valeur moyenne, Zone ombrée = écart-type standard, $N = 2$ mesures/condition, deux expériences.

En faisant la même expérience, mais en remplaçant le milieu de culture par du milieu Hépès de plus faible conductivité (figure 5.13,b et d), il apparaît que les valeurs en basse fréquence sont similaires pour tous les groupes et reproductibles. En ce qui concerne le plateau résistif, on voit apparaître une dispersion aussi bien sur le module que sur la phase de l'impédance, que

l'on peut attribuer à la dispersion β , bien connue pour les échantillons biologiques. De plus, il est possible de distinguer de manière significative les différentes fractions volumiques, puisque les variations, de l'ordre de la dizaine d'ohms, sont largement supérieures à l'erreur de 1.7Ω déterminée dans la partie 5.1.3.3.

Comparaison des deux configurations lors du changement de la conductivité du milieu de mesure Si on compare les deux configurations en valeurs relatives par rapport aux mesures dans le milieu sans cellules (figure 5.14), on constate que les variations relatives à 1 MHz, soit à la fin du plateau résistif, sont similaires pour les deux configurations d'électrodes. Ces variations se retrouvent sur l'intégralité du plateau pour la configuration pleines plaques parallèles, mais pas pour la configuration interdigitées coplanaires, puisque pour cette dernière, la dispersion β est visible sur cette plage de fréquences.

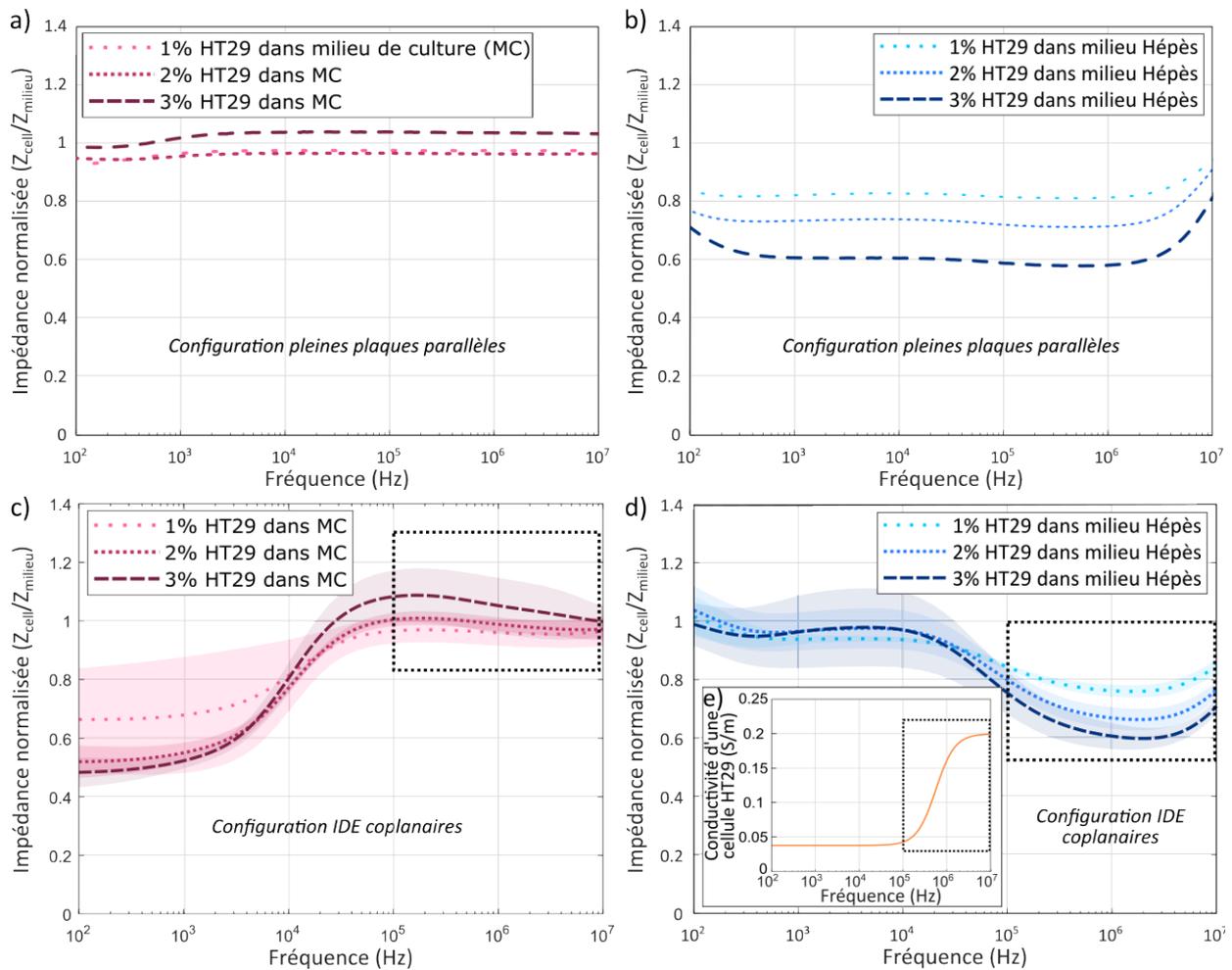


FIGURE 5.14 – Comparaison des modules d'impédance avec cellules (Z_{cell}) normalisés par rapport à ceux sans cellules (Z_{milieu}) pour la configuration pleines plaques parallèles en ITO (a) dans le milieu de culture (1.32 S/m) et (b) dans le milieu Hépès (0.03 S/m), et pour la configuration IDE coplanaires (c) dans le milieu de culture (1.32 S/m) et (d) dans le milieu Hépès (0.03 S/m). (a-b) Une expérience. (c-d) Ligne = valeur moyenne, Zone ombrée = écart-type standard, $N = 2$ mesures/condition, deux expériences. (e) Conductivité homogénéisée d'une cellule HT29 en fonction de la fréquence, obtenue avec le modèle simple enveloppe sur le logiciel MyDEP. Zones en pointillés = zones de meilleure sensibilité.

On constate également que pour la configuration pleines plaques, les écarts d'impédance sont cohérents avec l'évolution de la fraction volumique de cellules dans le milieu Hépès (figure 5.14,b) mais pas dans le milieu de culture (figure 5.14,a) même en variations relatives. En

ce qui concerne la configuration IDE, le comportement entre 100 kHz et 1 MHz est cohérent pour le milieu Hépès (figure 5.14,d). En effet, si on s'intéresse à l'évolution de la conductivité homogénéisée d'une cellule HT29 (figure 5.14,e), obtenue sur le logiciel MyDEP à partir des propriétés électriques données par [L. Wu et al., 2012] et du modèle simple enveloppe (voir partie 2.2.2.2), on constate bien que celle-ci devient largement supérieure à celle du milieu uniquement à partir de 100 kHz (zone entourée avec le cadre en pointillés). Cette augmentation de la conductivité vient du fait qu'à ces fréquences élevées, l'influence du cytoplasme, très conducteur, domine, comme cela a été montré précédemment sur la figure 2.5. Pour les mesures dans le milieu de culture (figure 5.14,c), on observe que les courbes sont bien dans l'ordre croissant 1 à 3% mais les valeurs ne sont pas cohérentes pour 1 et 2% car les cellules sont moins conductrices que le milieu de culture, donc le ratio d'impédance devrait bien augmenter avec la fraction volumique mais il devrait être supérieur à 1. De plus, les écart-types entre les différentes expériences sont importants et comme souligné précédemment, l'erreur sur la mesure d'impédance pour cette gamme de conductivité est de l'ordre de grandeur des variations. Ces résultats confirment la meilleure précision de détection des cellules dans ce milieu Hépès moins conducteur.

Discussion Pour aller plus loin, un test est effectué en utilisant la configuration d'électrodes pleines plaques en ITO et une suspension de cellules HT29 de fraction volumique 3%, mais dans un autre milieu à base d'Hépès et de sucrose mais d'encore plus faible conductivité que celui utilisé précédemment (0.0156 S/m contre 0.03 S/m), obtenu en diminuant la quantité d'Hépès. Les mesures d'impédance (figure 5.15) réalisées sur la solution sans cellule et avec cellules montrent qu'en présence de cellules, il est cette fois possible de distinguer la dispersion β même avec cette configuration d'électrodes. Si on compare aux résultats obtenus précédemment, la chute d'impédance liée à la dispersion β entre 10 kHz et 1 MHz est d'environ 13 Ω pour les mesures dans le milieu à 0.0156 S/m, contre seulement 5 Ω pour les mesures dans le milieu à 0.03 S/m (voir figure 5.11, zoom). Cependant, elle reste nettement inférieure à la chute observée pour les mesures avec les IDE en or, qui est de l'ordre de 50 Ω (voir figure 5.13,b). Cela confirme donc d'une part que la configuration IDE permet une meilleure détection par mesure d'impédance de cette dispersion liée à la présence des cellules, et d'autre part que la diminution de la conductivité du milieu dans lequel se trouvent les cellules permet bien d'augmenter la sensibilité de la mesure.

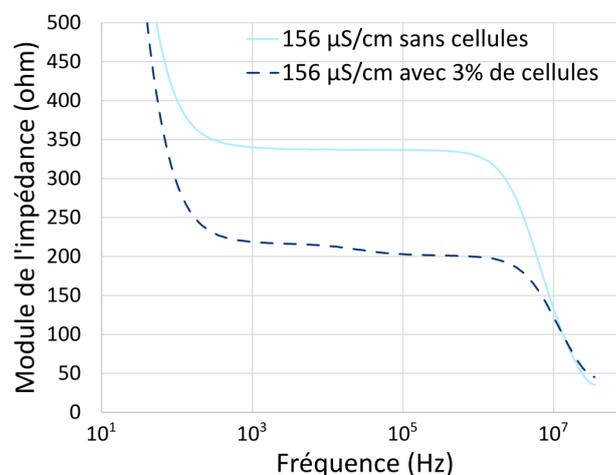


FIGURE 5.15 – Mesures d'impédance sur une suspension de 3% de cellules HT29 sur des électrodes pleines plaques en ITO dans un milieu de faible conductivité (0.0156 S/m).

Si l'on transpose la démarche suivie ici au cas des sphéroïdes, il apparaît que le suivi de croissance par mesure d'impédance, qui correspond à un suivi de l'augmentation de la fraction

volumique équivalente en cellules, semble mesurable de manière plus précise dans le milieu Hépès que dans le milieu de culture et en utilisant des électrodes coplanaires au motif interdigité.

Toutefois, l'allure globale des courbes obtenues sur électrodes pleines plaques n'est pas entièrement comprise. En effet, dans les conditions habituellement utilisées dans la littérature, le comportement de la membrane étant isolant jusqu'à 10^6 Hz environ et la conductivité du cytoplasme étant inférieure à celle du milieu, cela entraîne une augmentation d'impédance avec l'ajout de cellules ou agrégats dans un milieu.

Cependant dans notre cas, les conditions sont particulières car la conductivité du milieu Hépès utilisé est très faible (0.03 S/m). D'après des résultats de diélectrophorèse (DEP) que nous avons réalisées sur les cellules HT29 dans ce milieu (données non montrées), le changement de DEP négative à DEP positive (fréquence de *crossover*) s'observe à partir de 30 kHz. Or, le fait que la cellule soit soumise à la DEP positive au delà de 30 kHz signifie qu'elle devient plus polarisable que le milieu, c'est-à-dire que les lignes de champ pénètrent dans la cellule. Si l'on considère l'expression simplifiée du facteur de Clausius-Mossotti en basse fréquence, dont l'expression complète est donnée par :

$$F_{CM}(f) = \frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m}, \quad (5.4)$$

avec σ_p et σ_m les conductivités de la particule et du milieu respectivement et f la fréquence.

On remarque que lorsque $R_e(F_{CM}) > 0$ (DEP positive), la conductivité de la cellule homogénéisée tend à devenir supérieure à celle du milieu. Donc si on se concentre sur les valeurs d'impédance après 10^5 Hz, fréquence au-delà de laquelle la conductivité des cellules HT29 est, d'après ce qui vient d'être dit, théoriquement supérieure à celle du milieu Hépès, on constate que les écarts de module d'impédance obtenus sont cohérents avec les valeurs théoriques que l'on peut calculer avec une loi des mélanges. Si on considère que la conductivité du cytoplasme des cellules est de 0.02 S/m [L. Wu et al., 2012], et qu'on fait l'approximation d'une dilution d'une fraction de quelques pourcents de ce cytoplasme dans le milieu de mesure utilisé, qui a une conductivité de 0.03 S/m (milieu Hépès) ou 1.3 S/m (milieu de culture), la variation de conductivité induite dans le milieu faiblement conducteur est significativement plus importante que celle dans le milieu fortement conducteur. Ainsi si l'on calcule pour la configuration pleine plaque le module de l'impédance théorique à partir de la constante de géométrie des électrodes (le rapport distance inter-électrodes soit 1 mm sur la surface des électrodes soit 1.7 cm^2), cela nous donne pour 3% de cellules diluées dans du milieu Hépès une valeur de 168Ω contre 196Ω pour le milieu seul, alors que dans le milieu de culture, on passe de 4.9Ω avec cellules à 5Ω sans cellule. On retrouve donc la tendance observée sur la figure 5.12.

En revanche, pour ce qui est de la plage de fréquences entre 10^3 et 10^5 Hz, pour laquelle la conductivité des cellules est très faible à cause de l'influence dominante de la membrane isolante, il semble y avoir pour la configuration pleine plaque une résistance parasite qui entraîne une variation du module de l'impédance avec l'ajout de cellules sur cette zone. Les hypothèses pouvant expliquer cette variation sont un relargage d'ions de la part des cellules, qui auraient un effet visible uniquement dans le milieu faiblement conducteur puisque la variation de conductivité engendrée dans le milieu de culture serait négligeable. Une autre hypothèse pourrait venir d'un effet des cellules sur la double couche ionique à l'interface électrode-électrolyte lorsque celles-ci touchent les électrodes.

En ce qui concerne la tendance observée pour les mesures avec la configuration interdigitée (figure 5.13), les résultats obtenus dans le milieu Hépès de faible conductivité sont quant à eux cohérents avec l'évolution de la conductivité des cellules, puisque l'on observe une dispersion uniquement à partir de 10^5 Hz, comme cela a été souligné précédemment, et qu'avant cette fréquence, les courbes de module d'impédance pour les différentes fractions volumiques de cellules sont superposées à celle du milieu seul, témoignant du fait que l'influence des cellules sur l'impédance peut bien être négligée à ces fréquences.

5.3 Culture de sphéroïdes sous perfusion : application au suivi de croissance par impédance

5.3.1 Mise au point du protocole de culture sous perfusion

Des expériences préliminaires ont été réalisées avec les IDE en ITO afin de mettre au point le protocole de culture des sphéroïdes sous perfusion de milieu dans le microsysteme. Une des difficultés mise en avant par ces tests est la présence de bulles dans la chambre de mesure, qui entraîne un biais sur la valeur d'impédance mesurée (figure 5.16,a et d).

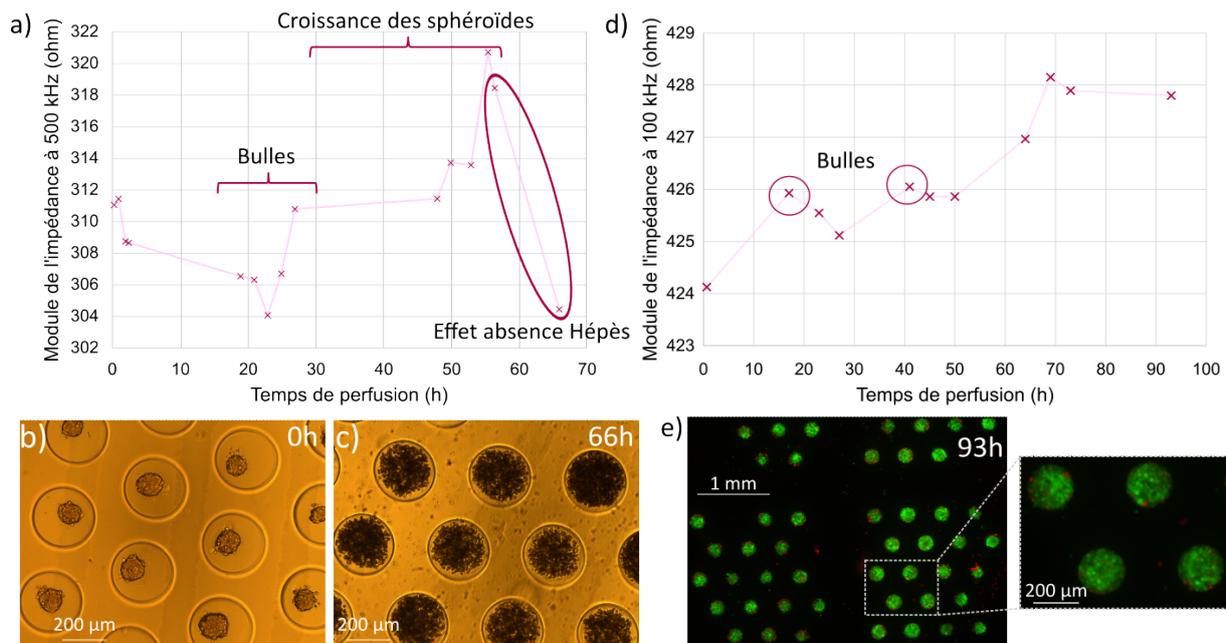


FIGURE 5.16 – Étude préliminaire du suivi de croissance de sphéroïdes sous perfusion dans le microsysteme. (a) Suivi du module de l'impédance dans le microsysteme simple chambre avec les IDE en ITO et des sphéroïdes de cellules HT29 dans du milieu de culture, et images au microscope optique ($\times 4$) de ces sphéroïdes (b) avant perfusion et (c) après 66h de perfusion. (d) Suivi du module de l'impédance dans le microsysteme simple chambre avec les IDE en ITO et des sphéroïdes de cellules HT29 dans du milieu de culture avec 25 mM d'Hépès. (e) Image au microscope à épifluorescence ($\times 2.5$) et zoom du marquage de la viabilité après 93h de perfusion avec du milieu de culture contenant 25 mM d'Hépès. Vert = FDA (cellule vivante), Rouge = IP (cellule morte).

La solution trouvée pour résoudre ce problème est de mettre le pousse-seringue permettant l'injection de milieu de culture dans le système directement dans l'incubateur à 37°C, après avoir pris soin de faire préchauffer la seringue contenant le milieu de culture. En effet, lors de la montée en température, on remarque que des bulles apparaissent dans la seringue, l'augmentation de température rendant la dissolution des gaz plus difficile. Il est donc nécessaire de les enlever avant de commencer l'injection, afin de ne pas risquer de les injecter au cours de la culture sous perfusion. De plus, le fait que la seringue et le capillaire menant à l'entrée de la chambre microfluidique soient dans la même enceinte chauffée évite l'apparition de bulles dans le capillaire lors de la montée en température du milieu, comme cela a pu être le cas pour les expériences préliminaires (figure 5.16), pour lesquelles le pousse-seringue était situé hors de l'incubateur.

Lors de ces premiers tests, comme les IDE étaient transparentes, il était possible d'observer les sphéroïdes au microscope optique afin de contrôler leur croissance. Il a alors été constaté

que les sphéroïdes semblaient perdre leur cohésion au bout de quelques jours après perfusion, comme le montre la figure 5.16,c de sphéroïdes au bout de 66h de perfusion, pour lesquels on ne distingue plus le contour des sphéroïdes, en comparaison aux mêmes sphéroïdes avant perfusion (figure 5.16,b). Cet effet de la perfusion sur les sphéroïdes est attribué au manque de CO_2 à cause du faible échange gazeux entre l'incubateur (maintenu à 5% de CO_2) et la chambre microfluidique contenant les sphéroïdes, lié au fait qu'elle soit constituée de deux lames de verre parallèles laissant peu passer les gaz. Toutefois, ce problème a permis de mettre en avant que les mesures d'impédance permettaient de détecter un effet néfaste sur l'état des sphéroïdes puisqu'on constate une chute d'impédance (figure 5.16,a) qui semble être corrélée à ce changement de morphologie des sphéroïdes.

Afin de résoudre ce problème, de l'Hépès est ajouté au milieu de culture utilisé pour la perfusion [Carver et al., 1999], avec une concentration standard de 25 mM, afin de limiter sa toxicité [Itagaki et al., 1974]. En effet, habituellement en culture cellulaire, lorsque le CO_2 injecté sous forme gazeuse dans l'incubateur se dissout dans le milieu, il s'associe aux hydrogénocarbonates contenus dans celui-ci, ce qui permet le maintien du pH à une valeur physiologique autour de 7. Or ici la configuration du microsystème limite la dissolution du CO_2 . De l'Hépès est donc ajouté pour remplir ce rôle de tampon, étant donné que la constante d'équilibre de cet acide (pKa) est de 7.3, proche de la valeur du pH physiologique des cellules qui est à réguler, ce qui lui confère un bon pouvoir tampon. Une caractérisation du milieu de culture avec 25 mM d'Hépès est réalisée, afin de vérifier ses propriétés par rapport au milieu de culture seul. Sa conductivité est de 1.37 S/m contre 1.32 S/m pour le milieu seul, son pH de 7.32 contre 7.38 et son osmolarité de 352 mosm/kg H_2O contre 343 mosm/kg H_2O . Les propriétés du milieu avec ajout d'Hépès restent donc viables pour les cellules. Lors de la culture de sphéroïdes sous perfusion avec ajout d'Hépès dans le milieu de culture, on ne constate plus de chute d'impédance (figure 5.16,d) et un marquage de la viabilité réalisé après 93h de perfusion (figure 5.16,e) révèle que les sphéroïdes sont cohésifs et vivants.

En prenant en compte ces premiers tests, les expériences réalisées précédemment sur des suspensions de cellules, et les recherches effectuées dans la littérature (parties 2.3 et 2.4) pour améliorer la sensibilité des mesures d'impédance, le protocole de culture des sphéroïdes sous perfusion utilisé par la suite, schématisé sur la figure 5.17, est le suivant :

- Passage à l'autoclave ou aux rayons UV de toutes les pièces du système et du circuit microfluidique pour éviter les contaminations bactériennes.
- Préchauffage des seringues de milieu de culture contenant 25 mM d'Hépès et des tubes contenant le milieu Hépès de conductivité 0.03 S/m à 37°C pendant 1h.
- Montage du système permettant d'avoir deux chambres de culture en parallèle avec la lame IDE-250 en or sur laquelle se trouve, dans l'une des deux chambres seulement, un hydrogel greffé contenant les sphéroïdes formés après 3 jours de culture en boîte de Pétri (protocoles détaillés dans le chapitre 3), afin de réaliser une mesure d'impédance relative en normalisant par rapport à la chambre contrôle sans sphéroïdes.
- Injection de milieu de culture à 20 μ L/h pendant la culture.
- Changement de milieu, pour diminuer la conductivité avant de réaliser les mesures d'impédance une fois par jour pour le suivi de croissance des sphéroïdes. Ce changement de milieu est rendu possible par le système microfluidique mis en place (vanne 3 voies).

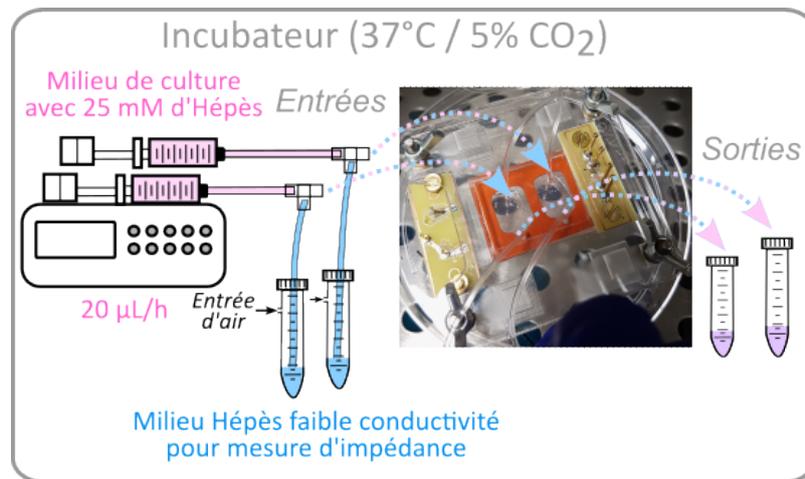


FIGURE 5.17 – Représentation schématique du protocole de culture sous perfusion dans le microsystème après sa mise au point.

5.3.2 Suivi de croissance de sphéroïdes : intérêt d'une mesure différentielle

Grâce au protocole mis au point, un suivi par impédance de la croissance de sphéroïdes de cellules HT29 cultivés sous perfusion a pu être réalisé. Des images ont également pu être prises au microscope avant perfusion et à l'issue de la croissance, afin d'avoir une vérification visuelle de la croissance, en se plaçant sur une zone où les sphéroïdes sont situés entre les peignes des IDE en or (non transparentes). Avant de présenter ces résultats, il convient de préciser qu'expérimentalement, l'ensemencement d'un seul hydrogel sur les deux (chambre contrôle et chambre avec sphéroïdes) n'a pas été possible, car des cellules résiduelles se déposaient dans les puits vides au cours des 3 premiers jours de culture. La chambre de contrôle ne comporte donc pas d'hydrogel. Il faut alors s'assurer que la présence de l'hydrogel seul n'influence pas la mesure d'impédance. Pour cela, on réalise une expérience préliminaire de suivi par impédance pendant 3 jours dans les mêmes conditions que celles qui seront réalisées avec sphéroïdes, mais sans cellules dans l'hydrogel.

Les résultats montrent qu'en basse fréquence, l'impédance varie très peu que ce soit dans le milieu de culture (figure 5.18,a) ou dans le milieu Hépès (figure 5.18,b). Cela signifie que si des variations significatives sont observées sur cette plage de fréquences, elles pourront être attribuées à la présence des sphéroïdes.

En revanche plus haut en fréquence, sur le plateau résistif, l'impédance dans le milieu Hépès diminue avec le temps. Cela pourrait être lié à une dégradation de l'hydrogel avec le temps, à un manque de reproductibilité du changement de milieu dans l'hydrogel, ou encore à une variation de la conductivité du milieu Hépès dans le temps lors de sa montée en température. En effet, l'augmentation de température pourrait favoriser des réactions d'oxydoréduction contribuant à modifier la conductivité du milieu. Dans ce cas, le fait d'utiliser la chambre contrôle sans cellules devrait permettre de s'affranchir de ce biais. Il faudra donc étudier avec attention les variations en présence de sphéroïdes sur cette plage de fréquences. En ce qui concerne les mesures dans le milieu de culture sur cette plage de fréquences, elles ne sont pas intéressantes pour le suivi de croissance du fait des erreurs élevées liées à leur faible valeur, comme cela a été mis en avant précédemment. Ces résultats justifient l'intérêt de la chambre contrôle, qui permettront de s'affranchir de la double couche en basse fréquence et ainsi de voir apparaître les variations liées à la présence des sphéroïdes.

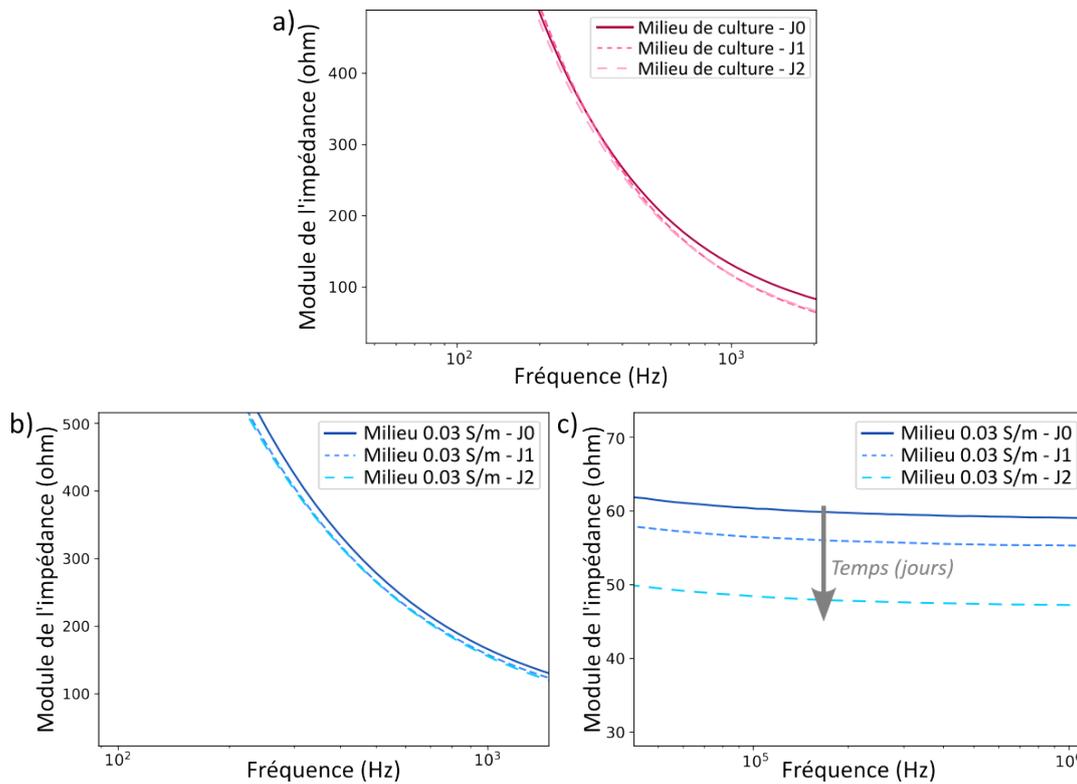


FIGURE 5.18 – Suivi d’impédance pendant 3 jours avec IDE en or et mesure différentielle pour un hydrogel sans sphéroïdes. Module de l’impédance en basse fréquence pour les mesures dans le milieu de culture (a) et dans le milieu Hépès (b), et module de l’impédance sur le plateau résistif dans le milieu Hépès (c).

Un suivi de la croissance de sphéroïdes pendant 3 jours est ensuite réalisé au cours de deux expériences, une sans ajout d’Hépès dans le milieu de culture (expérience 1) et une avec ajout de 25 mM d’Hépès pour remplacer le rôle du CO_2 (expérience 2), permettant aux sphéroïdes d’avoir une croissance normale. Les résultats sont présentés sur la figure 5.19. Les mesures d’impédance ont été normalisées par rapport à la chambre contrôle pour tracer l’évolution normalisée, défini par la relation $\Delta Z_{norm} = \frac{Z_0 - Z_{cell}}{Z_0}$ avec Z_0 le module de l’impédance sans sphéroïdes et Z_{cell} celui avec sphéroïdes (voir partie 2.3.1.4). Les mesures absolues d’impédance en basse fréquence (100 - 1000 Hz) et sur le plateau résistif (100 kHz - 1 MHz) sont présentées dans l’annexe M pour les deux expériences. Il est à noter que, contrairement aux mesures réalisées sur des suspensions cellulaires, on ne voit pas apparaître ici la dispersion β . Cela peut s’expliquer par le fait que, même si la fraction volumique en cellules est du même ordre de grandeur, leur répartition n’est pas la même car pour les suspensions, les cellules ont tendance à sédimenter sur les électrodes, ce qui augmente localement la fraction volumique en cellules dans la zone de mesure des IDE, alors que pour les sphéroïdes, ils sont situés à une plus grande distance de celles-ci et ne sont pas aussi proches les uns des autres que les cellules en suspension. De plus, la nature même des échantillons biologiques étudiés, l’un étant des cellules individuelles et l’autre des agrégats 3D avec des jonctions entre les cellules, peut également contribuer à l’explication de cette absence de dispersion.

Les résultats obtenus pour l’expérience 2 montrent que, pour le suivi dans le milieu de faible conductivité (figure 5.19,a), une différence de ΔZ_{norm} est visible sur toute la plage de fréquences. Les variations au-delà de 10^5 Hz sont cohérentes avec ce qui est attendu, puisque les sphéroïdes contribuent dans ce cas à augmenter la conductivité globale donc à diminuer le module de l’impédance, étant donné les conditions particulières dans lesquelles on se trouve (conductivité du milieu plus faible de celle du cytoplasme des cellules HT29). Ainsi, comme

la valeur sans sphéroïdes évolue peu, la différence entre les modules avec et sans sphéroïdes augmente, donc ΔZ_{norm} aussi. Cependant en ce qui concerne des fréquences inférieures, comme c'était le cas sur les cellules en suspension, les résultats observés ne sont pas cohérents avec le comportement capacitif des membranes qui domine à ces fréquences, et nous n'expliquons pas encore à ce jour pourquoi les variations d'impédance sur cette plage sont inversées par rapport à ce qui est attendu.

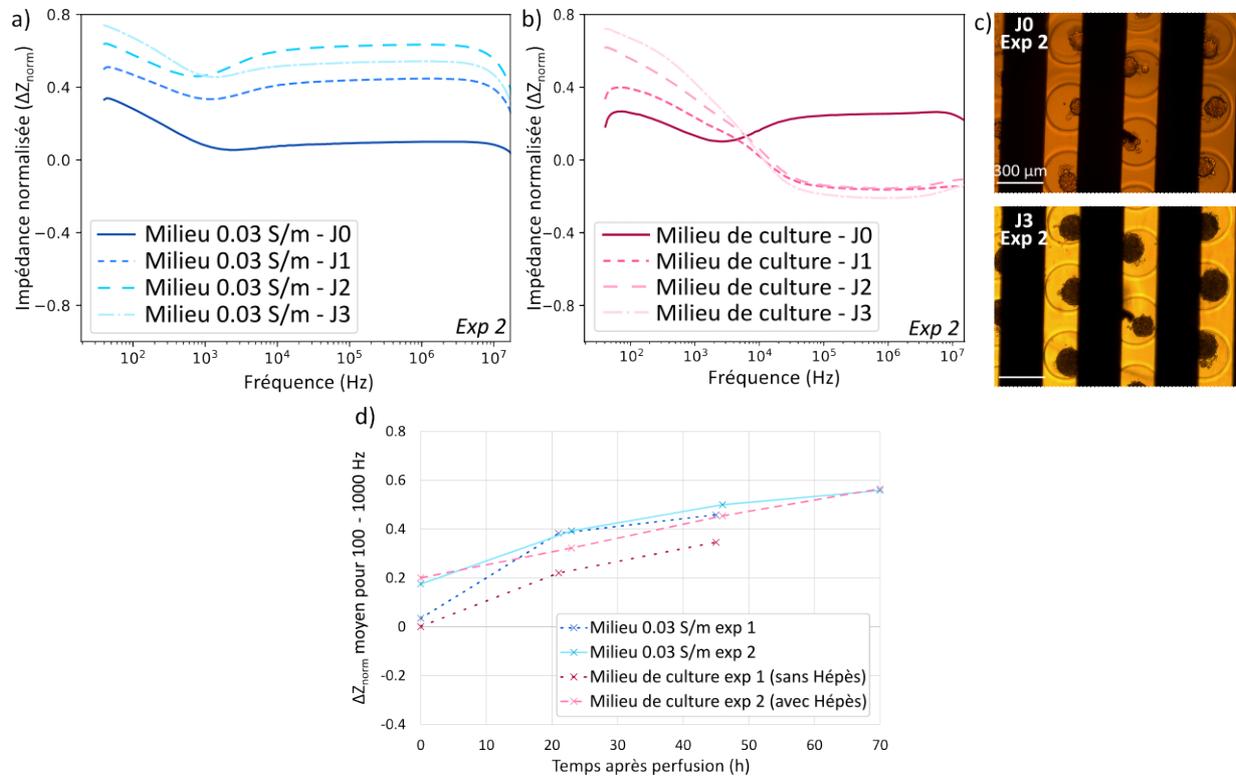


FIGURE 5.19 – Suivi de croissance des sphéroïdes avec mesure différentielle grâce aux IDE-250 en or. Expérience 2 : ratio d'impédance normalisée (ΔZ_{norm}) à partir des mesures (a) dans le milieu 0.03 S/m et (b) dans le milieu de culture, et (c) images au microscope optique ($\times 4$) des sphéroïdes avant (J0) et 3 jours après (J3) culture sous perfusion. (d) Comparaison des courbes de croissance en basse fréquence, obtenues en calculant ΔZ_{norm} moyen sur la plage 100 - 1000 Hz, dans le milieu de culture et le milieu Hépès 0.03 S/m pour les deux expériences (exp 1 et exp 2).

On note également que la mesure du jour 3 semble incohérente après 1000 Hz car la courbe de ΔZ_{norm} croise celle du jour 2. Cela pourrait être lié à un artefact de mesure sur cette plage de fréquences, comme cela a été montré pour les mesures sur hydrogel en absence de sphéroïdes, pour lesquelles le module de l'impédance sur le plateau résistif semblait être influencé par la présence de l'hydrogel seul. En revanche pour l'expérience 1, les variations sur cette plage de fréquences sont cohérentes avec ce qui est attendu (voir annexe M représentant les mesures absolues d'impédance). Nous allons donc plutôt nous intéresser aux variations en basse fréquence pour le suivi de croissance, ce qui correspond d'ailleurs à la méthode mise au point par le chercheur W. Coulter, ayant mené au développement d'appareils permettant le comptage et la mesure du volume de cellules en suspension dans un électrolyte [Gawad, Cheung et al., 2004].

En ce qui concerne les mesures dans le milieu de culture (figure 5.19,b), réalisées chaque jour juste avant les mesures dans le milieu Hépès, on constate qu'il n'y a pas d'écart significatif sur le module de l'impédance après 10 kHz, comme on s'y attendait, alors qu'en basse fréquence, la normalisation des mesures permet de faire apparaître une évolution significative de ΔZ_{norm} au cours de la croissance des sphéroïdes. Si on compare les évolutions en basse fréquence (figure

5.19,d représentant l'évolution de ΔZ_{norm} moyen sur la plage de 100 à 1000 Hz), on remarque même que les évolutions sont relativement proches dans les deux milieux. Cela démontre une nouvelle fois l'intérêt de la mesure différentielle, qui permet le suivi de croissance même dans un milieu conducteur alors que d'après les mesures préliminaires réalisées sur des cellules en suspension, cela n'était pas précis sans mesure relative (voir figure 5.13,a). De plus, cette croissance des sphéroïdes est bien confirmée par l'observation au microscope optique (figure 5.19,c).

Par ailleurs, les mesures effectuées pendant 2 jours lors de l'expérience 1, même s'il n'y avait pas d'Hépès dans le milieu de culture, sont similaires à celles obtenues dans l'expérience 2 (figure 5.19,d), ce qui montre une reproductibilité de ces variations liées à la présence des sphéroïdes. Ces résultats en termes d'évolution de ΔZ_{norm} avec la croissance sont cohérents avec ceux obtenus par d'autres équipes ayant réalisés des travaux similaires, mais sur des sphéroïdes produits de manière aléatoire, par l'agrégation de cellules dans une matrice de Matrigel [Pan et al., 2019] ou sur une surface limitant l'adhésion des cellules [Lei et al., 2017].

5.3.3 Caractérisation de l'effet de la perméabilisation des sphéroïdes sur la mesure d'impédance

Afin de réaliser un premier essai de caractérisation de l'impact de l'état physiologique des sphéroïdes sur le suivi par impédance, un agent perméabilisant TritonX-100 (TX) a été ajouté à l'issue des trois jours de suivi de croissance sous perfusion. Le TritonX-100 est un détergent utilisé en biologie pour la lyse des cellules, capable de perméabiliser les cellules et de changer leur morphologie, voire d'entraîner leur mort par nécrose, quand il est ajouté avec une forte concentration [H. Wu et al., 2018].

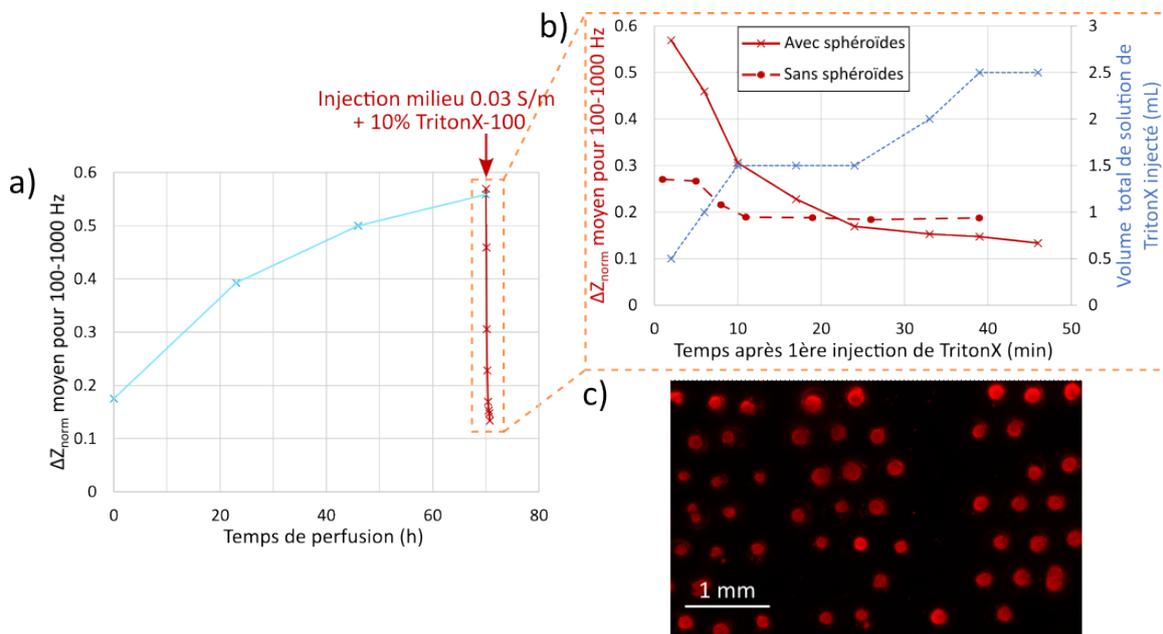


FIGURE 5.20 – Effet du TritonX-100 sur le suivi de sphéroïdes par impédance. (a) Courbe de croissance en basse fréquence pour les mesures réalisées dans le milieu Hépès 0.03 S/m (bleu) et effet de l'injection de milieu Hépès avec 10% de TritonX-100 (rouge). (b) Zoom sur l'effet de la solution de TritonX-100 au cours de son injection dans le microsysteme en présence ou en absence de sphéroïdes dans l'hydrogel. (c) Image réalisée en épifluorescence ($\times 2.5$) du marquage de la viabilité des sphéroïdes 40 min après l'ajout de TritonX-100. Rouge = IP, Vert = FDA.

Lors du troisième jour de suivi de l'expérience 2, 10% de TritonX-100 (en volume) ont été ajoutés au milieu Hépès de conductivité 0.03 S/m, ce qui augmente légèrement la conductivité

à 0.035 S/m. On injecte ensuite un volume total de 2.5 mL de cette solution, en réalisant un suivi par impédance pendant environ 40 minutes. On observe alors une évolution de ΔZ_{norm} en basse fréquence, puisque sa valeur est liée à la présence des sphéroïdes dans l'hydrogel. La figure 5.20,a montre que l'impact du TX sur ΔZ_{norm} est significatif, puisqu'une chute de 0.55 à 0.13 est observée sur une échelle de temps très courte par rapport au suivi de croissance.

Si l'on s'intéresse plus en détails à cet impact (figure 5.20,b), on constate que l'effet du TX semble se stabiliser au bout d'une vingtaine de minutes. Le temps caractéristique de ce phénomène est similaire à celui observé par d'autres équipes ayant réalisé des études similaires, mais sur sphéroïde unique [H. Wu et al., 2018, Curto et al., 2018] (respectivement en 15 et 25 minutes).

Afin de s'assurer que l'effet mesuré sur l'impédance est bien dû à l'ajout du TX, plusieurs vérifications sont effectuées. Des mesures sont réalisées sur un hydrogel sans sphéroïdes, dans les mêmes conditions expérimentales (figure 5.20,b, courbe en pointillés). On observe une chute de l'impédance normalisée pendant les 10 premières minutes, que l'on peut attribuer au changement de conductivité induit par l'ajout de TX dans le milieu, puisqu'avant son injection, les chambres du microsystème étaient remplies avec un milieu Hépès de conductivité 0.03 S/m. Par la suite, l'impédance normalisée se stabilise autour d'une valeur proche de celle atteinte au bout de 20 minutes en présence de sphéroïdes.

De plus, des observations au microscope à épifluorescence sont réalisées après un marquage de la viabilité des cellules à l'issue de l'expérience (figure 5.20,c). Elles montrent que tous les sphéroïdes sont perméabilisés de manière irréversible, puisqu'aucune cellule n'apparaît en vert, donc tous les sphéroïdes sont morts. Ces résultats montrent que l'impact du TX sur les sphéroïdes est bien présent, à savoir que les sphéroïdes sont perméabilisés chimiquement, ce qui entraîne leur mort. Cet effet du TX entraîne une chute de l'impédance normalisée, jusqu'à atteindre une valeur proche de celle mesurée en l'absence de sphéroïdes. Cela signifie que le système permet d'avoir une mesure globale de l'état des sphéroïdes, avec une augmentation de ΔZ_{norm} lorsque les sphéroïdes grossissent, et une diminution lorsqu'il y a une atteinte à leur viabilité. Cela tend à confirmer la capacité du microsystème à évaluer en temps réel l'état des sphéroïdes cultivés sans avoir besoin de les observer et donc de sortir le microsystème de l'incubateur.

Si on compare ces résultats à ceux obtenus par les deux équipes citées précédemment [H. Wu et al., 2018, Curto et al., 2018], étant donné qu'elles ont travaillé sur sphéroïde unique, elles ont pu mettre en avant une augmentation de la conductivité du sphéroïde lors de l'ajout de TX. Dans notre cas, comme la mesure est globale, il ne semble pas possible d'avoir cette indication d'augmentation de la conductivité des sphéroïdes lors de la lyse des cellules par le TX. En effet, on observe une diminution de ΔZ_{norm} ce qui correspond, si on regarde la mesure absolue, à une augmentation de l'impédance de la chambre contenant les sphéroïdes, donc une diminution de sa conductivité. Comme souligné par [De Leon et al., 2021], ΔZ_{norm} doit être manipulé avec précautions surtout lorsqu'on travaille sur des structures 3D. Il faut notamment utiliser des contrôles reproductibles car des phénomènes complexes peuvent avoir lieu, en particulier en présence de matrice pour cultiver les cellules, dont les propriétés peuvent être modifiées par ces dernières. Dans le cas présent, il a été montré que la matrice utilisée pour cultiver les sphéroïdes, l'hydrogel d'agarose, n'avait pas d'influence sur la mesure au moins en basse fréquence. En revanche, l'interprétation physique des résultats nécessite de comprendre la signification d'une évolution de l'IC. Ici on peut dire que l'impact de la lyse cellulaire des sphéroïdes par le TX revient à retrouver une impédance quasi équivalente à celle observée en l'absence de sphéroïdes, donc à avoir une conductivité équivalente globale de la chambre contenant les sphéroïdes morts plus faible qu'en présence de sphéroïdes non traités, comme s'il n'y avait plus de sphéroïdes dans la chambre.

On s'intéresse alors plus en détails aux valeurs d'impédance en basse fréquence avant et après ajout de TX (figure 5.21). Les mesures montrent qu'il existe bien des variations uniquement lorsque des sphéroïdes sont présents dans l'hydrogel, ce qui confirme que l'évolution de ΔZ_{norm} mesurée est due à leur présence.

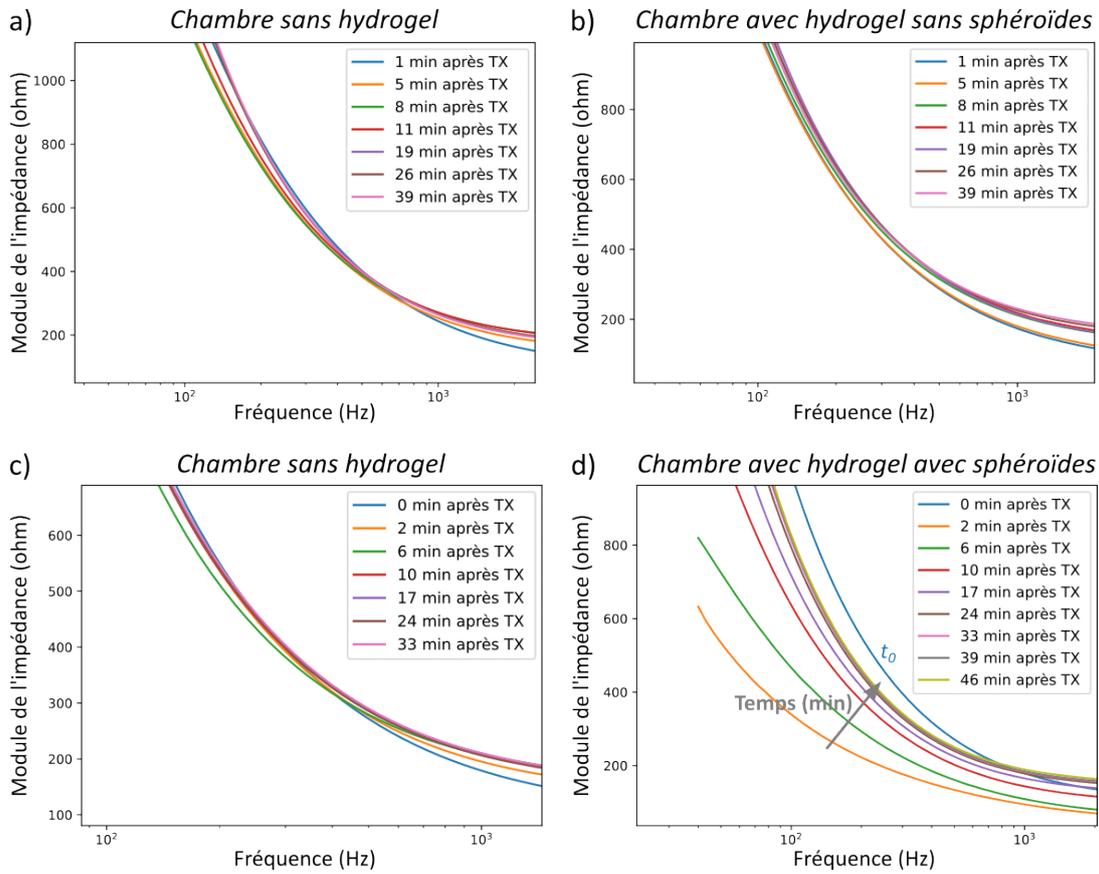


FIGURE 5.21 – Suivi de l'impédance en basse fréquence avec les IDE en or (IDE-250) dans le microsysteme double chambre lors de l'injection d'une solution à 10% de TritonX-100. Mesures dans la chambre contrôle (a) et dans la chambre avec hydrogel (b) lors de l'expérience sans sphéroïdes. Mesures dans la chambre contrôle (c) et dans la chambre avec hydrogel (d) lors de l'expérience avec sphéroïdes.

De plus, pour les mesures réalisées dans la chambre avec sphéroïdes (figure 5.21,d), si on compare la courbe avant ajout de TX (courbe bleue) et celle 2 min après ajout de TX (courbe orange), on constate qu'il y a d'abord une chute de l'impédance avant qu'elle n'augmente pour atteindre une valeur proche de celle obtenue dans la chambre contrôle sans cellules. Cette diminution initiale de l'impédance pourrait être liée à une augmentation de la conductivité dans la chambre, qui serait cohérente avec la perméabilisation des cellules et donc le déversement de leur cytoplasme de conductivité élevée (environ 0.2 S/m [L. Wu et al., 2012]) dans la chambre. Étant donné que l'on continue à injecter du milieu contenant du TX, afin d'être sûr que le milieu est bien changé dans toute la chambre y compris dans l'hydrogel, cela peut contribuer à expliquer l'augmentation de l'impédance mesurée ensuite, puisque le contenu des cellules déversé dans la chambre a pu être éliminé par injection, ce qui n'est pas le cas pour les études précédemment citées pour lesquelles le sphéroïde étudié est directement introduit dans un milieu contenant du TX. Le comportement au bout de 30 min apparaît alors comme cohérent avec le fait que les cellules soient totalement perméabilisées et vidées de leur cytoplasme conducteur, et donc que l'impédance soit proche de celle mesurée sans cellules, ce qui donne un ΔZ_{norm} proche de 0, puisque les sphéroïdes n'ont alors qu'un très faible impact sur la conductivité et donc sur l'impédance de la chambre.

Une expérience de contrôle est également réalisée sur une suspension de cellules HT29 afin d'avoir un échantillon biologique plus simple, et les résultats montrent que le comportement mesuré lors de l'ajout de TX dans la suspension est bien similaire à celui du même milieu sans cellules (voir annexe N), traduisant la perméabilisation irréversible des cellules et le fait qu'elles n'influencent plus la valeur d'impédance. Dans tous les cas, cette expérience sur sphéroïdes remplit bien l'objectif initial qui était de démontrer la fonctionnalité du microsysteme pour détecter un effet sur l'état physiologique des sphéroïdes par mesure d'impédance.

5.4 Étude de l'effet de l'électroporation sur les sphéroïdes par suivi d'impédance

L'étude précédente a permis d'évaluer l'effet d'une lyse définitive des cellules sur la mesure d'impédance, mais étant donné que l'application visée ici est l'étude de l'ECT de sphéroïdes, basée sur une EPN réversible des cellules, il apparait intéressant de se pencher sur l'impact d'une perméabilisation temporaire des cellules par EPN sur l'impédance.

Pour cela, on réalise un suivi d'impédance dans le microsysteme équipé d'une chambre de culture avec les IDE-200, le microsysteme avec deux chambres ne pouvant pas être utilisé dans la configuration EPN pour le moment à cause de problèmes d'étanchéité. Deux expériences sont réalisées sur des sphéroïdes de cellules HT29, une avec bléomycine et une sans, avec le protocole d'EPN déterminé au chapitre 3 (2 impulsions sinusoïdales séparées de 1s, 300 V_{pp} , 10 kHz, 5 ms), et en utilisant la configuration avec les IDE court-circuitées et une électrode pleine plaque en ITO parallèle aux IDE, comme présenté sur la figure 5.3. L'EPN est réalisée après avoir effectué le changement du milieu de culture vers le milieu d'EPN sous perfusion. Des mesures d'impédance sont ensuite réalisées en utilisant les IDE uniquement. Il y a donc un délai entre l'EPN et les mesures d'impédance, le temps de changer la configuration électrique (1 min). Ces mesures sont normalisées par rapport à l'impédance mesurée avant EPN.

Les résultats montrent qu'en basse fréquence (figure 5.22,a) l'impédance chute d'abord de 3 à 4% par rapport à sa valeur avant EPN, puis augmente pendant environ 10 min pour atteindre une valeur légèrement supérieure (2 à 3%) à sa valeur avant EPN. Le comportement pour l'EPN avec et sans bléomycine est similaire. En ce qui concerne le comportement sur le plateau résistif, on observe également une chute d'impédance après EPN, mais celle-ci est plus importante dans le cas avec bléomycine. L'impédance augmente ensuite pendant 10 min avant de se stabiliser autour de 92% de sa valeur avant EPN pour l'expérience avec bléomycine et 99% pour l'expérience sans bléomycine. En ce qui concerne la zone du plateau, ce comportement se retrouve bien lorsqu'on réalise des mesures sur un modèle biologique plus simple, qui est celui d'une suspension cellulaire, et il est absent si on réalise des mesures après EPN dans le microsysteme ne contenant pas de cellules (voir annexe O).

L'évolution globale de l'impédance tend donc à montrer qu'il y a une augmentation de la conductivité dans la chambre juste après EPN, avec un retour à une valeur proche de la valeur initiale en 10 min environ. Cette évolution est cohérente avec le fait que la conductivité des cellules augmente lorsqu'elles sont perméabilisées, puisqu'il y a une atteinte à leur membrane peu conductrice, et est également en accord avec les travaux de [Z. Zhang et al., 2020], qui portent sur l'étude de différents paramètres du protocole d'EPN sur cellules uniques par impédance. Cette équipe montre qu'il existe une chute d'impédance à 100 kHz dans la minute qui suit l'EPN, qui semble caractériser l'efficacité d'EPN, puis une stabilisation en 5 min autour d'une valeur proche de l'impédance avant EPN, traduisant la mortalité induite par le protocole d'EPN (plus la valeur finale est éloignée de la valeur avant EPN, plus le protocole induit une

mortalité élevée). Dans notre cas, la variation d'impédance entre avant et après EPN est bien plus faible, car la mesure est globale sur plusieurs centaines de sphéroïdes, mais la tendance reste la même. Il faudrait toutefois répéter l'expérience afin de confirmer la différence d'impédance finale sur le plateau pour le cas avec bléomycine, qui pourrait être lié à l'impact de cette molécule sur les cellules.

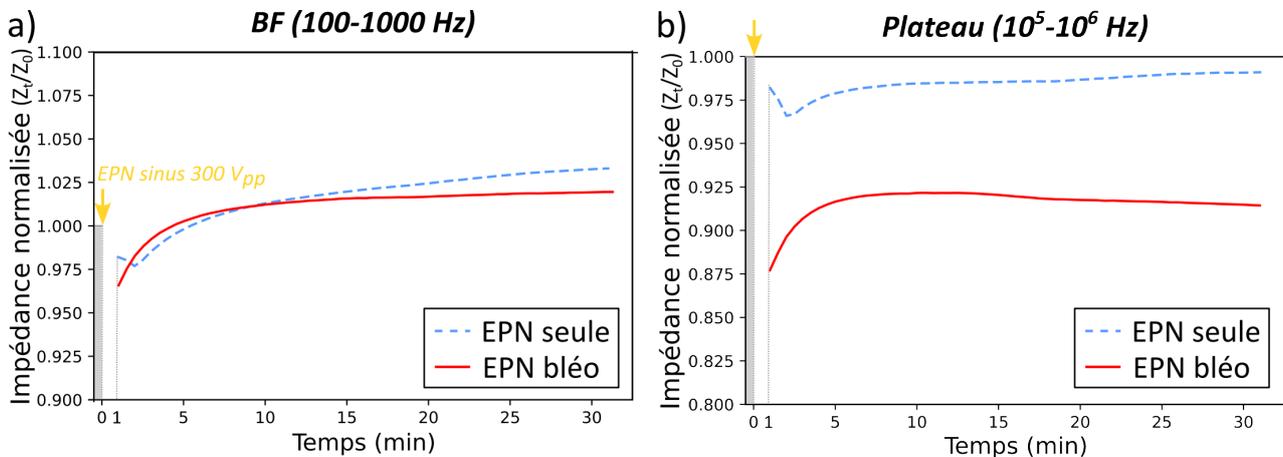


FIGURE 5.22 – Évolution du module de l'impédance moyen mesuré avec les IDE-200 à un temps t (Z_t) après EPN, normalisé par rapport à celui avant EPN (Z_0), sur des sphéroïdes de cellules HT29 à 3 jours de culture pour des expériences avec ou sans bléomycine (bléo, 14 μ M) (a) en basse fréquence (100-1000 Hz) et (b) sur le plateau (10^5 - 10^6 Hz).

Après avoir réalisé l'EPN et le suivi par impédance, le milieu est changé sous perfusion pour que les sphéroïdes soient dans du milieu de culture contenant 25 mM d'Hépès et le microsystème est placé dans l'incubateur avec un pousse-seringue à 20 μ L/h (voir protocole décrit dans la partie 5.3.1). Les sphéroïdes sont suivis pendant 3 jours, avec une mesure dans le milieu de faible conductivité par jour et des observations au microscope optique, rendues possibles par la simplicité du montage fluide comme le système n'est composé que d'une seule chambre. Cela permet de calculer le ratio de croissance représentant l'évolution du diamètre des sphéroïdes après EPN (J_1 à J_3) normalisé par celui avant EPN (J_0), et de le comparer au ratio de croissance obtenu par mesure d'impédance. Ce dernier est calculé à partir du module de l'impédance moyen sur la plage de fréquences 100 kHz - 1 MHz, afin d'observer des variations mesurables de l'impédance dans le temps, puisqu'il n'y a pas dans ce cas de chambre contrôle sans sphéroïdes. Étant donné que l'on s'attend à une décroissance du module de l'impédance dans le temps, correspondant à une augmentation de la conductivité, liée à la proportion plus importante des sphéroïdes dans la chambre lors de leur croissance, on calcule le ratio de l'impédance avant EPN (J_0) sur celle à J_1 , J_2 ou J_3 , afin d'obtenir un ratio de croissance qui augmente dans le temps. En effet, sur cette plage de fréquences, les cellules HT29 "homogénéisées" ayant, comme expliqué dans la partie "discussion" de la section 5.2.3, une conductivité largement supérieure à celle du milieu de mesure utilisé, il est cohérent d'observer une augmentation de la conductivité donc une diminution de l'impédance avec la croissance des sphéroïdes.

Les résultats, présentés sur la figure 5.23, montrent que les courbes obtenues par les deux méthodes sont similaires, si on prend en compte uniquement les mesures d'impédance dans le milieu EPN (figure 5.23,a et c), ce qui démontre une nouvelle fois l'intérêt de la diminution de la conductivité pour la mesure, et permet surtout de confirmer par la méthode optique plus classique que les résultats obtenus par impédance sont cohérents avec la croissance réelle des sphéroïdes. Pour les mesures dans le milieu de culture, l'impédance n'évolue que très peu d'un jour à l'autre, notamment à cause de sa faible valeur, et la courbe de croissance n'est donc pas exploitable car pas en accord avec les mesures optiques et donc avec la croissance réelle des

sphéroïdes. En ce qui concerne l'expérience avec bléomycine (figure 5.23,b et d), on observe bien une stagnation de la croissance, induite par l'anticancéreux, de manière analogue à ce qui avait été obtenu au chapitre 3 sur des sphéroïdes de cellules HT29 également, mais qui n'étaient pas cultivés sous perfusion. L'effet de la bléomycine est aussi confirmé par un marquage de la viabilité à l'issue de l'expérience (figure 5.23,e-g), puisque la mortalité est plus de deux fois supérieure pour les sphéroïdes électroporés en présence de bléomycine, en comparaison avec ceux électroporés sans.

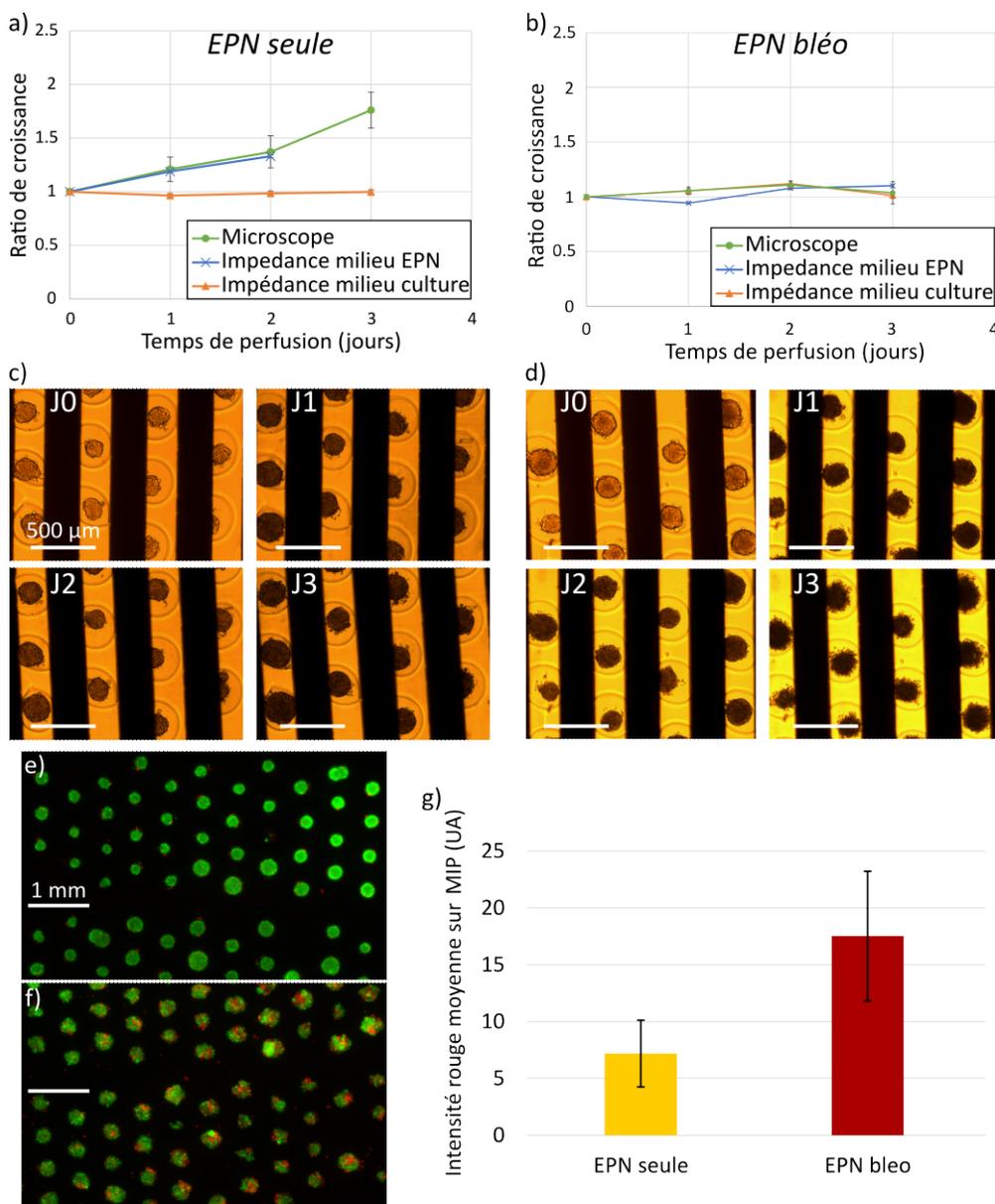


FIGURE 5.23 – Comparaison du suivi optique et par impédance pour l'étude de l'impact de l'EPN avec et sans bléomycine sur des sphéroïdes de HT29. Ratios de croissance obtenus en normalisant les mesures d'impédance ou de diamètre des sphéroïdes par celle avant EPN pour l'EPN seule (a) et l'EPN en présence de bléomycine 14 μM (b). Barre d'erreur = écart-type pour les mesures au microscope et erreur obtenue lors de la caractérisation du système pour les mesures d'impédance (très peu visible). Images réalisées au microscope optique ($\times 4$) lors de la croissance des sphéroïdes après EPN seule (c) ou EPN avec bléomycine (d). Images au microscope à épifluorescence ($\times 2.5$) après marquage de la viabilité des sphéroïdes 3 jours après EPN seule (e) ou EPN avec bléomycine (f) et quantification de la mortalité (g). Rouge = IP, Vert = FDA, Moyenne et écart-type standard, $N = [150 \text{ à } 200]$ sphéroïdes/condition, une expérience.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis d'illustrer une nouvelle fonctionnalité du microsystème : la mesure d'impédance. Pour rendre possible cette mesure, il a d'abord fallu réaliser des adaptations technologiques, notamment en utilisant des électrodes interdigitées en or à la place des électrodes pleines plaques parallèles en ITO, afin d'en améliorer la sensibilité

dans la zone où sont situés les sphéroïdes. Cette modification a dû être faite tout en conservant la possibilité de réaliser l'EPN, en court-circuitant les IDE et en utilisant une contre-électrode. La caractérisation du microsysteme en tant qu'outil de mesure d'impédance a également été effectuée, montrant que la température est un paramètre important à surveiller lors des expérimentations, et montrant également une bonne répétabilité des mesures avec une faible erreur sur la plage correspondant à un plateau résistif (100 kHz - 1 MHz), et même en basse fréquence (100 - 1000 Hz) si on considère l'erreur relative. Il a aussi été démontré expérimentalement que le microsysteme permettait bien de remonter à la conductivité d'un électrolyte connu à partir des mesures d'impédance. Cette mesure a permis de déterminer expérimentalement la valeur de la constante liée à la géométrie des électrodes, très proche de la valeur théorique (erreur de seulement 3%), pour des conductivités relativement faibles. Cela présageait des résultats obtenus lors de mesures d'impédance sur des suspensions cellulaires, constituant un premier modèle cellulaire moins complexe que les sphéroïdes, à savoir que la détection de la présence de cellules et de leur proportion dans un milieu est plus précise lorsque sa conductivité est faible. Ces résultats sur les suspensions cellulaires ont également permis de démontrer la meilleure précision de mesure des IDE, puisqu'elles conduisent à l'observation de la dispersion β sur la courbe d'impédance, caractéristique des échantillons biologiques.

Des travaux sur sphéroïdes ont ensuite pu être menés, après la mise au point du protocole de culture sous perfusion, nécessitant notamment l'ajout d'Hépès (25 mM) dans le milieu de culture pour remplacer l'effet tampon du CO_2 de l'incubateur. Les premières expériences ont mis en avant la possibilité de suivre la croissance des sphéroïdes sur plusieurs jours, ce qui a été confirmé par observations optiques. Il a également été possible de détecter par impédance l'effet néfaste sur les cellules d'un agent perméabilisant, le TritonX-100. Enfin, une dernière expérience combinant toutes les fonctionnalités du microsysteme développées au cours de cette thèse a été effectuée : un suivi de l'effet de l'EPN sur les sphéroïdes et de leur croissance avec ou sans traitement d'ECT à base de bléomycine. Les résultats obtenus semblent montrer que l'effet de l'EPN sur la conductivité des sphéroïdes est détectable par impédance, avec une augmentation de cette dernière dans les premières minutes après l'EPN, puis une augmentation avec stabilisation autour d'une valeur légèrement inférieure à la valeur avant EPN en une dizaine de minutes. Le suivi de croissance par approche multimodale (microscope et impédance) a également confirmé de manière quantitative la pertinence de la mesure d'impédance pour le suivi de croissance.

Les deux améliorations présentées dans ce chapitre, qui ont permis d'augmenter la sensibilité de la mesure d'impédance, sont donc le changement des électrodes (matériau, configuration et géométrie) et la diminution de la conductivité du milieu de mesure, permettant notamment une augmentation de la résistance de la chambre et donc de la variation relative due à la présence des cellules. Les résultats obtenus ont toutefois montré les limites du microsysteme actuel, que ce soit en termes de conception et d'étanchéité, et il serait nécessaire de répéter certaines expériences notamment le suivi d'impédance après EPN. Les travaux futurs devront donc être concentrés sur l'amélioration de la sensibilité de la mesure, notamment en allant vers une mesure individuelle de l'impédance en utilisant des électrodes structurées de type réseau de micro-électrodes (MEA). Un projet en ce sens, financé par le CNRS dans le cadre de la "Mission pour les initiatives transverses et interdisciplinaires" (MITI), a d'ailleurs été accepté en 2023.

Par ailleurs, de futurs travaux sont également nécessaires pour améliorer la compréhension des résultats de mesure d'impédance sur les suspensions cellulaires et les sphéroïdes. En effet, des variations contraires à ce qui est attendu ont été observées pour les mesures sur sphéroïdes et les mesures sur suspension sur les électrodes pleines plaques pour des fréquences inférieures à 10^5 Hz, avec une diminution de l'impédance donc une augmentation de la conductivité, alors que le comportement capacitif des membranes domine à ces fréquences. Il pourrait être intéressant de

faire des mesures d'impédance sur d'autres types cellulaires que les cellules HT29, qui présentent des caractéristiques électriques les distinguant d'autres types cellulaires (fréquence de *crossover* en DEP décalée vers les basses fréquences), telles que les HEK 293 également disponibles au laboratoire par exemple. Il est toutefois important de souligner que les conditions de mesures utilisées ici sont différentes de celles utilisées habituellement dans la littérature, puisque le milieu de mesure a une faible conductivité (0.03 S/m) par rapport à celle du milieu de culture (1.2 S/m).

CHAPITRE 6

CONCLUSION ET PERSPECTIVES : EXTENSION DU MICROSYSTÈME À L'ÉTUDE DU TRANSFERT DE GÈNES PAR ÉLECTROPORATION

Sommaire

6.1	Conclusion générale	136
6.2	Perspectives	138
6.2.1	Complexification du modèle cellulaire pour l'étude de l'ECT	138
6.2.2	Amélioration de la mesure d'impédance et modélisation des propriétés électriques des cellules	139
6.2.3	Vers l'étude de l'électrotransfert de gènes sur sphéroïdes	141

6.1 Conclusion générale

Les multiples applications de l'électroporation (EPN) dans le domaine de la santé motivent les recherches de modèles cellulaires et de systèmes permettant de l'étudier *in vitro*, afin d'améliorer les traitements basés sur cette méthode physique de perméabilisation des cellules. Dans ce contexte, il s'agissait dans cette thèse de développer un microsystème permettant d'étudier l'EPN et ses applications, en particulier l'électrochimiothérapie (ECT), sur des agrégats 3D de cellules nommés sphéroïdes. Ce modèle cellulaire a en effet gagné de l'intérêt au cours des dernières décennies car il représente une échelle intermédiaire entre les cellules 2D et les tissus *in vivo*, permettant de prendre en compte les interactions intercellulaires, pour avoir un modèle plus proche de l'*in vivo*, et ainsi contribuer à réduire l'utilisation de modèles animaux. Ce dispositif est le fruit d'une collaboration entre l'équipe Bio-Ingénierie du laboratoire Ampère, pour la partie microsystème et caractérisation électrique, et de l'Institut Lumière Matière (ILM), pour la technique brevetée de production et culture des sphéroïdes dans des micropuits en hydrogel d'agarose, et pour le suivi par imagerie. Les avantages de ce système en comparaison avec les méthodes existantes de production et EPN de sphéroïdes sont principalement la possibilité de réaliser la culture et l'EPN *in situ* de plusieurs centaines de sphéroïdes réguliers en parallèle, soumis à un champ homogène, et leur suivi par une approche multimodale reposant sur des mesures optiques (épifluorescence, confocal) et électriques (bio-impédance).

Dans un premier temps, un travail d'amélioration du microsystème a été réalisé, pour permettre notamment des meilleurs contacts électriques et un montage plus facile du système, en utilisant des techniques de prototypage rapide comme la découpe laser et en fabriquant des PCB. Ce nouveau microsystème fabriqué a ensuite été caractérisé, d'un point de vue électrique et fluide. Les pertes électriques le long des couches transparentes et relativement conductrices d'oxyde d'indium étain (ITO) qui recouvrent les lames de verre formant la chambre microfluidique contenant les sphéroïdes ont été estimées par des mesures d'impédance. Pour cela, le modèle électrique équivalent du système a été déterminé afin d'estimer ces pertes, qui sont de l'ordre de 15%. Le microsystème a également été modélisé à l'aide du logiciel COMSOL, après caractérisation de l'épaisseur et de la conductivité des électrodes. Ceci a permis de mettre en évidence l'homogénéité de la distribution du champ électrique appliqué dans la chambre fluide (moins de 1% de variation d'intensité), ce qui garantit une bonne reproductibilité des paramètres d'EPN et assure que tous les sphéroïdes sont soumis au même champ électrique. Pour compléter la caractérisation du dispositif, une étude de la diffusion du milieu dans l'hydrogel a été réalisée par mesure d'impédance et par modélisation sur le logiciel COMSOL, permettant de définir le protocole de changement de milieu dans la chambre fluide. En effet, il est nécessaire d'injecter du milieu dans la chambre contenant les sphéroïdes pour introduire les anticancéreux à tester mais également pour réduire la conductivité, en passant du milieu de culture (1.3 S/m) au milieu de faible conductivité à base d'Hépès et de sucrose (0.03 S/m), afin d'éviter des dégradations des électrodes par réactions électrochimiques et également un échauffement par effet Joule. Cet échange de milieu est réalisé par convection du flux au-dessus de l'hydrogel et par diffusion des ions à travers les pores nanométriques à l'intérieur de l'hydrogel, ce qui prend du temps, d'où l'importance de le caractériser. Il permet de s'assurer que toutes les expériences d'EPN sont réalisées dans un milieu de même conductivité.

Les expériences se sont ensuite concentrées sur la détermination des paramètres d'EPN. Le protocole testé ici consiste en des impulsions sinusoïdales permettant l'utilisation d'électrodes en ITO transparentes, grâce à la bipolarité du signal évitant les dommages électrochimiques. Il a également été démontré que ce type d'impulsion était efficace pour délivrer de petites molécules dans les cellules grâce à l'EPN. Les résultats ont montré que le seuil pour une EPN réversible correspondait à une norme du champ électrique perçu par les sphéroïdes de 600 V_{RMS}/cm , et que la mortalité pour des champs de 600 à 900 V_{RMS}/cm était très faible (moins de 3%). Ces

résultats ont été approfondis avec l'étude de l'efficacité d'EPN pour une gamme de champ allant de 300 à 900 V_{RMS}/cm . Cette étude a été réalisée par microscopie confocale, qui permet une analyse plus précise que le microscope à épifluorescence utilisé pour les expériences précédentes. Les résultats ont montré que la tension la plus élevée, correspondant à un champ de 900 V_{RMS}/cm , est la plus efficace, même au cœur du sphéroïde, puisque l'imagerie confocale permet des analyses dans le volume du sphéroïde. Une première application a ensuite été réalisée : l'étude de l'effet d'un médicament anticancéreux bien connu pour les applications ECT, la bléomycine, sur des sphéroïdes de cellules cancéreuses colorectales HT29. Cette étude a montré que, conformément à la littérature, ce traitement ECT a pour effet d'inhiber la croissance et la prolifération des sphéroïdes, et de diminuer fortement la viabilité des cellules en quelques jours. Par ailleurs, pour les contrôles EPN seule et anticancéreux seul réalisés, il n'a pas été observé d'effet significativement différent sur la croissance et la prolifération par rapport à un contrôle non traité. Ces résultats démontrent la fonctionnalité du dispositif en tant que plateforme de test de traitement ECT sur des structures cellulaires 3D *in vitro*.

Dans un deuxième temps, les travaux ont porté sur la complexification du modèle biologique utilisé, les sphéroïdes, dans le cadre du projet Inter-Carnot Impulse, portant sur l'amélioration du traitement du cancer du pancréas par des méthodes physiques, en collaboration avec l'AP-HP. En effet, l'environnement d'une tumeur a une grande importance *in vivo* sur le développement et la chimiorésistance d'un cancer. Nous avons donc cherché à l'intégrer dans les sphéroïdes, en produisant des sphéroïdes en co-culture de cellules cancéreuses du pancréas (PANC1) et de fibroblastes (MRC5). L'immunomarquage a démontré la synthèse d'un réseau dense de protéines de fibronectine, produites par les fibroblastes, dans l'espace extracellulaire des sphéroïdes en 7 jours. Deux médicaments anticancéreux ont été comparés, la bléomycine et la gemcitabine, un médicament classiquement utilisé en chimiothérapie pour traiter le cancer du pancréas. Les résultats montrent que l'effet sur la viabilité des sphéroïdes est plus rapide pour la bléomycine (3 jours) que pour la gemcitabine (7 jours) mais que l'effet sur la prolifération apparaît en 1 à 2 jours pour les deux médicaments. Malgré les difficultés liées au temps nécessaire à la production de sphéroïdes en co-culture, les premiers tests étudiant l'impact de la matrice extracellulaire synthétisée sur l'efficacité de l'ECT avec la bléomycine ont montré une efficacité légèrement inférieure pour les sphéroïdes en co-culture. Des développements sont toutefois nécessaires pour améliorer le modèle en produisant une matrice extracellulaire plus dense.

En parallèle, l'adaptation du microsystème à la mesure d'impédance a été réalisée, afin de permettre un suivi multimodal des sphéroïdes, par des méthodes optiques et de caractérisation électrique. En effet, les propriétés électriques d'un tissu dépendent de la fréquence, en raison de la faible conductivité de la membrane cellulaire séparant les milieux extracellulaire et intracellulaire. L'objectif ici est de permettre le suivi par impédance de la croissance des sphéroïdes, puisque leur croissance augmente la fraction volumique globale en cellules dans la chambre de mesure, modifiant ainsi les propriétés électriques. Il a tout d'abord été montré que le microsystème permettait de détecter une variation de fraction volumique de cellules en suspension de 1 à 3% grâce à l'utilisation de milieu faiblement conducteur, utilisé précédemment pour l'EPN. Nous avons donc envisagé de changer de milieu au moment de la mesure d'impédance, puisque les sphéroïdes ne peuvent être cultivés que dans un milieu plus conducteur. Des travaux ont également été menés sur la conception des électrodes afin de permettre une mesure plus précise. La configuration choisie, en accord avec la littérature, est la configuration d'électrodes interdigitées (IDE) coplanaires, qui permet d'obtenir une bonne sensibilité dans la zone située au-dessus des électrodes, où se trouvent les sphéroïdes. Pour atteindre l'objectif de suivi de croissance, des premiers tests de culture de sphéroïdes dans le microsystème ont été réalisés sous perfusion de milieu de culture dans l'incubateur. Ils ont permis de mettre en évidence les défis restants, en particulier le manque de robustesse de l'expérience et le manque de précision de la mesure,

qui doivent être améliorés. Une piste explorée a été l'utilisation d'une mesure différentielle de l'impédance, pour éviter les perturbations externes sur la mesure, en développant un microsystème avec deux chambres de mesure, l'une pour le contrôle (sans sphéroïdes) et l'autre pour la culture des sphéroïdes. Les premières expériences ont montré qu'il était possible de suivre la croissance des sphéroïdes avec cette technique et de caractériser l'effet d'un agent chimique perméabilisant, le TritonX-100, comme première étape vers le suivi de l'effet de l'EPN. Il a ensuite été possible de mesurer l'impact de l'EPN sur la mesure de bio-impédance. Des résultats préliminaires comparant le suivi par méthode optique et la mesure de bio-impédance après EPN en présence ou non de bléomycine ont démontré une bonne corrélation entre les mesures électriques et optiques, permettant de faire une démonstration de la combinaison de toutes les fonctionnalités développées pour ce microsystème.

6.2 Perspectives

Les travaux menés au cours de cette thèse ont débouché sur de nouvelles pistes de recherches qui pourraient être exploitées dans le futur, et qui sont décrites dans les paragraphes suivants.

6.2.1 Complexification du modèle cellulaire pour l'étude de l'ECT

Le modèle cellulaire permettant d'étudier l'EPN et l'ECT a été complexifié au cours de cette thèse, en passant de sphéroïdes monotypiques de 200 μm de diamètre maximal, à des sphéroïdes en co-culture de 300 μm . Toutefois, le TME étant un des éléments clés responsable de la résistance aux traitements chimiothérapeutiques, il est nécessaire de développer des modèles cellulaires permettant de mieux reproduire l'organisation *in vivo*. De plus, en allant vers ces modèles plus complexes, le comportement *in vitro* se rapprochera de celui observé *in vivo*, ce qui pourrait favoriser le passage de l'un à l'autre en ce qui concerne l'étude de l'ECT (protocoles d'EPN, dosage).

Dans notre cas, les perspectives envisagées sont l'utilisation de micropuits de plus grand diamètre, 500 μm à 1 mm, permettant d'aller vers des sphéroïdes plus gros, présentant une structure plus proche des tumeurs avascularisées (avec une couche périphérique proliférative, une couche intermédiaire de cellules quiescentes et un cœur nécrotique) et un suivi de croissance sur un temps plus long. Ces micropuits plus gros permettraient également d'envisager la production d'autres sphéroïdes mixtes (comportant différents types cellulaires), afin de pouvoir prendre en compte non seulement le rôle des fibroblastes, mais également d'envisager des modèles avec des cellules du système immunitaire ou des cellules endothéliales, pour recréer un TME mimant mieux la barrière physiologique. Il pourra également être intéressant de rajouter des éléments de la MEC sur les sphéroïdes déjà formés, comme du collagène de type I par exemple, afin de favoriser l'apparition d'une sorte de capsule de matrice autour des sphéroïdes, pour étudier son impact sur l'efficacité d'EPN et de pénétration des anticancéreux. Dans le cadre de notre collaboration avec l'AP-HP, il pourra aussi être envisagé d'étudier des modèles plus proches du patient, en produisant des sphéroïdes (aussi appelés dans ce cas des tumoroïdes) directement à partir de cellules tumorales venant de biopsies de tumeurs cancéreuses. Par rapport aux méthodes existantes, l'utilisation du microsystème développé ici, intégrant les micropuits en hydrogel d'agarose pour la production des sphéroïdes, pourra être mis à profit afin de réaliser à la fois la formation, l'EPN, l'immunomarquage *in situ* et l'analyse confocale d'un grand nombre de tumoroïdes en parallèle. Au lieu de dissocier ces biopsies de tumeur pour utiliser les cellules, une autre approche *ex vivo* a également été récemment développée, se basant sur la culture durant quelques jours de tranches de quelques centaines de μm d'épaisseur de ces tissus extraits de patients [Pham et al., 2021]. Cela permettrait l'analyse des modifications du

TME induites par l'EPN de manière plus réaliste.

En allant vers des objets plus volumineux tels que ceux évoqués, il pourra également être nécessaire d'utiliser de nouvelles techniques d'analyse que celles utilisées dans cette thèse, puisque la profondeur de pénétration des méthodes optiques reste limitée malgré l'utilisation de méthodes de clarification des sphéroïdes. De plus, ces méthodes impliquent de travailler sur des échantillons fixés, ce qui réduit les possibilités d'analyse dynamique sur des objets vivants. En collaboration avec un chercheur du laboratoire Ampère, Simon Lambert, des premières pistes, reposant sur l'utilisation de techniques d'IRM et de tomographie en cohérence optique (OCT), ont été explorées, puisque de récents résultats ont montré le potentiel de cette dernière [El-Sadek et al., 2021]. De son côté, l'IRM permet d'atteindre une résolution spatiale suffisamment élevée sur de petits échantillons sans contraintes de transparence des tissus. Elle présente également un intérêt particulier pour l'évaluation continue de la structure des tissus, de l'in vitro à l'in vivo, puisque c'est une technique déjà utilisée in vivo et en clinique. Des résultats préliminaires sur des sphéroïdes produits dans des micropuits en agarose de 400 μm de diamètre et 800 μm de profondeur (figure 6.1,A), utilisant le même protocole que celui utilisé dans cette thèse, ont démontré la possibilité de détecter les sphéroïdes par IRM (figure 6.1,B et C) et même d'utiliser un mode d'imagerie en contraste dynamique avec l'OCT pour mettre en avant qualitativement l'activité métabolique de ces derniers (figure 6.1,D-G).

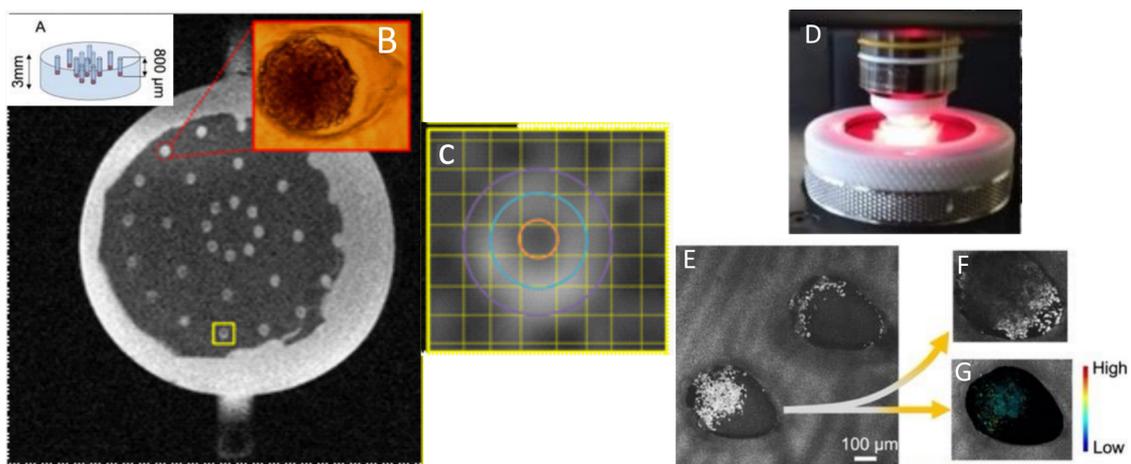


FIGURE 6.1 – Résultats préliminaires d'observation de sphéroïdes de cellules HT29 en IRM et OCT. (A) CAO du moulage en agarose utilisé pour cultiver les sphéroïdes. (B) Image pondérée T2 obtenue avec un IRM de résolution $75 \times 75 \times 400 \mu\text{m}^2$ à 7T (en 36 min) et zoom sur l'image d'un sphéroïde au microscope optique ($\times 4$). (C) Image IRM avec un zoom sur un sphéroïde et grille des régions d'intérêt dans le sphéroïde. (D) Photo du montage utilisé pour les observations en OCT sur l'échantillon d'agarose dans du milieu de culture. (E) Image OCT 2D obtenue en mode assemblage, montrant deux puits. Les cellules des sphéroïdes apparaissent en blanc. (F) Image OCT à une profondeur de pénétration plus élevée. (G) Image OCT en mode d'imagerie dynamique (DCI) pour observer le métabolisme du sphéroïde. (Images obtenues à l'Institut Langevin avec J.-M. Chassot et C. Boccaro).

6.2.2 Amélioration de la mesure d'impédance et modélisation des propriétés électriques des cellules

Partant du constat de la plus grande précision de la détection des cellules dans un milieu faiblement conducteur, mis en avant dans le chapitre 5, des recherches ont été faites concernant la modélisation de la conductivité d'une suspension cellulaire. En effet, des modèles existent dans

la littérature pour remonter aux propriétés électriques d'une cellule à partir de la conductivité d'une suspension, comme le modèle de Maxwell-Wagner présenté dans la partie 2.2.2.3. À partir des mesures d'impédance, il est possible de déduire la permittivité complexe de la solution étudiée grâce à l'équation 5.1, en utilisant la valeur de constante géométrique des électrodes K_{IDE} déterminée dans la partie 5.1.2.1. Afin de comparer cette conductivité à celle prévue par la théorie, on s'intéresse à la modélisation de la permittivité complexe d'une suspension obtenue par l'équation de Maxwell-Wagner (équation 2.9). Pour cela, on utilise le logiciel MyDEP, avec comme propriétés des cellules celles issues de l'article [L. Wu et al., 2012] (voir partie 4.3.1), une fraction volumique de 3%, et pour le milieu extérieur, une permittivité de 78 et une conductivité égale à celle du milieu Hépès à 37°C (0.0428 S/m), étant donné que les mesures sont réalisées à cette température et que la conductivité évolue avec ce paramètre. On se place ensuite dans la plage de fréquences pour laquelle on a un plateau résistif sur le module de l'impédance. Dans cette zone, l'impédance peut être modélisée par une résistance correspondant à la somme des résistances de la solution étudiée et de celle du système (contacts, électrodes). Cette résistance ne dépendant pas de la fréquence, on peut la soustraire à l'impédance mesurée sur la solution avec cellules, afin de n'avoir que la résistance correspondant à la suspension. Sa valeur pour le microsysteme utilisé a été déterminée expérimentalement dans la partie 5.1.3.5. Une fois la permittivité complexe déduite, on remonte à la conductivité du mélange grâce à l'équation 2.3.

Les résultats de la modélisation, obtenus à partir des données présentées dans la partie 5.2.3, sont visibles sur la figure 6.2. On constate que dans ce milieu de faible conductivité, la courbe de conductivité en fonction de la fréquence s'éloigne de la valeur prévue par le modèle de Maxwell-Wagner. À titre de comparaison, la conductivité d'une suspension de 4% de cellules HT29 dans du milieu Hépès de 0.03 S/m a été mesurée au conductimètre à température ambiante et la valeur obtenue est de 0.044 S/m au lieu de 0.033 S/m prévu par le modèle de Maxwell-Wagner.

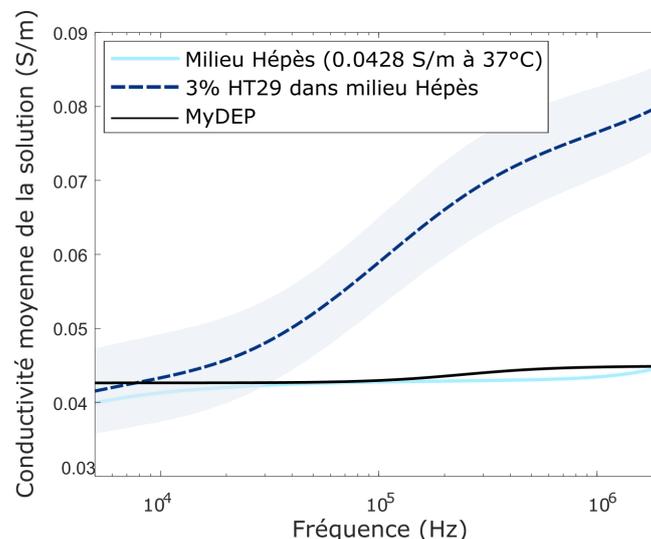


FIGURE 6.2 – Évolution expérimentale et théorique de la conductivité d'une suspension de cellules dans du milieu Hépès (0.03 S/m).

Dans la littérature, ce constat n'est que très peu voire pas rapporté. On trouve une équipe qui mentionne l'utilisation de milieu faiblement conducteur pour améliorer la mesure d'impédance, mais sans le démontrer avec des résultats puisque ce n'est pas l'objectif des travaux et sans citer de référence [Molckovsky et al., 2001]. Cette équipe justifie la nécessité du changement de milieu pour réduire la conductivité de l'espace extracellulaire en comparaison à la conductivité du milieu intracellulaire, sans que cela affecte physiologiquement les sphéroïdes. Une autre équipe a récemment travaillé sur la caractérisation électrique et la manipulation électrique par diélectrophorèse de cellules HT29 afin de les distinguer de cellules saines [Olariu et al., 2022]. Les mesures sont réalisées dans un milieu à base d'Hépès et sucrose de conductivité 0.013 S/m

pour permettre la diélectrophorèse, donc un milieu d'une conductivité proche de celle du milieu utilisé ici. Les électrodes utilisées sont des IDE espacées de 40 μm et la fraction volumique en cellules est d'environ 0.3%. Les résultats obtenus montrent qu'en l'absence de piégeage des cellules sur les électrodes, il n'y a pas de différence entre les différents types de cellules, mais lorsque les cellules sont piégées par diélectrophorèse, le module de l'impédance associé aux cellules HT29 se distingue significativement de celui des cellules saines étudiées et la valeur sur le plateau est bien inférieure à celle du milieu seul, comme c'est le cas ici.

Par ailleurs, l'équipe de [Arena et al., 2012] a réalisé une étude similaire à la nôtre afin d'obtenir la conductivité d'une suspension de cellules, en comparant expérience et théorie de Maxwell-Wagner. Cependant, les mesures ont été effectuées dans du milieu de culture, et les valeurs obtenues ont, comme ici, un écart-type assez important (0.1 S/m soit environ 10%). De plus, la différence entre la conductivité avec et sans cellule est très faible, et du même ordre de grandeur que l'écart-type (1.2 S/m sans cellules et 1.1 S/m avec cellules). Les résultats obtenus sont donc cohérents avec la littérature et avec ceux obtenus ici mais démontrent bien la difficulté de la mesure de la conductivité d'une suspension de cellules dans du milieu de culture. Malgré le fait que les valeurs d'impédance soient plus élevées pour des faibles conductivités, ce qui rend les variations plus visibles car les valeurs sont moins écrasées, l'explication complète de la meilleure sensibilité grâce à la diminution de la conductivité du milieu dans lequel sont effectuées les mesures mériterait ainsi de plus amples recherches.

Les premières expériences menées dans ce sens ont permis de mettre en avant une possible méthode de détermination des propriétés électriques des cellules en exploitant le modèle de Maxwell-Wagner. En effet, d'après ce modèle, si on introduit des cellules de même conductivité que le milieu dans lequel elles se trouvent, alors, après homogénéisation, l'impédance mesurée sur le plateau résistif en l'absence de cellules devrait être égale à celle avec cellules, ce qui permettrait de remonter à la conductivité des cellules étudiées. Des premières expériences en ce sens sur des suspensions de cellules HT29 dans des milieux de conductivités croissantes ont permis de déterminer une conductivité d'environ 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à 100 kHz, valeur du même ordre de grandeur que celle donnée par le logiciel MyDEP pour ces cellules (832 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Cette piste prometteuse pour déterminer les propriétés électriques d'échantillons biologiques de manière plutôt simple à partir du microsystème développé pourrait également être exploitée pour étudier celles des sphéroïdes. Comme cela a été évoqué précédemment, il faudrait alors se tourner vers des configurations d'électrodes permettant d'aller vers une mesure individuelle d'impédance, en plaçant chaque sphéroïde au-dessus d'une électrode par exemple, le tout formant un réseau de micro-électrodes (MEA). Dans le cadre de la collaboration déjà existante entre Ampère/ILM et l'équipe MONC (Modélisation Mathématique pour l'Oncologie) de l'INRIA Bordeaux, ces résultats pourraient contribuer à l'élaboration de modèles électriques des sphéroïdes, des modèles basés sur des résultats expérimentaux n'étant que très peu voire pas rapportés dans la littérature.

6.2.3 Vers l'étude de l'électrotransfert de gènes sur sphéroïdes

Le travail entamé durant cette thèse pour permettre un suivi des sphéroïdes sans observation optique, avec l'adaptation à la mesure d'impédance, pourrait également servir à aller vers d'autres applications de l'EPN telle que l'électrotransfert de gènes pour la thérapie génique. En effet, il faut alors appliquer des protocoles d'EPN avec des impulsions unipolaires, pour permettre une meilleure transfection grâce au déplacement des plasmides d'ADN sous l'effet des forces électrophorétiques générées. Il faut alors utiliser des matériaux résistants aux réactions électrochimiques, qui ne risquent pas d'être dégradés par ce type d'impulsions.

Comme premier essai de cette application, des tests de transfection par EPN ont été réalisés sur des sphéroïdes de cellules HT29 avec un plasmide GFP. Le microsysteme est monté avec une électrode pleine plaque en ITO jouant le rôle de cathode, électrode la moins dégradée lors de l'application d'impulsions unipolaires, et une électrode pleine plaque en acier inoxydable, parallèle à la première, jouant le rôle d'anode, qui résiste aux réactions électrochimiques induites par l'application des impulsions. Le protocole d'EPN utilisé combine des impulsions carrées de tension élevée (1000 V/cm, 100 μ s) pour électroporer les cellules, et des impulsions carrées de faible tension plus longues (250 V/cm, 20 ms) afin de permettre aux plasmides d'être mis en mouvement par électrophorèse et ainsi favoriser leur contact avec les cellules électroporées, comme cela a été suggéré par [Pasquet, 2018]. Le protocole complet utilisé ici pour la transfection consiste à appliquer deux impulsions carrées de tension élevée et une de tension faible espacées de 50 ms, le tout quatre fois avec une fréquence de répétition de 1 Hz. Il a été vérifié par un marquage de viabilité 3 jours après ce protocole qu'il n'induisait que très peu de mortalité. Les sphéroïdes transfectés ont été fixés après 48h et observés au microscope confocal. Les résultats (figure 6.3) montrent que seulement quelques cellules ont été transfectées par le plasmide GFP et apparaissent en vert, mais certaines se trouvent au cœur du sphéroïde, ce qui est encourageant. Toutefois, il pourrait être intéressant d'étudier la répartition des plasmides autour du sphéroïde juste après EPN, puisque l'utilisation d'un champ unipolaire dans une seule direction peut entraîner une asymétrie [Chopin et al., 2012].

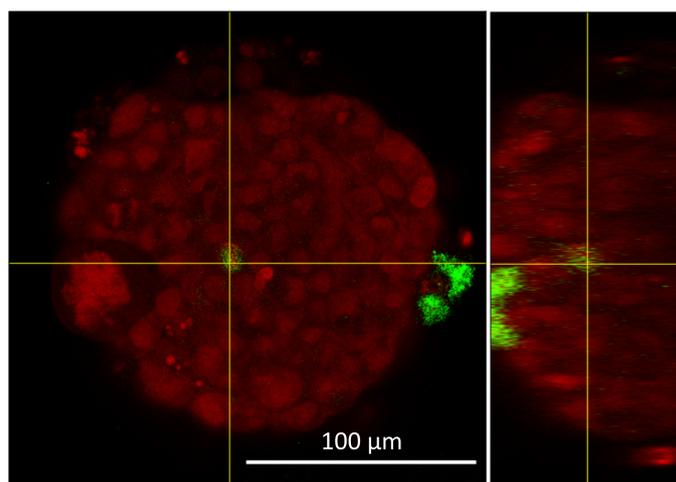


FIGURE 6.3 – Projection orthogonale de l'image au microscope confocal ($\times 25$) d'un sphéroïde de HT29 typique 48h après électrotransfert du plasmide GFP avec un protocole combinant impulsions de tension élevée et faible. Vert = GFP, Rouge = Draq5 (noyaux).

Même s'il est plus difficile de transférer des structures 3D que des cellules en suspension, cela pourrait tout de même s'avérer utile lors de l'étude de sphéroïdes de lignées primaires, qui peuvent être trop fragiles pour être cultivées en 2D ou qui dériveraient trop rapidement vers un autre phénotype. Dans le cadre d'une collaboration entre l'ILM et le Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), l'objectif serait de cultiver les cellules primaires directement dans les micropuits, afin de conserver leur structure 3D dès le départ. Les plasmides utilisés dans ces tests préliminaires ont d'ailleurs été fournis par le CRCL (équipe de C. Chaveroux).

Il est à noter qu'au cours de ces expérimentations, le même protocole a été testé, en remplaçant les impulsions carrées de tension élevée par une impulsion sinusoïdale de 900 V/cm, en ne laissant dans un premier temps aucun délai entre celle-ci et l'impulsion carrée de faible tension. Il a alors été constaté que cela induisait une mort cellulaire élevée en moins de 24h sur des sphéroïdes et ce au bout de quelques heures seulement sur des cellules en suspension. Ces résultats restent à consolider mais pourraient constituer un axe d'étude intéressant pour réduire

la tension appliquée lors des protocoles d'IRE et donc réduire les effets secondaires indésirables.

De plus, la possibilité de changer le matériau des électrodes qui a commencé à être développée ici pourrait permettre de tester l'EPN de sphéroïdes dans des milieux plus conducteurs que celui utilisé ici. Elle serait alors plus proche de la conductivité observée *in vivo*, afin d'étudier l'impact de celle-ci sur l'efficacité d'EPN. Des travaux récents de modélisation ont en effet montré que la conductivité du milieu pouvait avoir un impact sur l'EPN [Sabri, 2022], en suggérant qu'un écart entre la conductivité intracellulaire et extracellulaire permettrait d'optimiser la dynamique de formation des pores. Ce changement de matériau d'une des électrodes ouvre également la voie à l'extension de l'étude par impédance de la perméabilisation irréversible des cellules, réalisée au chapitre 5 chimiquement grâce au TritonX-100, à l'étude de l'effet d'une EPN irréversible avec des impulsions unipolaires sur des sphéroïdes.

Sommaire

A	Les techniques de micro-fabrication d'électrodes	145
B	Fabrication du moule en PDMS pour le moulage des micropuits en hydrogel	145
C	Caractérisation des moules et moulages au profilomètre optique .	146
D	Double utilisation de l'iodure de propidium	147
E	Macro ImageJ pour la mesure de l'intensité de fluorescence de sphéroïdes	148
F	Tests statistiques	151
G	Routine Matlab pour analyser l'intensité de fluorescence à l'inté- rieur d'un sphéroïde	152
H	Protocole de marquage de la prolifération cellulaire	155
I	Routine Matlab pour évaluer la colocalisation de deux canaux de fluorescence	156
J	Protocole de la transduction des cellules MRC5	159
K	Protocole de l'immunomarquage de la fibronectine	159
L	Calcul de la constante d'électrodes pour une configuration inter- digitée coplanaire	160
M	Mesures d'impédance pour le suivi de croissance	161
N	Mesures d'impédance après ajout de TritonX-100 sur suspensions cellulaires	162
O	Mesures d'impédance après EPN sans cellules et sur suspension cellulaire	163

A Les techniques de micro-fabrication d'électrodes

Les deux principales techniques de micro-fabrication d'électrodes sont la photolithographie, qui consiste à enlever sélectivement une partie de la couche conductrice du substrat pour obtenir le design souhaité ; et la technique lift-off, qui consiste à déposer directement de manière sélective la couche de matériau conducteur correspondant au design. On retrouve des étapes communes aux deux protocoles. Le principe de base est de déposer une fine couche de résine par centrifugation ("spin-coating") qui va permettre de protéger le substrat, et d'y imprimer un motif grâce à un photomasque, le plus souvent en exposant la résine aux rayons ultra-violet (UV), ce qui a pour effet de la sensibiliser. Il est alors possible, grâce à un produit chimique appelé développeur, d'enlever uniquement la résine qui a été exposée aux UV, on dit alors qu'on utilise une résine positive ; ou bien de laisser uniquement la résine exposée aux UV, on dit alors que la résine est négative. Cela permet d'obtenir le design désiré selon la technique utilisée (soit le design du masque, soit le négatif du masque). Dans la technique lift-off (figure A.1,a), on peut alors déposer le matériau conducteur métallique sur tout le substrat et ensuite utiliser une seconde fois le développement pour enlever les couches où il y a à la fois la résine et le métal, pour ne laisser la couche de métal qu'aux endroits où elle avait été déposée directement sur le substrat. Pour la technique de photolithographie (figure A.1,b), comme le substrat était déjà recouvert d'une couche conductrice, il faut utiliser un produit chimique, souvent acide, pour graver la couche de métal qui n'est pas protégée par de la résine. Enfin, il faut utiliser un remover ou de l'acétone pour enlever la protection de résine sur la couche conductrice gravée.

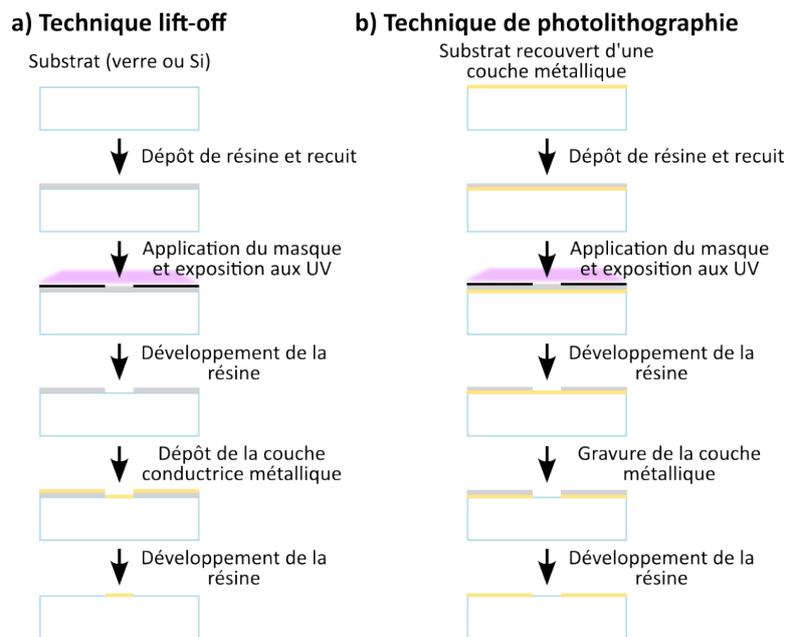


FIGURE A.1 – Micro-fabrication d'électrodes structurées avec une résine positive. (a) Schéma du protocole de micro-fabrication par la technique lift-off. (b) Schéma du protocole de micro-fabrication par la technique de photolithographie.

B Fabrication du moule en PDMS pour le moulage des micropuits en hydrogel

Le moule négatif en PDMS (figure 3.3,b), permettant le moulage des micropuits, est obtenu à partir du moule positif micro-fraisé en métal (figure 3.3,a). Le protocole est le suivant :

- Mélanger du PDMS (polydiméthylsiloxane, Sylgard silicone elastomer) et du réticulant (Sylgard 184 silicone elastomer curing agent) avec un ratio de 10 pour 1.
- Centrifuger 3 min à 6000 tours/minutes pour retirer une partie des bulles dues au mélange.
- Verser sur le moule en métal et dégazer sous cloche à vide pendant environ 3h pour retirer toutes les bulles et s'assurer que le PDMS pénètre dans tous les micropuits.
- Faire réticuler 2h à 80°C puis laisser refroidir et démouler.

C Caractérisation des moules et moulages au profilomètre optique

Les moules utilisés pour obtenir le réseau de micropuits en hydrogel d'agarose 2% ont été caractérisés grâce au profilomètre optique Hirox NPS (Nano Point Scanner), permettant de réaliser de scanner la surface d'un échantillon et d'analyser la réflexion de la lumière à l'aide d'une sonde confocale. Ces caractérisations ont été réalisées sur le site du laboratoire Ampère dépendant de l'INSA Lyon avec l'aide de Tony Gerges.

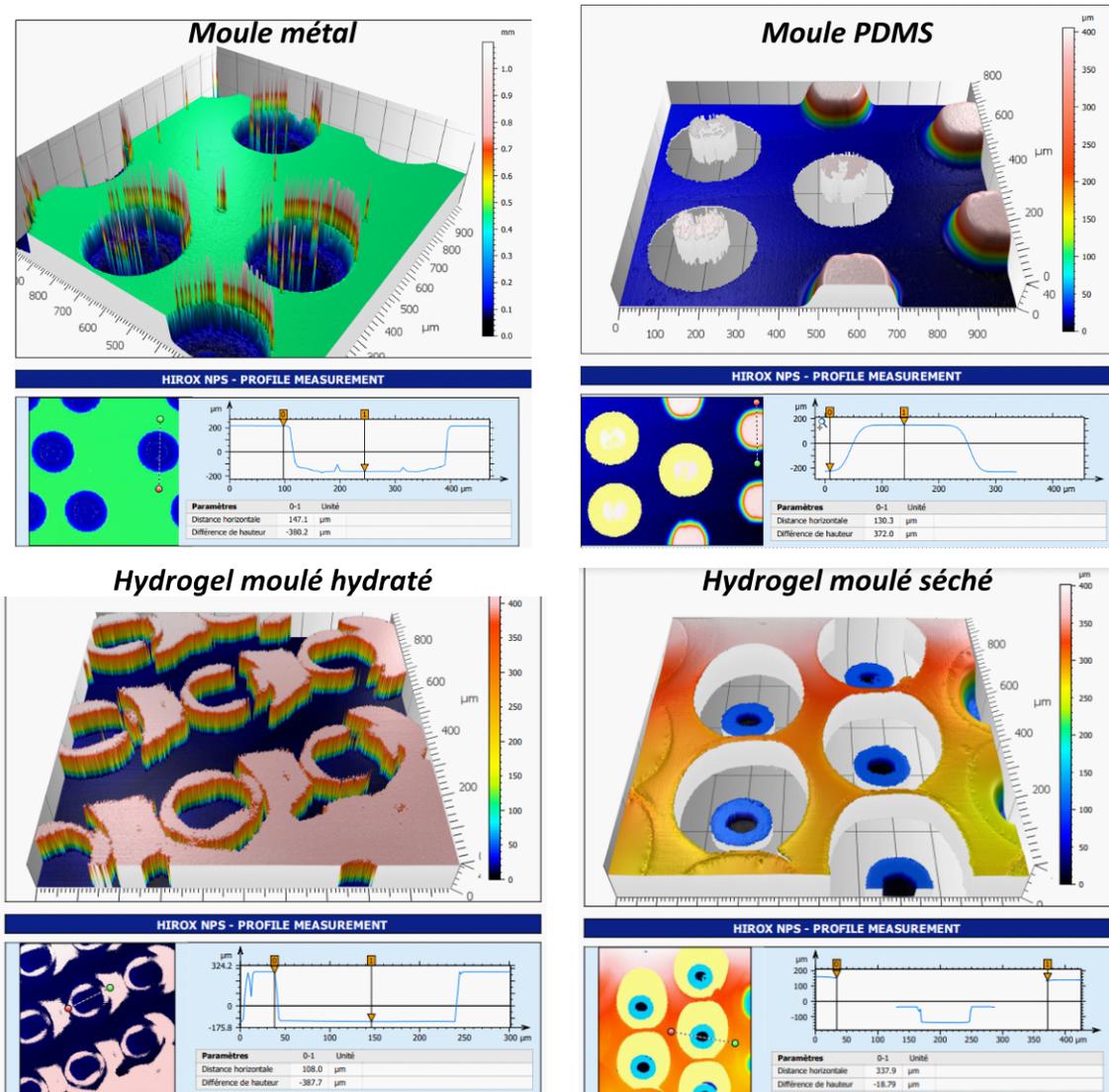


FIGURE C.1 – Images du logiciel du profilomètre optique Hirox NPS pour la caractérisation du moule positif en métal, moule négatif en PDMS et moulage en hydrogel d'agarose 2% hydraté et séché en surface pour les micropuits de diamètre 300 µm.

Les résultats obtenus pour la caractérisation du moule avec des micropuits de diamètre 300 μm sont présentés sur la figure C.1. On constate que la réflexion de la lumière sur les bords des puits entraîne une imprécision sur la mesure du diamètre des puits (ou plots dans le cas du moule négatif en PDMS). Toutefois, il y a une bonne corrélation entre les dimensions des puits du moule en métal et des plots du moule en PDMS (diamètre respectivement de 280 μm et 260 μm et profondeur 380 μm et 372 μm , pour une consigne sur les plans de 300 μm de diamètre et 400 μm de profondeur). Pour ce qui est du moulage en agarose, les mesures sont difficiles à réaliser car il doit être maintenu hydraté, ce qui entraîne des réflexions parasites liées à la présence d'eau, et lorsqu'il est séché, on constate un affaissement des puits (diamètre hydraté de 208 μm contre 338 μm séché et profondeur de 388 μm hydraté contre 294 μm séché). Le diamètre des puits semble donc ici plus petit que celui attendu, mais en le mesurant au microscope optique sur un hydrogel hydraté, il a été vérifié qu'il était bien proche de la valeur attendue de 300 μm (mesure sur ImageJ, environ 285 μm). La profondeur semble quant à elle cohérente avec celle qui est attendue.

D Double utilisation de l'iodure de propidium

Lors de la preuve de concept de l'efficacité du microsysteme pour électroporer des sphéroïdes (chapitre 3), l'iodure de propidium (IP), fluorophore pénétrant dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, a été utilisé pour marquer à la fois les cellules électroporées et les cellules mortes. En profitant du fait que le microsysteme permette une observation facile avec la microscopie confocale, l'intensité de la fluorescence rouge de l'IP a été comparée pour des sphéroïdes contrôles morts et des sphéroïdes électroporés, afin d'étudier cette double utilisation. En raison de la petite taille de l'échantillon, la valeur-p a été évaluée avec le test statistique non paramétrique de Wilcoxon, permettant de tester l'hypothèse que deux séries statistiques ont des médianes proches, à un seuil de 5%.

Les résultats, présentés dans la figure D.2, confirment que l'IP peut avoir ce double usage, puisque l'intensité de fluorescence rouge mesurée sur les sphéroïdes est significativement plus élevée (plus de 2.5 fois et $p < 2 \times 10^{-4}$) pour les sphéroïdes morts que pour les sphéroïdes électroporés. Un autre contrôle, IP sans EPN, a été réalisé mais n'est pas représenté ici car aucune fluorescence n'a pu être mesurée, ce qui était attendu puisqu'il n'y avait pas de perméabilisation. Seules une ou deux cellules mortes étaient visibles pour certains sphéroïdes. Ces résultats démontrent que les conditions d'EPN n'induisent aucune toxicité cellulaire juste après l'EPN, car presque aucune cellule morte (donc présentant une intensité plus importante) ne peut être observée sur les sphéroïdes électroporés (figure D.2,b).

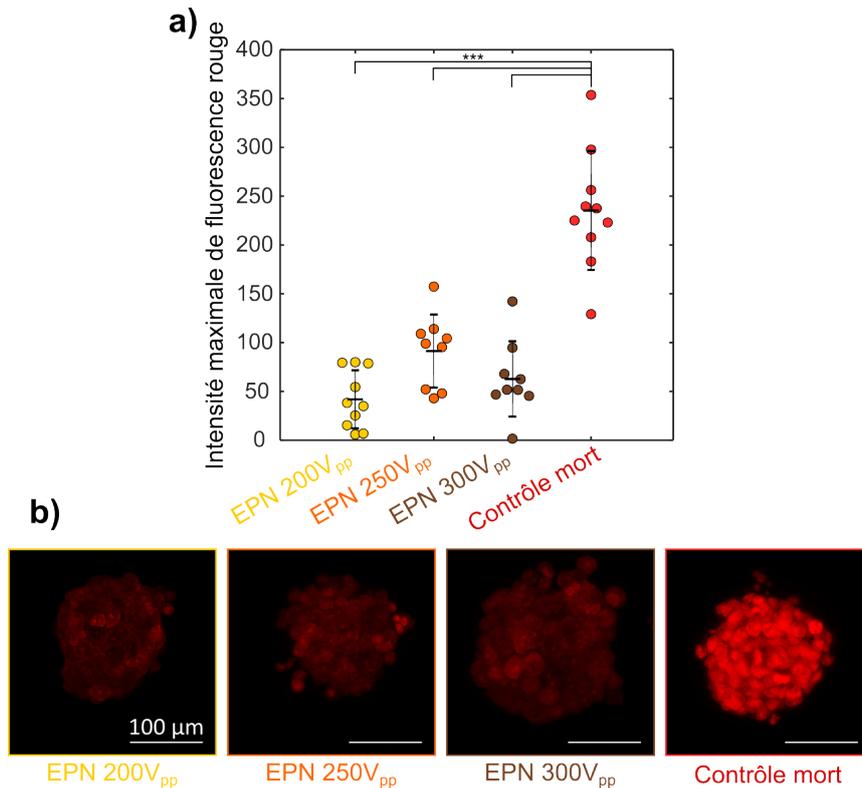


FIGURE D.2 – (a) Intensité maximale de la fluorescence rouge (IP) sur des sphéroïdes de cellules HT29 mortes ou sur des sphéroïdes de cellules HT29 électroporées en présence d'IP, mesurée au microscope confocal sur des échantillons fixés. Point = valeur pour un sphéroïde imagé, Longue ligne horizontale = moyenne, Petite ligne horizontale = valeur STD, N = 10 sphéroïdes/condition, une expérience, *** $p < 0.001$. (b) MIP d'images z-stack au microscope confocal ($\times 25$) de sphéroïdes typiques morts ou de sphéroïdes typiques électroporés en présence d'IP, réalisées avec les mêmes paramètres d'acquisition et de contraste. Rouge = IP, Barre d'échelle = 100 μm .

E Macro ImageJ pour la mesure de l'intensité de fluorescence de sphéroïdes

Pour toutes les mesures d'intensité de sphéroïdes faites sur ImageJ, la démarche, schématisée sur la figure E.1, est la suivante :

- On réalise tout d'abord une projection de l'intensité maximale avec la fonction "Z-project" de l'onglet "stack" (code présenté sur la figure E.2). Cela permet pour chaque pixel de conserver la valeur maximale parmi toutes les valeurs que prend ce pixel sur chaque image du stack que l'on a acquis.
- On réalise ensuite une combinaison des canaux verts et rouges (appelée "merged") puis on utilise la fonction "Analyze particle" sur cette image, une fois convertie en image binaire, afin de définir le contour des sphéroïdes (ROI ou "Region Of Interest" en anglais) (code présenté sur la figure E.3).
- Dans un troisième temps, on peut alors ouvrir l'image MIP du canal voulu, ici le rouge, et mesurer l'intensité sur chaque ROI, correspondant à chaque sphéroïde, grâce à la fonction "Measure" (code présenté sur la figure E.4).

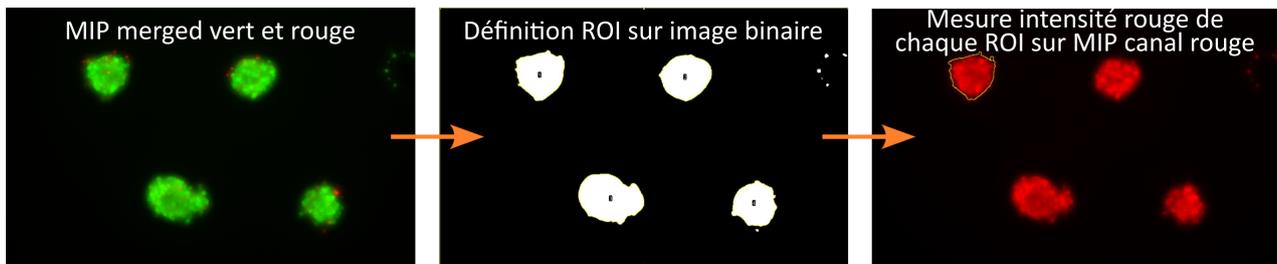


FIGURE E.1 – Illustration de la démarche de mesure de l'intensité rouge des sphéroïdes sur le logiciel ImageJ sur un exemple.

```

1  dir= getDirectory("Source Directory where images are stored [stacks]");
2  dir2 = getDirectory("MIP Directory in C:// [MIP]"); // CHOISIR DOSSIER DANS C directement
3
4  n = 0;
5
6  list = getFileList(dir); //get files
7
8  processFiles(dir); // function that modify files (defined below)
9
10 function processFiles(dir)
11 {
12     list = getFileList(dir);
13
14     for (i=0; i<list.length; i++) ///_____
15     {
16         path = dir+list[i];
17         processFile(path); //function processFile(path) defined below
18     }
19 }
20
21 function processFile(path)
22 { // A CHOISIR SI SERIES d'images individuelles dans un dossier
23 open(path); //file opening
24 namefolder=File.nameWithoutExtension;
25 namefolder=File.getName(path);
26
27 path1folderMAX=dir2+"MAX_"+namefolder;
28
29 // faire les Max Intensity Projection sur les stacks
30 run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
31
32 run("8-bit"); //conversion in 8 bit file
33 saveAs("tiff", path1folderMAX); //save the MIP
34 close();
35 }

```

FIGURE E.2 – Code de la macro ImageJ permettant de faire les MIP des stacks acquis par le microscope à épifluorescence.

```

1 redSuffix = "IP";
2 greenSuffix = "FDA";
3
4     batchConvert();
5
6 function batchConvert() {
7     dir1 = getDirectory("Source Directory [MIP] ");
8     dir2 =getDirectory("Destination directory [02 MIP merged] ");
9     dir3 = getDirectory("Selection [03 selection MIP merged]");
10
11     list = getFileList(dir1);
12
13     setBatchMode(true);
14     n = list.length;
15
16     stack = 0;
17     first = 0;
18     for (i=0; i<n/2; i++) {
19         //showProgress(i+1, n/2);
20         red="?"; green="?";
21         for (j=first; j<first+2; j++) {
22             if (indexOf(list[j], redSuffix)!=-1)
23                 red = list[j];
24             //print(red);
25             if (indexOf(list[j], greenSuffix)!=-1)
26                 green = list[j];
27             //print(green);
28         }
29
30         // print(dir1 +green);
31         open(dir1 +green);
32         //print(dir1+red);
33         open(dir1 +red);
34         //print(red);
35         //print(green);
36
37         run("Merge Channels...", "c1=["+red+"] c2=["+green+"]");
38         //superposition des différents canaux de fluorescence
39         run("RGB Color");
40
41         name=File.nameWithoutExtension;
42         saveAs("tiff", dir2+name); //save the Merged MIP
43
44         path1folderselec=dir3+"_select"+name+".zip";
45
46         run("8-bit");
47         setThreshold(30, 255);
48         // A CHANGER SELON LES MANIPS (faire un premier test à la main pour définir les seuils)
49         setOption("BlackBackground", true);
50         run("Convert to Mask");
51
52         run("Analyze Particles...", "size=500-Infinity clear add");
53         //définition des contours des sphéroïdes sur l'image comme ROI
54         //taille minimale à changer selon le grossissement de la figure
55         roiManager("Save", path1folderselec);
56         close();
57
58         first += 2;
59     }
60 }
61

```

FIGURE E.3 – Code de la macro ImageJ permettant de combiner les canaux de fluorescence et de définir les ROI autour des sphéroïdes.

```

1   dir1 = getDirectory("Source Directory [01 MIP] ");
2   dir2 = getDirectory("Results Directory [04 results]");
3   dir3 = getDirectory("Selection Directory [03 selection_MIP_merged]");
4
5   setBatchMode(true);
6   n = 0;
7   list = getFileList(dir1);
8   list3= getFileList(dir3);
9   run("Clear Results");
10  run("Set Measurements...", "area mean standard min fit display redirect=None decimal=7");
11  processFiles(dir1); // fonction that modify files (defined below)
12
13  function processFiles(dir1)
14  {
15  Count=0
16      for (i=1; i<list.length; i+=2)
17          // i begins with i=1 as i=0 is for FDA and we want to measure red IP intensity
18          {
19              path = dir1+list[i];
20              path3 = dir3+list3[Count];
21  namefolder=File.nameWithoutExtension;
22  namefolder=File.getName(path);
23  open(dir1+namefolder); //ouverture des images d'intensité rouge
24  nameelec=File.nameWithoutExtension;
25  nameelec=File.getName(path3);
26  selectWindow(namefolder);
27  open(dir3+nameelec);
28  roiManager("Open",dir3+nameelec); //ouverture des ROI des sphéroïdes
29  roiManager("Measure"); //mesure de l'intensité de chaque sphéroïde
30  roiManager("Delete");
31
32  selectWindow("Results");
33  name_results=nameelec+".txt";
34  saveAs("Results", dir2+name_results); //enregistrement des résultats en csv
35  run("Close");
36  run("Close");
37
38  Count=Count+1;
39  }
40  }

```

FIGURE E.4 – Code de la macro ImageJ permettant de mesurer l'intensité de fluorescence sur les ROI définies.

F Tests statistiques

Afin de quantifier le seuil de signification lors d'un test d'hypothèse statistique, on calcule le plus souvent la valeur-p ("p-value" en anglais pour "probability value"), qui correspond à la probabilité d'obtenir les résultats du test en supposant que l'hypothèse est correcte. Cette hypothèse dite hypothèse nulle nous permettra de tester ici si deux variables, correspondant à des résultats expérimentaux de deux groupes lors d'une même expérience, sont statistiquement différentes ou non. Les hypothèses précises testées, selon la taille des échantillons, et leur méthode de calcul, sont détaillées dans ce qui suit. Ainsi, plus la valeur-p est petite, plus la probabilité de faire une erreur en rejetant l'hypothèse nulle est faible. La valeur limite utilisée ici, comme c'est le cas classiquement, est de 0.05, autrement dit si $p > 0.05$, l'hypothèse nulle n'est pas rejetée et inversement.

Les valeurs-p calculées dans cette thèse correspondent, sauf mention contraire, au test T de Student à deux échantillons, permettant de tester l'hypothèse que deux séries statistiques proviennent d'une distribution normale avec des moyennes égales, à un seuil de 5%. Par conséquent, lorsque cette hypothèse est rejetée, on ne peut pas conclure que les deux séries statistiques ont

les mêmes moyennes, avec une précision de 95%. La distribution approchant une loi normale des séries a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov à un échantillon (fonction "kstest") et les variances ont été calculées pour ajuster l'hypothèse du test T de Student. Les tests ont été réalisés avec le logiciel Matlab ("ttest2(serie1,serie2,'Vartype','unequal')").

Lorsque le nombre de données par série est trop faible (< 30), la valeur-p a été évaluée sur Matlab également mais à l'aide du test statistique non paramétrique de Wilcoxon ("rank-sum(serie1,serie2)"), permettant de tester l'hypothèse que deux séries statistiques ont des médianes proches, à un seuil de 5%.

G Routine Matlab pour analyser l'intensité de fluorescence à l'intérieur d'un sphéroïde

La microscopie confocale permet l'acquisition d'images dans la direction z avec un pas de 2 μm . Les images sont analysées avec une routine Matlab développée à l'ILM [Goodarzi, 2021]. La démarche est la suivante (figure G.1) :

- Les sphéroïdes sont segmentés à chaque position z grâce à la fluorescence des noyaux ou à la fluorescence rouge de l'IP dans le cas des sphéroïdes électroporés, et chaque tranche de sphéroïde est modélisée par un cercle parfait.
- Dans la sphère parfaite obtenue en combinant toutes les tranches z, un changement de coordonnées de cartésiennes à sphériques est effectué.
- L'intensité rouge est mesurée sur des cercles concentriques par pas de 2 μm sur chaque stack et combinée en 3D pour obtenir l'intensité moyenne en partant de la couche périphérique pour aller vers le cœur.
- Cette intensité moyenne est tracée pour chaque sphéroïde puis normalisée et moyennée sur tous les sphéroïdes imagés pour obtenir par exemple la courbe visible sur les figures 3.12,b et c.

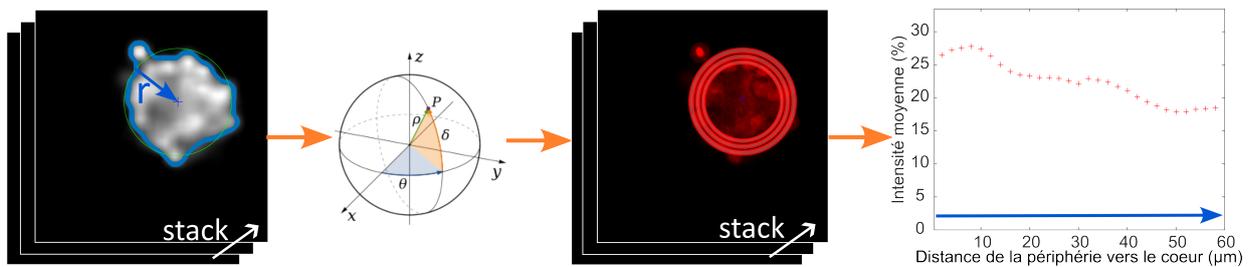


FIGURE G.1 – Illustration de la démarche de mesure de l'intensité rouge à l'intérieur des sphéroïdes électroporés, réalisée sur le logiciel Matlab.

Le code Matlab utilisé est disponible ci-après.

```

clear all
close all
warning off
%% to adjust eventually
theta=[0:pi/100:2*pi];
set(0,'DefaultTextInterpreter','none') % so that we keep the underscore in the
title
p = genpath('D:\These_BREGIGEON\Logiciels\fitcircle');
addpath(p) %% addpath to matlab

p2 = genpath('D:\These_BREGIGEON\Logiciels\Matlab'); %pour fonction
plot_areaerrorbar_nanmean
addpath(p2)

Area_min=5000; % minimum Area for spheroid size
%% delta z corrigé par le rapport indice milieu/indice objectif
delta_z=2*(1.5/1.33); %% for glycerol/liquid immersion objectif % z distance
between each image in µm
%% delta_z=3*(1.5/1); %% for glycerol/air objectif % z distance between each image
in µm
%% delta_z=3*(1.33/1); %% for water/air objectif % z distance between each image in
µm
%%delta_z=2*(1.51/1.33); %% for PBS/water objectif % z distance between each image
in µm
dossier='D:\These_BREGIGEON\Manips\Confocal\09-12-
21_interieur_sphero_manip_3\300Vpp\IP';
condition='EPN_300Vpp';
%% calibration
sc = 1/2.4726; % scale in Micrometer/Pixel % 2.4726px/µm
dossier_stock=strcat(dossier,'matlab_results'); % usually usefull to make a
separated folder for the analysis
mkdir(dossier_stock);
cd(dossier)
Sourcefile_N=dir('*IP*.tif'); % fluorescence nucgreen images

%% segmentation of the images
for i=1:length(Sourcefile_N);

i
cd(dossier)
filename=strcat(Sourcefile_N(i).name);
images_info=iminfo(Sourcefile_N(i).name);
n_gray_levels=2^images_info(1).BitDepth;
nb_images = numel(iminfo(Sourcefile_N(i).name));
[name,ext]=fileparts(Sourcefile_N(i).name);

for k = 1:nb_images
% k
cd(dossier)

im=imread(filename,k);

```

```

%% Z : center of the fitted circle
% R : radius of the fitted circle
%%
X=z(k,1)+r(k).*cos(theta);
Y=z(k,2)+r(k).*sin(theta);

X_check(k,:)=X;
Y_check(k,:)=Y;
save([dossier,strcat('fitcircle_to_check_',ext,'.
mat')], 'im_IP', 'B', 'X_check', 'Y_check', 'z');

%% to check mask and fitcircle
% figure
% hold on
% imagesc(im)
% colormap(gray)
% plot(B{1}(:,2),B{1}(:,1),'+')
% set(gca,'Ydir','reverse')
% axis off
% axis equal
% plot(Y,X,'g') %% plot the corresponding center
% plot(z(k,2),z(k,1),'+b','MarkerSize',10)

% dossier_stock_currentfit_circle=strcat(dossier_stock,'/',ext,'/');
% mkdir(dossier_stock_currentfit_circle);
% cd(dossier_stock_currentfit_circle);
% saveas(gca,[dossier_stock_currentfit_circle,'contour',num2str(k),'.png'])
% close
clear B bds

save([dossier,strcat('BW_',ext,'.mat')], 'BW', 'Im')
end
%% analysis of r as a function of depth
figure
plot(sc*r(1:end))
title(strcat('radius as a function of depth_',ext));
xlabel('image number');
ylabel('spheroid radius (µm)');
cd(dossier_stock)
saveas(gcf,strcat('radius as a function of depth_',ext,'.fig'));
close
%% analysis of change of center v as a function of depth
% pas=5;
% v=sqrt((z(1:pas:end-pas,1)-z(1+pas:pas:end,1)).^2+(z(1:pas:end-pas,2)-z(1+pas:
pas:end,2)).^2);
% figure
% plot(v)
%
%% Normalised intensity
Norm_Im=100.*Im./max(Im);

```

```

G_nuc = fspecial('gaussian',[30 30],30); % would choose filter size
%to be about 3*sigma in each direction (round to odd integer).

im = imfilter(im,G_nuc,'same'); %% Filter it
%im=imnoise(image,'gaussian', 50);
th=graythresh(im);
bw=im2bw(im,th);
bw2=imclose(bw,strel('disk',30));
bw3=imfill(bw2,'holes');
% figure
% imshow(bw3)

L=bwlabel(bw3);
tutu=regionprops(L,'Area');
aa=[tutu.Area];
[~,iM]=max(aa);
bw4=L==iM;
% figure
% imshow(bw4)

B=bwboundaries(bw4);

mm= median(im(bw4));
bw5=im>1*mm; %% keep only intensity larger than the median value
% figure
% imshow(bw5)

Im(k)=mean(im(im>mm)); %% take the mean of the image with pixel is larger than
the median value
%% to check mask
% figure
% hold on
% imagesc(im)
% colormap(gray)
% plot(B{1}(:,2),B{1}(:,1),'+')
% set(gca,'Ydir','reverse')
% axis off
% axis equal

BW(:, :, k)=bw4;
bds=[B{1}];

%% store all images in a single matrix im_IP
cd(dossier)
imt=double(imread(filename,k))/n_gray_levels; % normalise by the max grey level
imt(~BW(:, :, k))=NaN;
im_IP(:, :, k)=imt; %% replace im with the image only for the spheroids
% figure
% imagesc(imt)

%% fit circle
[z(k,:), r(k), residual] = fitcircle(bds); %%

```

```

% figure;
% plot(Norm_Im,'Color','green')
[~,k_max]=max(Im);
k_max_mat(i)=k_max;
Norm_Im_k_max= Norm_Im(k_max:end);
%% saving variable
cd(dossier)
save(strcat('Normalised Intensity',ext,'.
mat'),'k_max_mat','Norm_Im_k_max','Norm_Im','im_IP','sc');

%% figure NormIm as a function of z
figure
plot(Norm_Im_k_max,'Color','red')
legend(ext);
xlabel('image number');
ylabel('Normalised Intensity I/Imax');
title(strcat('Mean Intensity as a function of depth_',ext));
cd(dossier_stock)
saveas(gcf,strcat('Mean Intensity as a function of depth_',ext,'.fig'));
close

%% analyse of the center offset
[fff,er]=fit(z(1:end,1),z(1:end,2),'poly1');
% map=colormap(jet(nb_images));
% map=jet(nb_images)
% figure
% for k= 1:nb_images
% plot(z(k,1),z(k,2),'.', 'color',map(k,:));
% hold on
%
% end
% plot(fff,'r');
%
% title(strcat('change in the center position_',ext));
%
% cl=colorbar('Ticks',[0,0.25,0.5,0.75,1],...
% 'TickLabels',{'0',num2str(nb_images/4),num2str(nb_images/2),num2str
(3*nb_images/4),num2str(nb_images)});
% cl.Label.String = 'image number in z';

angle=atan(fff.p1);

%% Compute x1, y1

% figure
%
for k= 1:nb_images

x1(k)=z(k,1)+r(k).*cos(angle);
y1(k)=z(k,2)+r(k).*sin(angle);

```

```

% x2(k)=z(k,1)+r(k).*cos(angle+pi);
% y2(k)=z(k,1)+r(k).*sin(angle+pi);
%
% plot(y1(k),x1(k),'+', 'color',map(k,:))
% % plot(y2(k),x2(k),'+', 'color',map(k,:))
% hold on
%
end
% close

%% myfit circle
% xz1=mean(z(:,1))+R1;
% yz1=[0:1:nb_images-1]*delta_z;

%% fit circle along z direction

R1=sqrt((x1(1:end)-z(1,1)).^2+(y1(1:end)-z(1,2)).^2)*sc;
% R1(1,[17:32])=-sqrt((x2-res(1,1)).^2+(y2-res(1,2)).^2);
z1=[0:1:nb_images-1]*delta_z; %%
% z1(i,[17:32])=[0:1:15]*5;
clear vec

vec(:,1)=R1;
vec(:,2)=z1;
l=length(vec);
%% symmetry of the data
vec(l+1:2*l,1)=-R1;
vec(l+1:2*l,2)=z1;
% figure
% plot(z1,R1,'+')
% % [Zf, Rf, residual] = fitcircle(vec(1:60,:)); %% Zf and Rf = center and radius of the
% the circle along z
[Zf, Rf, residual] = fitcircle(vec); %% Zf and Rf = center and radius of the circle
along z

%% figure to check the circle fit along z direction
figure
map=colormap(jet(nb_images));

for k= 1:nb_images
% plot(R1(k),z1(k),'.k')
plot(vec(:,1),vec(:,2),'.', 'color',map(k,:))
hold on

end
axis equal

Xf=Zf(1,1)+Rf.*cos(theta);
Yf=Zf(2,1)+Rf.*sin(theta);
plot(Xf,Yf,'.k')
plot(Zf(1,1),Zf(2,1),'+b')
title(strcat('fitcircle_stack_',ext));

```

```

legendInfo(i)=[ext];
legend(ext);
title(strcat('Mean Intensity as a function of the radius for_',ext),'(starting
from the periphery)');
cd(dossier_stock)
saveas(gcf,strcat('Mean Intensity as a function of the distance from the periphery
for_',ext,'.fig'));
saveas(gcf,strcat('Mean Intensity as a function of the distance from the periphery
for_',ext,'.jpg'));
close

save (strcat('Intensity radius analysis',
ext),'dossier_stock','r','dist_periph','Ir_periph','Ir');
clear BW Im Zf Rf Xf Yf z r X Y %% clear data for the next loop

end

cd(dossier_stock)
save ('Intensity radius analysis
ALL','dossier_stock','Ir_matrix_periph','Ir_matrix','dist_periph_matrix','r_matrix'
)

%% figure for all stacks (can be replot afterwards by loading the workspace without
doing the loop again)
% load('Intensity radius analysis ALL.mat')
dist_periph_mean=mean(dist_periph_matrix);
dist_periph_std=std(dist_periph_matrix);

%% figure Individuall plots of mean Intensity along radius for NucGreen
figure ('Name','Individual mean intensity','NumberTitle','on','color','w');
cmp_ind =hsv(length(Sourcefile_N)+2);
for sphero=1:size(Ir_matrix_periph,1)
%plot(dist_periph_matrix(sphero,:),100*Ir_matrix_periph(sphero:),'Color',cmp_ind
(sphero,:))
dist_periph_matrix_norm(sphero:)=dist_periph_matrix(sphero:)./max
(dist_periph_matrix(sphero,:));
plot(dist_periph_matrix_norm,100*Ir_matrix_periph(sphero:),'Color',cmp_ind
(sphero,:))

legendInfo_ind{sphero}=[ '#',num2str(sphero)];
hold on
end
legend(legendInfo_ind);
xlabel('Distance from the periphery (ratio)');
ylabel('Mean Intensity (%)');
title('individual plots IP');
ylim([0 100])
cd(dossier_stock)
saveas(gcf,strcat('individual Mean Intensity as a function of the distance from the

```

```

cd(dossier_stock)
saveas(gcf,strcat('fitcircle_stack_',ext,'.fig'));
close

% save workspace
cd(dossier_stock)
% save (strcat('fitcircle_stack_',num2str(i),'
mat'),'Zf','Rf','Xf','Yf','z','r','X','Y');
save (strcat('fitcircle_stack_',ext,'
mat'),'Zf','Rf','Xf','Yf','z','r','X','Y','sc');
clear R1 z1 vec x1 y1

%% change for spherical coordinates
[Rf,num]=max(r(k_max:end));
ZF(2)=num*delta_z;
Rf=max(r)*sc;
[X,Y,Z] = meshgrid([1:size(im_IP,2)]*sc-mean(z(k_max:end,2))*sc,...
[1:size(im_IP,1)]*sc-mean(z(k_max:end,2))*sc,[1:size(im_IP,3)]*delta_z-Zf
(2)); %% change CR 23/04 to start at kmax

r=linspace(1,Rf,30);

[R,th,phi]=meshgrid(r,linspace(0,2*pi,160),linspace(-pi/2,pi/2,80));

[Xr,Yr,Zr]=sph2cart(th,phi,R);

%% the key line code. Put XYZ of the im into XrYrZr
imr=interp3(X,Y,Z,im_IP,Xr,Yr,Zr); % imr is in th, phi,R coordinate %% for IP

%% analysis for IP
tutu=nanmean(imr,1); %% mean along theta
Ir=nanmean(squeeze(tutu),2); %% mean along phi
% Max_Ir=max(Ir); %% If we want to analyse the normalised Intensity
% Norm_Ir=Ir./Max_Ir; %%
Ir_flip=Ir';%%
Ir_periph=flipud(Ir);
Ir_matrix(i,:)=Ir_flip; %% grande matrice qui regroupera toutes les Intensité en
fonction de r
Ir_matrix_periph(i,:)=Ir_periph; % même chose mais en fonction de la distance à la
periphérie
r_matrix(i,:)=r; %% grande matrice pour r
dist_periph=max(r)-sort(r(1:1:end),'descend');
dist_periph_matrix(i,:)=dist_periph; %% grande matrice pour dist_periph

%% mean intensity Ir along the radius r (in pixel because images are not
calibrated)
figure
plot(dist_periph,100*Ir_periph,'+','Color','red')
xlabel('Distance from the periphery (µm)');
ylabel('Mean Intensity (%)');
ylim([0 100])
% set(gca, 'XDir','reverse') %

```

```

periphery for IP_ratio.fig'));
saveas(gcf,strcat('individual Mean Intensity as a function of the distance from the
periphery for IP_ratio.jpeg'));

%% figure mean with error bars of mean Intensity along radius
figure ('Name','Mean intensity along the periphery-
std','NumberTitle','on','color','w');
cmp =[[1 0 0.6];[0 1 0];[0 0.4 1];[1 0 0]]; % couleur Saba time
%% mean intensity for IP along radius
options.handle=gcf; %Figure handle to plot the result.
options.color_area=cmp(1,:); % RGB color of the filled area
options.color_line =cmp(1,:); % RGB color of the mean line
options.alpha = 0.1; %Alpha value for transparency
options.line_width = 2; %Mean line width
options.error = 'std'; % Type of error to plot (+/-) *
% options.x_axis=r(1:1:end); %% to get the good scale from the center
% options.x_axis=sort(r(1:1:end),'descend'); %% to get the good scale and to begin
from the periphery
options.x_axis=dist_periph_mean; %% to get the good scale and to begin from the
periphery
% options.x_axis=depth(1:1:end); %% to get the good scale !! %% added by CR
% mean_intensity_smooth_calib=100.*mean_intensity_smooth;
% plot_areaerrorbar(Intensity_percent_matrix,options);
plot_areaerrorbar_nanmean(100*Ir_matrix_periph,options);
hold on
ylim([0 100]);
xlabel('Distance from the periphery (ratio)');
ylabel('Mean Intensity (%)');
legend(condition);
saveas(gcf,[dossier_stock,'Mean of mean-intensity_std along radius.fig']);
saveas(gcf,[dossier_stock,'Mean of mean-intensity_std along radius.jpeg']);

```

H Protocole de marquage de la prolifération cellulaire

Le protocole de marquage de la prolifération cellulaire basé sur l'EdU est extrait de la fiche technique du fournisseur (click-it EdU Alexa imaging kit, Invitrogen). Ce kit est basé sur la capacité de l'EdU (5-éthynyl-2'-désoxyuridine) à s'intercaler dans l'ADN des cellules pendant leur synthèse active de l'ADN. Il permet donc de marquer les cellules qui sont capables de se diviser. La méthode de détection de l'EdU incorporé dans les cellules repose sur une réaction chimique dite click, c'est-à-dire une réaction catalysée par le cuivre qui implique la formation d'un triazole à partir d'un azide et d'un alcyne, se trouvant sur deux biomolécules différentes. Ici l'EdU contient l'alcyne et le marqueur fluorescent Alexa Fluor® contient l'azide, ce qui permet de détecter l'EdU par microscopie à fluorescence, et donc de visualiser les cellules qui étaient en prolifération au moment de leur fixation. La petite taille du marqueur azide permet une détection efficace de l'EdU incorporé dans des conditions douces. Les schémas de principe du protocole et de la réaction click sont présentés sur la figure H.1.

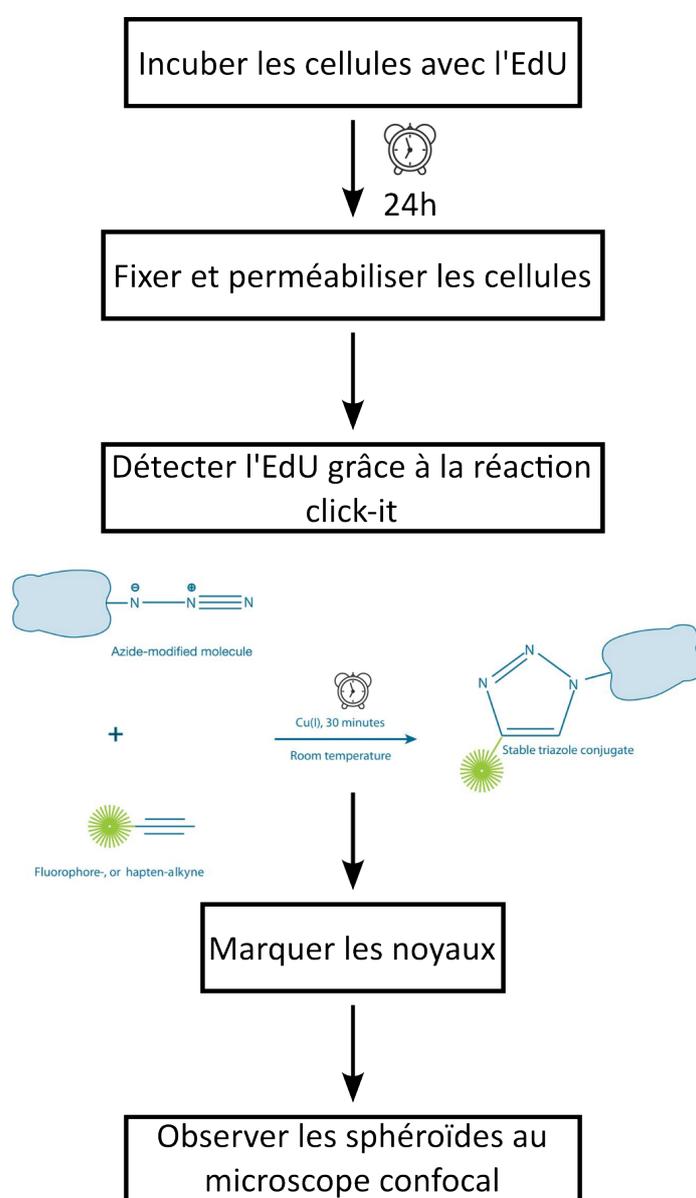


FIGURE H.1 – Schémas de principe du protocole du marquage de la prolifération cellulaire basé sur l'EdU et de la réaction click permettant sa détection [extrait de la fiche technique du fournisseur].

I Routine Matlab pour évaluer la colocalisation de deux canaux de fluorescence

À partir d'images obtenues au microscope confocal, il est possible de déterminer par le calcul la proportion de l'image pour laquelle les deux canaux de fluorescence affichent une intensité suffisamment élevée par rapport à l'intensité moyenne du sphéroïde. Par extension, cela permet d'évaluer la proportion de cellules du sphéroïde qui est marquée pour les deux canaux de fluorescence. Si l'on s'intéresse par exemple à la prolifération marquée par l'EdU, révélé par un marqueur fluorescent rouge de type AlexaFluor, et aux noyaux, qui peuvent être marqués en vert grâce au NucGreen, il est alors possible d'évaluer la proportion de cellules qui prolifèrent parmi toutes les cellules du sphéroïde, et de comparer cette valeur pour les différents groupes testés, comme cela a été réalisé sur la figure 3.15. Pour cela, on utilise la détermination de l'intensité en fonction du rayon sur les sphéroïdes segmentés avec l'approximation d'une sphère parfaite, présentée dans l'annexe G. Le calcul qui mène à la détermination de ce coefficient de colocalisation, appelé coefficient de Pearson (PCC) [Dunn et al., 2011], est le suivant :

$$PCC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}, \quad (6.1)$$

Avec R_i et G_i les intensités des deux canaux rouge et vert respectivement, et \bar{R} et \bar{G} les intensités moyennes des deux canaux pour chaque coupe circulaire.

On peut alors calculer la valeur moyenne et l'écart-type de ce coefficient et comparer les différentes conditions testées, sachant que plus le PCC est élevé, plus il y a de colocalisation entre l'EdU et le NucGreen, et donc plus il y a de cellules qui prolifèrent. Une valeur supérieure à 0.5 est considérée comme étant synonyme d'une couche de cellules prolifératives.

Le code Matlab utilisé pour calculer ce coefficient est disponible ci-après.

```

%% Part to change of coordinates to analyse the intensity/EDU
% as a function of R (in spherical coordinate)
clc
clear all
close all
warning off
%% to adjust eventually
theta=[0:pi/100:2*pi];
set(0,'DefaultTextInterpreter','none') % so that we keep the underscore in the k
title

p = genpath('C:\work_charlotte_sync\MATLAB prog\');
addpath(p) %% addpath to matlab

Area_min=4; % minimum Area for the cluster size
%% ATTENTION SI COMME JE LE SUPPOSE L INDICE AU DESSUS DE LA LAMELLE EST DU
GLYCEROL
delta_z=2*(1.5/1.33); % for glycerol/liquid immersion objectif % z distance
between each image in µm
sc=0.4 % Micrometer/Pixel%% for 25x objective-zoom 1.8, = 1/1.4835

dossier='C:\
\work_charlotte_DATA\Pauline2021\2021_11_test_matlab_charlotte\ANALYSE_PROLIFERATIO
N\Marquage_proliferation\EPN_bléo\';
dossier_results= strcat(dossier,'matlab_results\'); %% dossier where results from
fitcircle for Nuc are stored.
dossier_stock=strcat(dossier,'analysis_EDU_intensity_R\'); % usually usefull to make
a separated folder for the analysis
mkdir(dossier_stock);
dossier_im=strcat(dossier,'\E_Edu_N_Nuc\');
cd(dossier_im);

Sourcefile_N=dir('N*.tif'); % fluorescence nucgreen images
Sourcefile_E=dir('E*.tif'); % fluorescence EDU images
%
for i=9:length(Sourcefile_N) % number of different tiff files(z-stacks)
i
    cd(dossier_im)
    filename_N=strcat(Sourcefile_N(i).name);
    filename_E=strcat(Sourcefile_E(i).name);

    images_info=imfinfo(Sourcefile_N(i).name);
    n_gray_levels=2^images_info(1).BitDepth;
    nb_images = numel(imfinfo(Sourcefile_N(i).name));

    cd(dossier_results)
    % load(strcat('fitcircle_stack_',num2str(i),'.mat')); % load le fitcircle
    [name,ext]=fileparts(Sourcefile_N(i).name);
    load(strcat('fitcircle_stack_',ext,'.mat')); % load le fitcircle

```

```

% PR(:,k)= corr2(imt_EDU, imt);
% figure
% imagesc(imt_EDU)

% pause
% end
end
%% Analysis as a function of r begin
[Rf,num]=max(r(kmax:end));

[Rf,num]=max(r);
Zf(2)=num*delta_z;
Rf=max(r)*sc;

[X,Y,Z] = meshgrid([1:size(im,2)]*sc-mean(z(kmax:end,2))*sc,[1:size(im,1)]*sc-mean
(z(kmax:end,2))*sc,[1:size(im,3)]*delta_z-Zf(2));

r=linspace(1,Rf,30);
r_norm=linspace(1,Rf,30)./Rf; % to normalise by Rf

%% creation of matrix for r and r_norm
r_matrix(i,:)=r;
r_norm_matrix(i,:)=r_norm;

[R,th,phi]=meshgrid(r,linspace(0,2*pi,160),linspace(-pi/2,pi/2,80));

[Xr,Yr,Zr]=sph2cart(th,phi,R);

%% the key line code. Put XYZ of the im into XrYrZr
imr=interp3(X,Y,Z,im,Xr,Yr,Zr); % imr is in th, phi,R coordinate %% for nucgreen

imr_EDU=interp3(X,Y,Z,im_EDU,Xr,Yr,Zr); % imr is in th, phi,R coordinate %% for EDU

%% to convert these 3D matrices to one dimensional arrays and calculation of PCC
L=size(imr,2);
dim=size(imr,1)*size(imr,3);
for j=1:L
    imr_2D=squeeze(imr(:,j,:));
    imr_1D=reshape(imr_2D,[dim,1]);
    % imr_nan=imr_1D(~isnan(imr_1D));

    imr_EDU_2D=squeeze(imr_EDU(:,j,:));
    imr_EDU_1D=reshape(imr_EDU_2D,[dim,1]);
    % imr_EDU_nan=imr_EDU_1D(~isnan(imr_EDU));
L2=size(imr_1D,1);
for n=1:L2
    imr_1D(:) = imr_1D(:) - nanmean(imr_1D);
    imr_EDU_1D(:) = imr_EDU_1D(:) - nanmean(imr_EDU_1D);
    imr_1D(isnan(imr_1D))=0;
    imr_EDU_1D(isnan(imr_EDU_1D))=0;

```

```

%% step 3 : scatteredInterpolant (to put the value of the intensity in the new k
meshgrid)
cd(dossier_results)
load(strcat('BW_',ext,'.mat')); % load binarized images
load(strcat('Intensity_analysis_',ext,'.mat'));
Im=cell2mat(Im);
r=cell2mat(r);
s=cell2mat(s);
z=cell2mat(z);
Norm_Im_k_max=cell2mat(Norm_Im_k_max);

% kmax=k_max.k_max_mat(i);
kmax=cell2mat(k_max_mat(i));

% max_logical=logical(max);
%% Maks of images using the contour computed in the first code for Nucgreen
for k= kmax:nb_images

cd(dossier_im)
% for k = 1:100
    imt=double(imread(filename_N,k))/Im(k); % for now I do it for the entire
image...
    imt(~BW(:,:,k))=NaN;
    im(:,:,k)=imt; %% replace im with the image only for the spheroids

% figure
% imagesc(imt)
% pause

%% Maks of images using the contour computed in the first code for EDU
im_mask=imt;
im_mask(BW(:,:,k))=1;
im_mask(~BW(:,:,k))=0;
% figure
% imshow(im_mask)

im_mask=logical(im_mask);

    imt_EDU=double(imread(filename_E,k));
    mm_EDU= median(imt_EDU(im_mask));
    bw_EDU=imt_EDU>1*mm_EDU; %% keep only intensity larger than the median value
% figure
% imshow(bw_EDU,[]);
% Pearson=corr2(imt(:,:,k), imt_EDU(:,:,k));
Im_EDU(k)=mean(imt_EDU(imt_EDU*mm_EDU)); %% take the mean of the image with pixel
is larger than the median value

    imt_EDU(~BW(:,:,k))=NaN;
    imt_EDU=imt_EDU./Im_EDU(k);
    im_EDU(:,:,k)=imt_EDU; %% replace im with the image only for the spheroids

% PR(k)= corr2(im_EDU(:,:,k), im(:,:,k));

```

```

rr = sum(sum(imr_1D(:).*imr_EDU_1D(:)))/sqrt(sum(sum(imr_1D(:).*imr_1D(:))*sum(sum
(imr_EDU_1D(:).*imr_EDU_1D(:)))));
% pearson_r=corr2(imr_1D,imr_EDU_1D);
end
PR_r(j)=rr;
end

PR_r_matrix(i,:)=PR_r;
%tutu=nanmedian(imr,1);
tutu=nanmean(imr,1); %% mean along theta %% for nucgreen
tutu_EDU=nanmean(imr_EDU,1); %% mean along theta for EDU
%
% figure
% imagesc(squeeze(tutu))
% figure
% imagesc(squeeze(tutu_EDU))
%
% Ir=nanmax(squeeze(tutu),[],2);

% Ir=nanmedian(squeeze(tutu),2);
Ir=nanmean(squeeze(tutu),2); %% mean along phi %% for nucgreen
Max_Ir=max(Ir);
Norm_Ir=Ir./Max_Ir;
Ir_flip=Ir';
Ir_matrix(i,:)=Ir_flip;

Ir_EDU=nanmean(squeeze(tutu_EDU),2); %% mean along phi %% for EDU
Ir_EDU_flip=Ir_EDU'; %% Saba 21/08
Ir_EDU_matrix(i,:)=Ir_EDU_flip; %% Saba 21/08
%% mean intensity Ir along the radius r (in µm already because everything is
calibrated
% figure
% plot(r(1:end-1),Norm_Ir(1:end-1),'+','Color','green')

hold on
plot(r(1:end-1),Ir_EDU(1:end-1),'--')
title(strcat('Mean Intensity as a function of the radius for all spheroids
'),'(starting from the center)');
xlabel('distance from the periphery(µm)','FontSize',20);
ylabel('Normalised Intensity','FontSize',20);

% hold on
cd(dossier_stock)
saveas(gcf,strcat('Mean Intensity as a function of the radius for all.fig'));
saveas(gcf,strcat('Mean Intensity as a function of the radius for all.jpg'));
save('wksap_R_
mat','r','Rf','r_norm','PR_r_matrix','Ir_EDU_matrix','r_norm_matrix','r_matrix','Ir
_matrix'); %% should be better to save only the variable of interest...
clear BW Im Zf Rf Xf Yf z r X Y %% clear data for the next loop
end

% figure mean with error bars of mean Intensity along radius %% saba 24/04
%% to do the figure only

```

```

load('wksp_R');
%%
PR_r_matrix_fliped = flip(PR_r_matrix,2);
intensit_EDU_flipped=flip(Ir_EDU_matrix,2);
dist_periph_norm=mean(r_norm_matrix);
dist_periph=mean(r_matrix);
cd(dossier_stock)
figure ('Name','Pearson coefficient (EDU-Nucgreen) as a function of distance from
the surface','NumberTitle','on','color','w');
cmp =[[1 0 0.6];[0 1 0];[0 0.4 1];[1 0 0]]; % couleur Saba time
%% mean intensity Nucgreen along radius
% cmap=cmp([1 2 3],:);
options.handle=gcf; %Figure handle to plot the result.
options.color_area=cmp(2,:); % RGB color of the filled area
options.color_line =cmp(2,:);% RGB color of the mean line
options.alpha = 0.1; %Alpha value for transparency
options.line_width = 2; %Mean line width
options.error = 'std'; % Type of error to plot (+/-) *
options.x_axis=dist_periph_norm; %% to get the normalised radius
plot_areaerrorbar_nanmean(PR_r_matrix_fliped,options);
xlabel('distance from the periphery(µm)','FontSize',20);
ylabel('Pearson Correlation Coefficient','FontSize',20);

saveas(gcf,[dossier_stock,'Pearson coefficient (EDU-Nucgreen) as a function of
distance from the surface_norm.fig']);
saveas(gcf,[dossier_stock,'Pearson coefficient (EDU-Nucgreen) as a function of
distance from the surface_norm.jpeg']);

cd(dossier_stock)

%% mean intensity EdU along radius

figure ('Name','EDU intensity as a function of distance from the
periphery','NumberTitle','on','color','w');
cmp =[[1 0 0.6];[0 1 0];[0 0.4 1];[1 0 0]]; % couleur Saba time
% cmap=cmp([1 2 3],:);
options.handle=gcf; %Figure handle to plot the result.
options.color_area=cmp(2,:); % RGB color of the filled area
options.color_line =cmp(2,:);% RGB color of the mean line
options.alpha = 0.1; %Alpha value for transparency
options.line_width = 2; %Mean line width
options.error = 'std'; % Type of error to plot (+/-) *
% options.x_axis=r; %% to get the good scale
options.x_axis=dist_periph_norm; %% to get the normalised radisu
plot_areaerrorbar_nanmean(intensit_EDU_flipped,options);
xlabel('distance from the periphery(µm)','FontSize',20);
ylabel('Normalised Intensity','FontSize',20);

saveas(gcf,[dossier_stock,'EDU mean intensity as a function of distance from the
periphery_norm.fig']);
saveas(gcf,[dossier_stock,'EDU mean intensity as a function of distance from the
periphery_norm.jpeg']);

```

J Protocole de la transduction des cellules MRC5

Afin que les cellules MRC5 soient différenciables des cellules cancéreuses dans les sphéroïdes en co-culture étudiés au chapitre 4, elles sont marquées en vert grâce à une transduction avec un lentivirus obtenu dans un kit commercial (Incucyte NucLight Green Lentivirus Puro, Sartorius). Le principe est d'utiliser un vecteur viral qui va permettre d'induire une modification génétique des cellules pour qu'elles produisent une protéine fluorescente dans le vert au sein de leur noyau. Cette modification génétique doit également permettre une résistance des cellules transduites à un antibiotique, afin de pouvoir sélectionner uniquement ces cellules et de pouvoir les multiplier pour les utiliser ensuite pour la production de sphéroïdes.

Dans un premier temps, il s'agit de déterminer la concentration d'antibiotique nécessaire pour tuer les cellules MRC5, en réalisant une gamme de concentration de l'antibiotique auquel les cellules transduites seront résistantes, la puromycine. Pour cela, on ensemence des cellules MRC5 dans un plaque 12 puits et on teste des concentrations de puromycine de 0 à 1 µg/mL. Après 72h, on marque la viabilité des cellules avec de l'IP et de la FDA, ce qui permet de déterminer que la concentration à utiliser est de 1 µg/mL.

Il faut ensuite déterminer la quantité de virus à ajouter pour permettre une transduction efficace, grâce aux informations fournies par le fournisseur. Le volume V de solution de virus dépend de la multiplicité d'infection (MOI), de la quantité de virus par mL ("Transducing Unit" en anglais ou TU), et du nombre de cellules à transduire (N), selon la relation suivante :

$$V = \frac{N \times MOI}{TU} \quad (6.2)$$

La MOI choisie est de 1, la TU vaut 1.1×10^7 unités/mL selon le fournisseur, et la quantité de cellules à transduire, ensemencées dans un puits d'une plaque de 12 puits, est de 7×10^4 cellules, ce qui donne un volume de solution de virus à ajouter de 6.36 µL.

La transduction peut ensuite être réalisée, en suivant le protocole donné par le fournisseur :

- Sortir le tube de lentivirus du congélateur -80°C et le mettre dans de la glace,
- Ajouter la quantité déterminée de lentivirus (6.36 µL ici) à 1 mL de milieu de culture,
- Ajouter ce milieu dans le puits contenant les cellules à transduire,
- Changer le milieu au bout de 24h,
- 72h après la transfection, remplacer le milieu par du milieu contenant 1 µg/mL de puromycine,
- Continuer la culture jusqu'à avoir uniquement des cellules vertes (contrôle en observant au microscope à fluorescence), puis passer les cellules dans des surfaces de culture de plus en plus grandes en arrêtant d'ajouter de la puromycine dans le milieu, afin de pouvoir congeler des aliquots de cellules à -80°C .

K Protocole de l'immunomarquage de la fibronectine

Le protocole utilisé pour réaliser l'immunomarquage de la fibronectine sur les sphéroïdes de cancer de pancréas est le suivant :

- Fixer la lame de sphéroïdes au PFA (4% dans PBS – 20 min) en rinçant 3 fois 5 min avec 1 mL de PBS avant et 3 fois 5 min avec une solution 3% BSA dans du PBS après fixation.
- Perméabiliser avec une solution de PBS et 0.5% de TritonX-100 (TX) pendant 20 min.
- Rincer 3 fois 5 min avec 1 mL de solution 3% BSA dans du PBS.

- Incuber la lame avec 1 mL de solution d'anticorps primaires anti-fibronectine (produits chez le lapin, Merck) dans du PBS avec 0.2% BSA et 0.1% TX avec une dilution de 1:400 une nuit à 4°C.
- Rincer 3 fois 5 min avec 1 mL de PBS puis la journée avec 1 mL de PBS.
- Incuber la lame avec 1 mL de solution d'anticorps secondaires anti-lapin (produits chez le mouton, IgG AlexaFluor 647 nm, Thermofischer) dans du PBS avec 0.2% BSA et 0.1% TX avec une dilution de 1:500 une nuit à 4°C .
- Rincer 3 fois 5 min avec 1 mL de PBS.
- Réaliser un marquage des noyaux si besoin (avec de l'IP pour laisser les canaux vert et rouge lointain libres respectivement pour les cellules MRC5 et la fibronectine, 30 min d'incubation à température ambiante dans une solution de PBS avec 30 µM d'IP, puis 3 rinçages de 5 min avec 1 mL de PBS).
- Incuber une nuit à 4°C avec du glycérol 80% dans du PBS pour la transparence.
- Montage lame/lamelle avec glycérol frais et conservation à 4°C avant observation au microscope confocal.

L Calcul de la constante d'électrodes pour une configuration interdigitée coplanaire

À partir des paramètres de la géométrie des IDE présentés sur la figure 5.2, il est possible de déterminer la constante d'électrode pour cette configuration, qui relie l'impédance complexe et la permittivité complexe de l'échantillon étudié avec ces électrodes, d'après la relation 5.1. D'après [Thanh-Tuan, 2015], cette constante K_{IDE} , exprimée en m^{-1} , peut être calculée selon la relation suivante :

$$K_{IDE} = \frac{2}{L(N-1)} \cdot \frac{K(k)}{K(\sqrt{1-k^2})}, \quad (6.3)$$

avec N le nombre de doigts des IDE, L la longueur d'un doigt, et K(k) l'intégrale elliptique incomplète du premier module k, qui vaut :

$$K(k) = \int_0^1 \frac{1}{\sqrt{(1-t^2)(1-k^2t^2)}} dt, \quad (6.4)$$

avec $k = \cos\left(\frac{\pi}{2} \cdot \frac{w}{w+e}\right)$, w la largeur d'un doigt et e la distance entre deux doigts consécutifs.

Le code Matlab utilisé pour calculer la constante d'électrode dans notre cas est le suivant (figure L.1) :

```

1  %definition des paramètres
2  - W=225*10^(-6); %m = largeur électrodes IDE
3  - S=175*10^(-6); %m = espacement entre électrodes IDE
4  - L=0.016; %m = longueur d'un peigne
5  - N=24; % nombre de peignes
6  - alpha=W/(S+W); %rapport de metallisation
7  - %-----
8  - k=cos(pi/2*alpha);
9  - fun=@(t,k) 1./sqrt((1-t.^2).*(1-k^2.*t.^2));
10 %valeurs de la fonction dans l'intégrale entre 0 et 1
11 - K_k=integral(@(x) fun(x,k),0,1)
12 - k2=sqrt(1-k^2)
13 - K_k2=integral(@(x) fun(x,k2),0,1)
14 - K_cell=(2*K_k)/((N-1)*L*K_k2)

```

FIGURE L.1 – Code Matlab permettant le calcul de la constante d'électrode des IDE-200.

M Mesures d'impédance pour le suivi de croissance

Dans la partie 5.3.2, le suivi de la croissance de sphéroïdes sous perfusion par mesure d'impédance est présenté, mais en normalisant les valeurs par rapport à une chambre témoin sans sphéroïdes, par le biais du calcul de l'évolution d'impédance normalisée (ΔZ_{norm}). Il paraît toutefois intéressant d'étudier également les valeurs absolues de l'impédance obtenue dans la chambre de culture des sphéroïdes, afin de s'assurer que ΔZ_{norm} n'introduit pas de biais. Ces mesures absolues sont présentées sur les figures M.1 et M.2 respectivement pour les expériences 1 et 2 réalisées.

Les résultats montrent que l'évolution en basse fréquence (figures M.1,a et c et M.2,a et c) est toujours cohérente avec le temps, mais en ce qui concerne l'expérience 2, l'évolution sur le plateau n'est pas cohérente (figure M.2,b et d), car la valeur à J3 est supérieure à celle de J1 et J2, alors que la croissance des sphéroïdes devrait entraîner une diminution de l'impédance au cours du temps sur cette plage de fréquences. Pour l'expérience 1 en revanche, l'évolution est en accord avec ce qui est attendu (figure M.1,b et d), à savoir une augmentation de l'impédance dans le milieu de culture, car les sphéroïdes sont moins conducteurs que ce milieu, et inversement dans le milieu Hépès de conductivité 0.03 S/m.

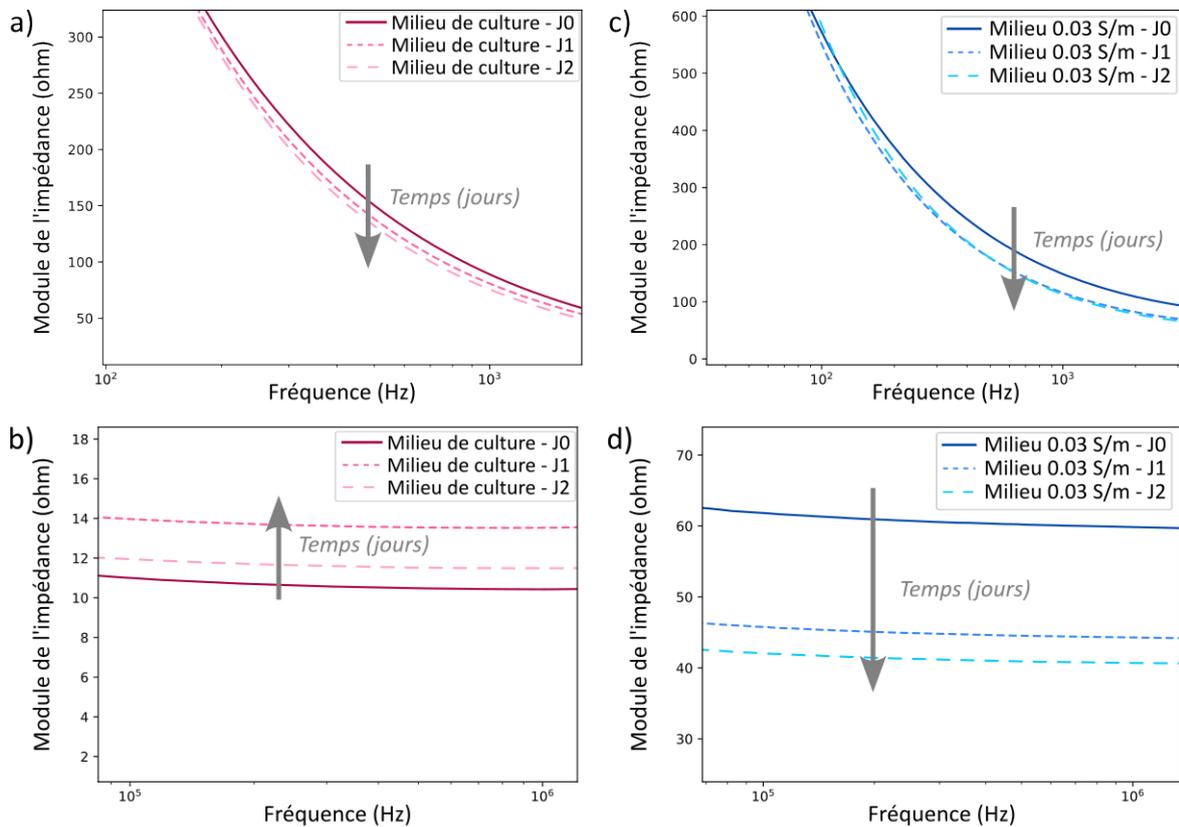


FIGURE M.1 – Expérience 1 : suivi de croissance de sphéroïdes de cellules HT29 par impédance dans le milieu de culture sans Hépès et le milieu 0.03 S/m en basse fréquence (respectivement a et c) et sur le plateau résistif (respectivement b et d).

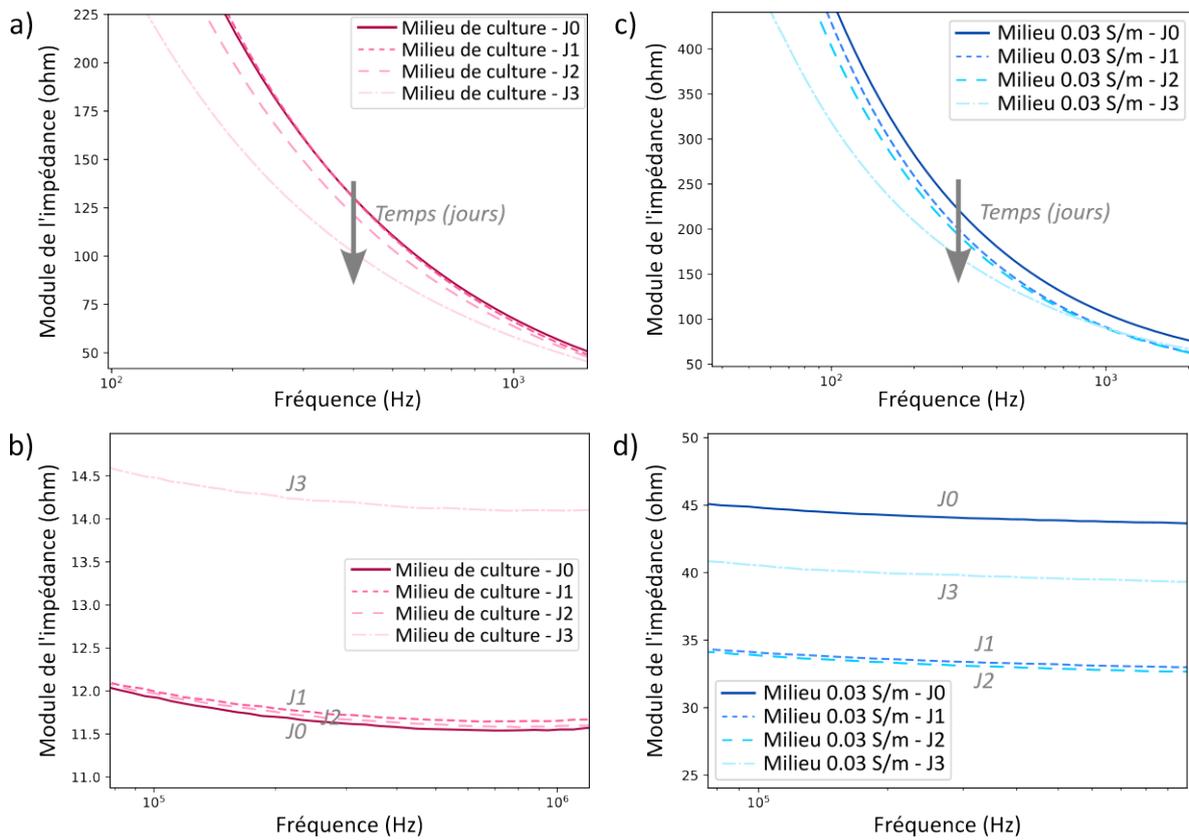


FIGURE M.2 – Expérience 2 : suivi de croissance de sphéroïdes de cellules HT29 par impédance dans le milieu de culture avec 25 mM d'Hépès et le milieu 0.03 S/m en basse fréquence (respectivement a et c) et sur le plateau résistif (respectivement b et d).

N Mesures d'impédance après ajout de TritonX-100 sur suspensions cellulaires

Afin de mieux comprendre le comportement observé lors de l'ajout de TritonX-100 dans la chambre contenant des sphéroïdes, une expérience similaire est réalisée sur une suspension cellulaire de cellules HT29 avec une fraction volumique de 3%, du même ordre de grandeur que la fraction volumique équivalente en sphéroïdes dans l'expérience présentée au chapitre 5. Pour cela, on mesure tout d'abord l'impédance sur cette suspension dans du milieu Hépès de conductivité 0.03 S/m et on attend que la mesure soit stable (environ 10 min), pour obtenir la courbe orange en pointillés sur la figure N.1. On constate sur le plateau que la dispersion β est bien visible comme c'était le cas sur les résultats sur cellules en suspension présentés au chapitre 5. On prend la même suspension de cellules et on y ajoute 10% en volume de TritonX-100 (TX), puis on l'injecte dans le microsystème pour en mesurer l'impédance au cours du temps. On obtient alors le faisceau de courbes présenté sur la figure N.1. Le comportement a totalement changé puisqu'on ne distingue plus la dispersion, ce qui peut être attribué au fait que les cellules ont été perméabilisées par le TX, ce qui a entraîné leur mort. Comme on ne peut pas injecter le TX dans le microsystème contenant les cellules au risque de perdre les cellules à cause du flux, il n'est pas possible de suivre l'effet du TX sur les cellules en suspension dans les premières secondes après son ajout, mais celui-ci semble très rapide puisque dès les premières mesures, moins d'une minute après l'ajout de TX dans la suspension de cellules, on observe ce comportement, très proche de l'allure de l'impédance en l'absence de cellules, mais avec une valeur globalement légèrement supérieure à celle pour le milieu Hépès contenant 10% de TX (courbe bleue en pointillés). On peut dire que, comme pour ce qui a été observé sur les sphéroïdes, la présence de TX dans le milieu tue les cellules et cela se retrouve sur l'impédance

avec une allure similaire au milieu sans cellules. La présence de nombreuses cellules mortes dans la zone de sensibilité des électrodes semble toutefois avoir comme effet de diminuer la conductivité de la solution de TX, puisque l'impédance avec cellules et TX est supérieure à celle sans cellules.

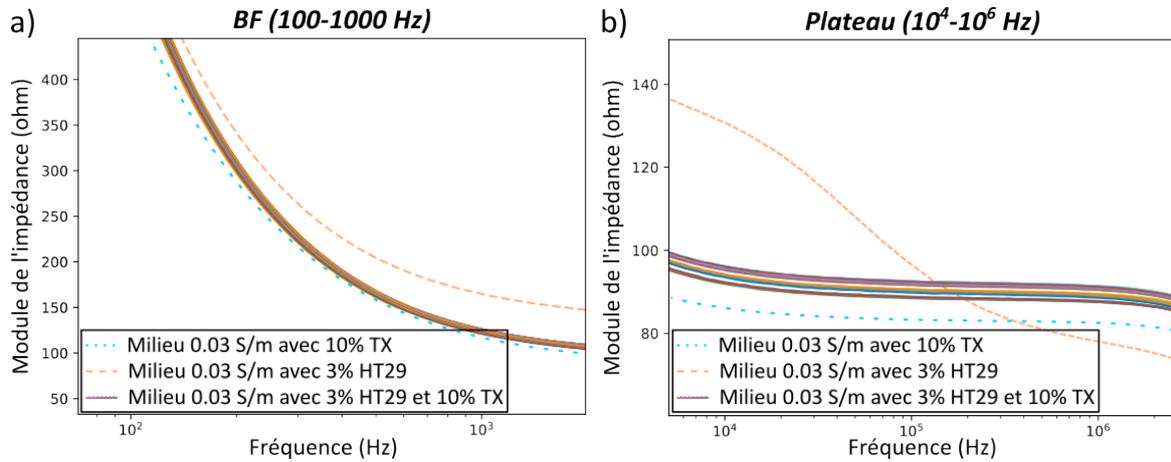


FIGURE N.1 – Module de l'impédance mesuré avec les IDE-200 sur une suspension de 3% de cellules HT29 avant et après ajout de 10% de TritonX-100. (a) Allure en basse fréquence (100-1000 Hz). (b) Allure sur le plateau (10^4 - 10^6 Hz).

O Mesures d'impédance après EPN sans cellules et sur suspension cellulaire

Des mesures d'impédance juste après EPN de sphéroïdes sont présentées au chapitre 5. Afin de mieux comprendre les comportements observés, on réalise deux expériences de contrôle : une de mesure d'impédance après EPN de milieu Hépès 0.03 S/m seul, et une après EPN d'une suspension de 3% de cellules HT29 dans ce même milieu.

Le suivi sur milieu seul est présenté sur la figure O.1, en représentant l'évolution dans le temps de l'impédance normalisée par rapport à la valeur avant EPN sur deux plages de fréquences. On constate qu'en basse fréquence (figure O.1,a), il y a une légère évolution dans le temps, alors que sur le plateau (figure O.1,b), l'impédance reste constante mais inférieure à la valeur initiale. Cela pourrait être dû à la présence de petites bulles dans la chambre après EPN et peut-être à un léger échauffement du milieu dû à l'application du champ, qui pourrait augmenter la conductivité de celui-ci, donc diminuer l'impédance. Dans tous les cas, même si en basse fréquence le comportement se rapproche de celui en présence de cellules, sur le plateau, il est différent puisqu'on n'observe pas de diminution dans les premières minutes avec un retour à une valeur proche de la valeur initiale en une dizaine de minutes, comme cela était le cas sur les sphéroïdes (figure 5.22).

En revanche, on retrouve bien ce comportement sur les mesures en présence de cellules en suspension (figure O.2). On constate toutefois deux comportements différents sur le plateau, ce qui est dû à la dispersion β , et au fait qu'après EPN, celle-ci est moins marquée qu'avant EPN. L'impédance entre 10^5 et 10^6 Hz devient alors supérieure à l'impédance avant EPN.

En conclusion, il semble tout de même possible de dire que le comportement sur le plateau après EPN en présence de cellules ou de sphéroïdes est lié à la perméabilisation des cellules, avec une augmentation de la conductivité tout de suite après EPN (donc une diminution de l'impédance), puis une diminution de la conductivité (donc une augmentation de l'impédance)

durant environ 10 minutes pour retrouver une valeur proche de celle avant EPN, qui semble liée au fait que les cellules se referment puisque l'EPN est réversible. Ces résultats sont cohérents avec les constantes de temps trouvées par [Z. Zhang et al., 2020] sur cellule unique.

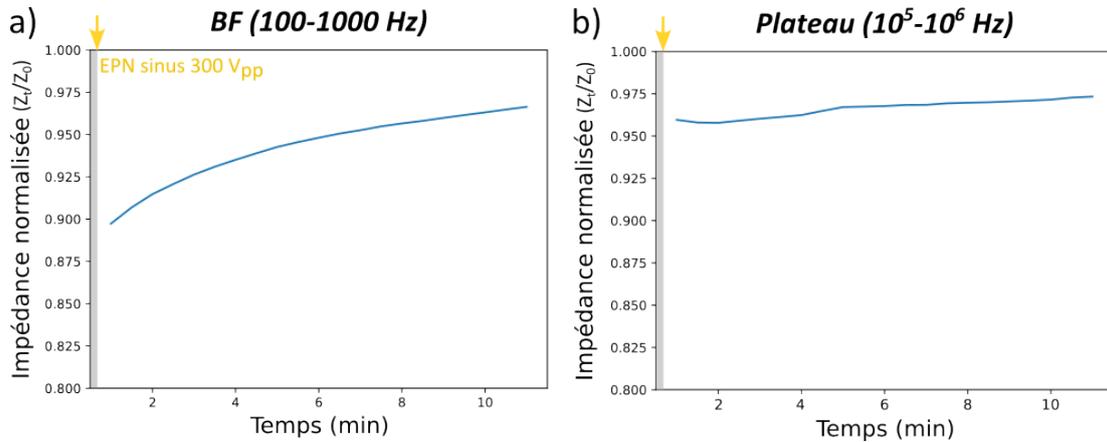


FIGURE O.1 – Évolution du module de l'impédance moyen mesuré dans le microsystème avec les IDE-200 contenant du milieu Hépès 0.03 S/m sans cellules à un temps t (Z_t) après EPN, normalisé par rapport à celui avant EPN (Z_0) (a) en basse fréquence et (b) sur le plateau.

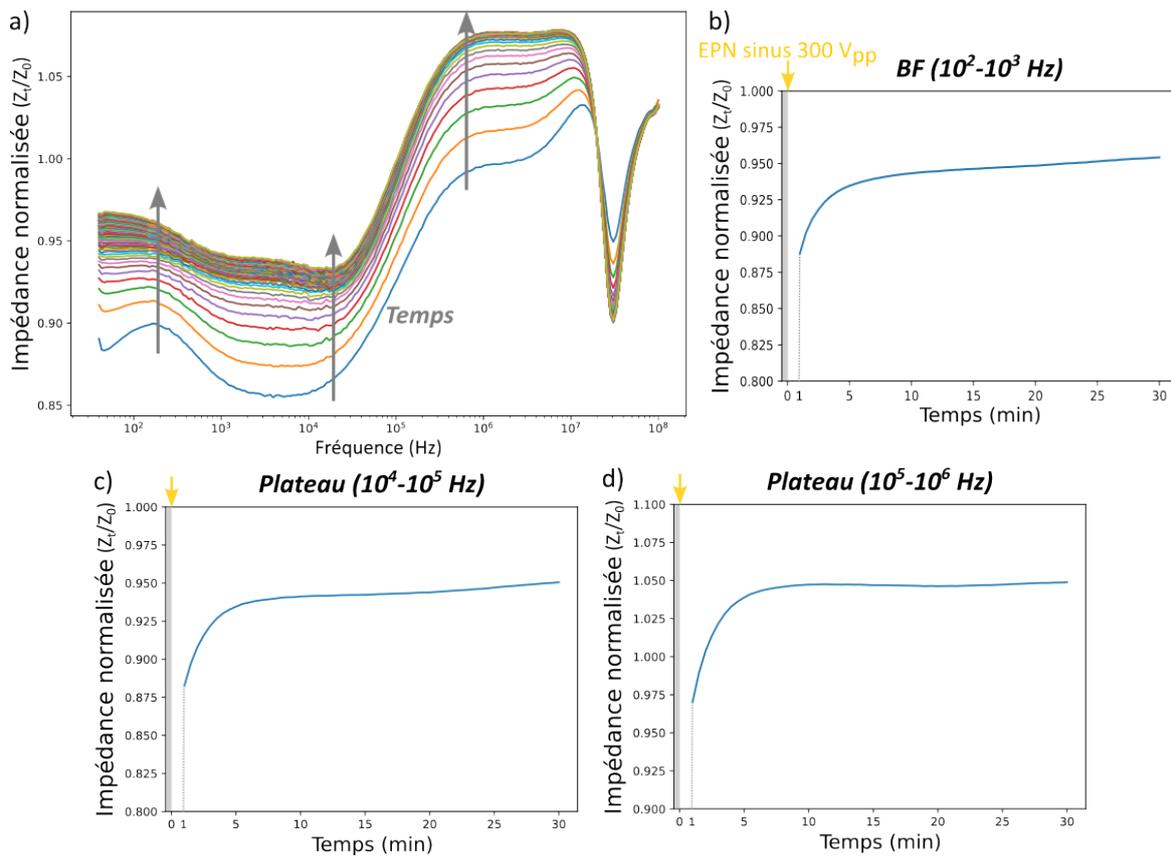


FIGURE O.2 – Évolution du module de l'impédance, mesuré dans le microsystème avec les IDE-200 contenant du milieu Hépès 0.03 S/m avec 3% de cellules HT29, à un temps t (Z_t) après EPN, normalisé par rapport à celui avant EPN (Z_0). (a) Impédance normalisée en fonction de la fréquence. (b-d) Évolution du module moyen de l'impédance normalisé (b) en basse fréquence, (c) entre 10^4 et 10^5 Hz, et (d) entre 10^5 et 10^6 Hz.

LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Article de journal

Bregigeon, P., Rivière, C., Franqueville, L., Vollaire, C., Marchalot, J., Frénéa-Robin, M., 2022. Integrated platform for culture, observation, and parallelized electroporation of spheroids. *Lab on a Chip* 22, 2489–2501. <https://doi.org/10.1039/D2LC00074A>

Conférences

Présentation orale : P. Bregigeon, M. Frénéa-Robin, C. Rivière, L. Franqueville, C. Vollaire et J. Marchalot, "High throughput electroporation microsystem using sine wave bursts to deliver biomolecules into cell spheroids", BioEM2021, Sep 26 - Oct 01 2021, Ghent, Belgium - *Prix de la meilleure présentation orale sur site*.

Poster : P. Bregigeon, J. Marchalot, L. Franqueville, C. Vollaire, M. Frénéa-Robin and C. Rivière, "Study of electrochemotherapy effect in cell spheroids using a microfluidic device based on glass technology", The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2021), October 10-14, Palm Springs, USA (Online).

Présentation orale : P. Bregigeon, M. Frénéa-Robin, J. Marchalot, L. Franqueville, C. Vollaire et C. Rivière, "A new platform for culture and electroporation of 3d cell constructs based on a porous scaffold", Biomat, 19-22 octobre 2021, Bourg Saint Maurice, France.

Présentation orale : P. Bregigeon, T. Le Berre, J. Marchalot, L. Franqueville, C. Vollaire, C. Rivière et M. Frénéa-Robin, "Microsystème fluide pour la culture, l'étude et l'électroporation in vitro de structures cellulaires 3D type sphéroïdes", Colloque conjoint HappyBio-SFPb-SFPMed, novembre 2021, Toulouse, France - *Prix de la meilleure présentation*.

Présentation orale : P. Bregigeon, T. Le Berre, C. Rivière, L. Franqueville, C. Vollaire, M. Frénéa-Robin et J. Marchalot, "Développement d'un dispositif pour l'étude in vitro de l'électroporation de structures cellulaires 3D type sphéroïdes", JCGE 2022, 14-17 juin 2022, Le Croisic, France - *Grand Prix Michel Amiet*.

Présentation orale : P. Bregigeon, T. Le Berre, J. Marchalot, L. Franqueville, C. Vollaire, M. Frénéa-Robin et C. Rivière, "Microfluidic system for culture, monitoring and electroporation of spheroids based on a hydrogel scaffold", Workshop Mechanobiology, 27 juin 2022, Lyon, France.

Présentation orale : P. Bregigeon, T. Le Berre, C. Rivière, L. Franqueville, C. Vollaire, J. Marchalot et M. Frénéa-Robin, "Bio-impedance and Microscopy Monitoring of Spheroid Inside a Microfluidic Device for Electro-Chemotherapy Applications", ESB 2022, September 4-8 2022, Bordeaux, France.

Présentation orale : P. Bregigeon, T. Le Berre, J. Marchalot, L. Franqueville, C. Vollaire, C. Rivière et M. Frénéa-Robin, "Application of a new electroporation microsystem to the study of the impact of tumor microenvironment on electrochemotherapy efficiency", World Congress EPN 2022, October 9-13 2022, Copenhagen, Denmark.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDUL KADIR, L. et al. (2018). « Emerging Roles of the Membrane Potential : Action Beyond the Action Potential ». *Frontiers in Physiology* 9.
- ABIDOR, I. G. et al. (1979). « Electric breakdown of bilayer lipid membranes : I. The main experimental facts and their qualitative discussion ». *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 104, p. 37-52. DOI : 10.1016/S0022-0728(79)81006-2.
- ABOU ALI, E. et al. (2018). « Ultrasonic cavitation induces necrosis and impairs growth in three-dimensional models of pancreatic ductal adenocarcinoma ». *PLOS ONE* 13.12. Sous la dir. d'A. AHMAD, e0209094. DOI : 10.1371/journal.pone.0209094.
- AHMAD, A. et al. (2021). « Clearing spheroids for 3D fluorescent microscopy : combining safe and soft chemicals with deep convolutional neural network ». Company : Cold Spring Harbor Laboratory Distributor : Cold Spring Harbor Laboratory Label : Cold Spring Harbor Laboratory Section : New Results Type : article. DOI : 10.1101/2021.01.31.428996.
- AHMADZADA, T. et al. (2018). « Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer ». *Biophysical Reviews* 10.1, p. 69-86. DOI : 10.1007/s12551-017-0392-1.
- ALEXANDER, F., EGGERT, S. et al. (2019). « Label-Free Monitoring of 3D Tissue Models via Electrical Impedance Spectroscopy ». *Label-Free Monitoring of Cells in vitro*. Sous la dir. de J. WEGENER. T. 2. Series Title : Bioanalytical Reviews. Cham : Springer International Publishing, p. 111-134. DOI : 10.1007/11663_2018_5.
- ALEXANDER, F., PRICE, D. T. et al. (2013). « From Cellular Cultures to Cellular Spheroids : Is Impedance Spectroscopy a Viable Tool for Monitoring Multicellular Spheroid (MCS) Drug Models? » *IEEE Reviews in Biomedical Engineering* 6, p. 63-76. DOI : 10.1109/RBME.2012.2222023.
- ANDERSON, E. M. et al. (2021). « Advances in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Treatment ». *Cancers* 13.21, p. 5510. DOI : 10.3390/cancers13215510.
- ANDERSON, N. M. et al. (2020). « The tumor microenvironment ». *Current Biology* 30.16, R921-R925. DOI : 10.1016/j.cub.2020.06.081.

- ANDRÉ, F. et al. (2004). « DNA electrotransfer : its principles and an updated review of its therapeutic applications ». *Gene Therapy* 11.S1, S33-S42. DOI : 10.1038/sj.gt.3302367.
- ARENA, C. B. et al. (2012). « A Three-Dimensional In Vitro Tumor Platform for Modeling Therapeutic Irreversible Electroporation ». *Biophysical Journal* 103.9, p. 2033-2042. DOI : 10.1016/j.bpj.2012.09.017.
- ARSHAD, R. N. et al. (2021). « Pulsed electric field : A potential alternative towards a sustainable food processing ». *Trends in Food Science & Technology* 111, p. 43-54. DOI : 10.1016/j.tifs.2021.02.041.
- ASAMI, K. (2002). « Characterization of heterogeneous systems by dielectric spectroscopy ». *Prog. Polym. Sci.*, p. 43.
- BALKWILL, F. R. et al. (2012). « The tumor microenvironment at a glance ». *Journal of Cell Science* 125.23, p. 5591-5596. DOI : 10.1242/jcs.116392.
- BASTRUP, F. A. et al. (2022). « Electrochemotherapy with intravenous bleomycin for patients with cutaneous malignancies, across tumour histology : a systematic review ». *Acta Oncologica* 61.9, p. 1093-1104. DOI : 10.1080/0284186X.2022.2110385.
- BATISTA NAPOTNIK, T. et al. (2018). « In vitro electroporation detection methods – An overview ». *Bioelectrochemistry* 120, p. 166-182. DOI : 10.1016/j.bioelechem.2017.12.005.
- BHOSALE, R. R. et al. (2018). « Current Perspectives on Novel Drug Carrier Systems and Therapies for Management of Pancreatic Cancer : An Updated Inclusive Review ». *Critical ReviewsTM in Therapeutic Drug Carrier Systems* 35.3, p. 195-292. DOI : 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018019429.
- BIAN, S. et al. (2017). « High-throughput in situ cell electroporation microsystem for parallel delivery of single guide RNAs into mammalian cells ». *Scientific Reports* 7.1. DOI : 10.1038/srep42512.
- BLOOM, D. et al. (2005). « The role of intratumour therapy with electroporation and bleomycin in the management of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck ». *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 31.9, p. 1029-1035. DOI : 10.1016/j.ejso.2005.04.007.
- CALVET, C. Y. et al. (2016). « The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy ». *Cancer and Metastasis Reviews* 35.2, p. 165-177. DOI : 10.1007/s10555-016-9615-3.
- CAMPANA, L. G., EDHEMOVIC, I. et al. (2019). « Electrochemotherapy – Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration ». *European Journal of Surgical Oncology* 45.2, p. 92-102. DOI : 10.1016/j.ejso.2018.11.023.
- CAMPANA, L. G., MIKLAVČIČ, D. et al. (2019). « Electrochemotherapy of superficial tumors – Current status : : Basic principles, operating procedures, shared indications, and emerging

- applications ». *Seminars in Oncology* 46.2, p. 173-191. DOI : 10.1053/j.seminoncol.2019.04.002.
- CANALI, C. et al. (2015). « Bioimpedance monitoring of 3D cell culturing—Complementary electrode configurations for enhanced spatial sensitivity ». *Biosensors and Bioelectronics* 63, p. 72-79. DOI : 10.1016/j.bios.2014.07.020.
- CANATELLA, P. J. et al. (2004). « Tissue Electroporation : Quantification and Analysis of Heterogeneous Transport in Multicellular Environments ». *Biophysical Journal* 86.5, p. 3260-3268. DOI : 10.1016/S0006-3495(04)74374-X.
- CARVER, S. E. et al. (1999). « Semi-Continuous Perfusion System for Delivering Intermittent Physiological Pressure to Regenerating Cartilage ». *Tissue Engineering* 5.1, p. 1-11. DOI : 10.1089/ten.1999.5.1.
- CASTELVI, Q. (2014). « Les Mesures de Bio-impédance pour l'Electroporation ». *La Revue 3EI* 75, p. 1-6.
- CEMAZAR, M. et al. (2010). « Cancer Electrogenic Therapy with Interleukin-12 ». *Current gene therapy* 10, p. 300-11. DOI : 10.2174/156652310791823425.
- CHOI, Y.-S. et al. (2009). « On-chip testing device for electrochemotherapeutic effects on human breast cells ». *Biomedical Microdevices* 11.1, p. 151-159. DOI : 10.1007/s10544-008-9220-5.
- CHOPINET, L. et al. (2012). « First explanations for differences in electrotransfection efficiency in vitro and in vivo using spheroid model ». *International Journal of Pharmaceutics* 423.1, p. 7-15. DOI : 10.1016/j.ijpharm.2011.04.054.
- CICCOLINI, J. et al. (2016). « Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology : an EORTC-PAMM perspective ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78.1, p. 1-12. DOI : 10.1007/s00280-016-3003-0.
- COSTA, E. C., MOREIRA, A. F. et al. (2016). « 3D tumor spheroids : an overview on the tools and techniques used for their analysis ». *Biotechnology Advances* 34.8, p. 1427-1441. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.
- COSTA, E. C., SILVA, D. N. et al. (2019). « Optical clearing methods : An overview of the techniques used for the imaging of 3D spheroids ». *Biotechnology and Bioengineering* 116.10. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.27105>, p. 2742-2763. DOI : 10.1002/bit.27105.
- COTTET, J. (2018). « Development of microsystems for the controlled formation of cell aggregates by dielectrophoresis ». Ingénierie pour le vivant. Université de Lyon.
- COTTET, J., FABREGUE, O. et al. (2019). « MyDEP : A New Computational Tool for Dielectric Modeling of Particles and Cells ». *Biophysical Journal* 116.1, p. 12-18. DOI : 10.1016/j.bpj.2018.11.021.

- COTTET, J., KEHREN, A., LASLI, S. et al. (2019). « Dielectrophoresis-assisted creation of cell aggregates under flow conditions using planar electrodes ». *ELECTROPHORESIS* 40.10. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/elps.201800435>, p. 1498-1509. DOI : 10.1002/elps.201800435.
- COTTET, J., KEHREN, A., LINTEL, H. van et al. (2019). « How to improve the sensitivity of coplanar electrodes and micro channel design in electrical impedance flow cytometry : a study ». *Microfluidics and Nanofluidics* 23.1, p. 11. DOI : 10.1007/s10404-018-2178-6.
- CURTO, V. F. et al. (2018). « A planar impedance sensor for 3D spheroids ». *Lab on a Chip* 18.6. Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 933-943. DOI : 10.1039/C8LC00067K.
- DAS, D. et al. (2014). « Evaluation of single cell electrical parameters from bioimpedance of a cell suspension ». *RSC Advances* 4.35. Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 18178-18185. DOI : 10.1039/C4RA00400K.
- DE LEON, S. E. et al. (2021). « Extending In-Plane Impedance Measurements from 2D to 3D Cultures : Design Considerations ». *Bioengineering* 8.1, p. 11. DOI : 10.3390/bioengineering8010011.
- DE LEÓN, S. E. et al. (2020). « Three-Dimensional (3D) cell culture monitoring : Opportunities and challenges for impedance spectroscopy ». *Biotechnology and Bioengineering* 117.4, p. 1230-1240. DOI : 10.1002/bit.27270.
- DERMOL, J. et al. (2014). « Predicting electroporation of cells in an inhomogeneous electric field based on mathematical modeling and experimental CHO-cell permeabilization to propidium iodide determination ». *Bioelectrochemistry* 100, p. 52-61. DOI : 10.1016/j.bioelechem.2014.03.011.
- DEVI, G. R. (2006). « siRNA-based approaches in cancer therapy ». *Cancer Gene Therapy* 13.9, p. 819-829. DOI : 10.1038/sj.cgt.7700931.
- DING, S.-M. et al. (2018). « The role of cancer-associated fibroblast MRC-5 in pancreatic cancer ». *Journal of Cancer* 9.3, p. 614-628. DOI : 10.7150/jca.19614.
- DOLZNIG, H. et al. (2011). « Modeling Colon Adenocarcinomas in Vitro ». *The American Journal of Pathology* 179.1, p. 487-501. DOI : 10.1016/j.ajpath.2011.03.015.
- DUNN, K. W. et al. (2011). « A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300.4. Publisher : American Physiological Society, p. C723-C742. DOI : 10.1152/ajpce11.00462.2010.
- EDHEMOVIC, I. et al. (2011). « Electrochemotherapy : A New Technological Approach in Treatment of Metastases in the Liver ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 10.5, p. 475-485. DOI : 10.7785/tcrt.2012.500224.
- EICHLER, M. et al. (2015). « A novel 96-well multielectrode array based impedimetric monitoring platform for comparative drug efficacy analysis on 2D and 3D brain tumor cultures ». *Biosensors and Bioelectronics*. Special Issue : BIOSENSORS 2014 67, p. 582-589. DOI : 10.1016/j.bios.2014.09.049.

- FANG, G. et al. (2019). « Gradient-sized control of tumor spheroids on a single chip ». *Lab on a Chip*, p. 12.
- FIORENTZIS, M., VIESTENZ, A., SEITZ, B. et al. (2020). « Electrochemotherapy in 3D Ocular Melanoma Spheroids using a Customized Electrode ». *Journal of Visualized Experiments* 158, p. 60611. DOI : 10.3791/60611.
- FIORENTZIS, M., VIESTENZ, A., SIEBOLTS, U. et al. (2019). « The Potential Use of Electrochemotherapy in the Treatment of Uveal Melanoma : In Vitro Results in 3D Tumor Cultures and In Vivo Results in a Chick Embryo Model ». *Cancers* 11.9, p. 1344. DOI : 10.3390/cancers11091344.
- FITZGERALD, K. A. et al. (2015). « Life in 3D is never flat : 3D models to optimise drug delivery ». *Journal of Controlled Release* 215, p. 39-54. DOI : 10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
- FOX, M. B. et al. (2006). « Electroporation of cells in microfluidic devices : a review ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385.3, p. 474-485. DOI : 10.1007/s00216-006-0327-3.
- FRANCHI-MENDES, T. et al. (2021). « 3D Cancer Models : Depicting Cellular Crosstalk within the Tumour Microenvironment ». *Cancers* 13.18, p. 4610. DOI : 10.3390/cancers13184610.
- FRANSEN, S. K., GIBOT, L. et al. (2015). « Calcium Electroporation : Evidence for Differential Effects in Normal and Malignant Cell Lines, Evaluated in a 3D Spheroid Model ». *PLoS ONE* 10.12. Sous la dir. de B. RUBINSKY, e0144028. DOI : 10.1371/journal.pone.0144028.
- FRANSEN, S. K., GISSEL, H. et al. (2014). « Calcium electroporation in three cell lines : a comparison of bleomycin and calcium, calcium compounds, and pulsing conditions ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840.3, p. 1204-1208. DOI : 10.1016/j.bbagen.2013.12.003.
- FU, W. et al. (2023). « Combinatorial Drug Screening Based on Massive 3D Tumor Cultures Using Micropatterned Array Chips ». *Analytical Chemistry*, acs.analchem.2c04816. DOI : 10.1021/acs.analchem.2c04816.
- GAO, B. et al. (2019). « Fabrication of three-dimensional islet models by the geometry-controlled hanging-drop method ». *Acta Mechanica Sinica* 35.2, p. 329-337. DOI : 10.1007/s10409-019-00856-z.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, T. (2015). « Development of devices and techniques for electroporation and electrical impedance spectroscopy analysis of adherent cells ». Thèse de doct. Universitat Politècnica de Catalunya.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, T. et al. (2018). « Sine wave electropermeabilization reveals the frequency-dependent response of the biological membranes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860.5, p. 1022-1034. DOI : 10.1016/j.bbamem.2018.01.018.
- GAWAD, S., SCHILD, L. et al. (2001). « Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing ». *Lab on a Chip* 1.1, p. 76. DOI : 10.1039/b103933b.

- GAWAD, S., CHEUNG, K. et al. (2004). « Dielectric spectroscopy in a micromachined flow cytometer : theoretical and practical considerations ». *Lab on a Chip* 4.3. Publisher : Royal Society of Chemistry, p. 241-251. DOI : 10.1039/B313761A.
- GEBOERS, B. et al. (2020). « High-Voltage Electrical Pulses in Oncology : Irreversible Electroporation, Electrochemotherapy, Gene Electrotransfer, Electrofusion, and Electroimmunotherapy ». *Radiology* 295.2, p. 254-272. DOI : 10.1148/radiol.2020192190.
- GENG, T. et al. (2013). « Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery ». *Lab Chip* 13.19, p. 3803-3821. DOI : 10.1039/C3LC50566A.
- GERASIMENKO, T. et al. (2020). « Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, p. 474. DOI : 10.3389/fbioe.2019.00474.
- GIBOT, L., MONTIGNY, A. et al. (2020). « Calcium Delivery by Electroporation Induces In Vitro Cell Death through Mitochondrial Dysfunction without DNA Damages ». *Cancers* 12.2, p. 425. DOI : 10.3390/cancers12020425.
- GIBOT, L., ROLS, M.-P. (2013). « 3D Spheroids' Sensitivity to Electric Field Pulses Depends on Their Size ». *The Journal of Membrane Biology* 246.10, p. 745-750. DOI : 10.1007/s00232-013-9535-x.
- GOLZIO, M. et al. (2002). « Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.3, p. 1292-1297. DOI : 10.1073/pnas.022646499.
- GOODARZI, S. (2021). « Multicellular Tumour Spheroid (MCTS) model for evaluation of the efficiency of nanoparticle drug delivery ». Biological Physics. Université de Lyon.
- GOODARZI, S. et al. (2021). « Quantifying nanotherapeutic penetration using a hydrogel-based microsystem as a new 3D in vitro platform ». *Lab on a Chip* 21.13. Publisher : Royal Society of Chemistry, p. 2495-2510. DOI : 10.1039/D1LC00192B.
- GOUARDERES, S., GIBOT, L. (2022). « Pulsed electric fields induce extracellular matrix remodeling through MMPs activation, and decreased collagen production ». *Journal of Investigative Dermatology* 142.5, p. 1326-1337.
- GOUARDERES, S., MINGOTAUD, A.-F. et al. (2020). « Vascular and extracellular matrix remodeling by physical approaches to improve drug delivery at the tumor site ». *Expert Opinion on Drug Delivery* 17.12, p. 1703-1726. DOI : 10.1080/17425247.2020.1814735.
- GRANATA, V. et al. (2015). « Electrochemotherapy in locally advanced pancreatic cancer : Preliminary results ». *International Journal of Surgery* 18, p. 230-236. DOI : 10.1016/j.ijssu.2015.04.055.
- GREEN, N. G. et al. (2002). « Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. III. Observation of streamlines and numerical simulation ». *Physical Review E* 66.2, p. 026305. DOI : 10.1103/PhysRevE.66.026305.

- GUO, F. et al. (2016). « Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.6. Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 1522-1527. DOI : 10.1073/pnas.1524813113.
- HAJATDOOST, L. et al. (2018). « Chemotherapy in Pancreatic Cancer : A Systematic Review ». *medicina*, p. 17.
- HAMBURGER, A. W. et al. (1977). « Primary Bioassay of Human Tumor Stem Cells ». *Science* 197.4302. Publisher : American Association for the Advancement of Science, p. 461-463. DOI : 10.1126/science.560061.
- HAN, Y. L. et al. (2020). « Cell swelling, softening and invasion in a three-dimensional breast cancer model ». *Nature physics* 16.1, p. 101-108. DOI : 10.1038/s41567-019-0680-8.
- HARRISON, R. (1907). « Biology and medicine. Observations on the living developing nerve fiber ». *Sci. Proc.* T. 98.
- HEILEMAN, K. et al. (2013). « Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis ». *Biosensors and Bioelectronics* 49, p. 348-359. DOI : 10.1016/j.bios.2013.04.017.
- HELLER, L. et al. (2000). « In vivo electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumour immunity : » *Melanoma Research* 10.6, p. 577-583. DOI : 10.1097/00008390-200012000-00010.
- HIRSCHHAEUSER, F. et al. (2010). « Multicellular tumor spheroids : An underestimated tool is catching up again ». *Journal of Biotechnology* 148.1, p. 3-15. DOI : 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
- HOARAU-VÉCHOT, J. et al. (2018). « Halfway between 2D and Animal Models : Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions ? » *International Journal of Molecular Sciences* 19.1, p. 181. DOI : 10.3390/ijms19010181.
- HUANG, Y. et al. (2003). « Instantaneous, quantitative single-cell viability assessment by electrical evaluation of cell membrane integrity with microfabricated devices ». *Sensors and Actuators A : Physical* 105.1, p. 31-39. DOI : 10.1016/S0924-4247(03)00084-0.
- HUBER, J. M. et al. (2016). « Evaluation of assays for drug efficacy in a three-dimensional model of the lung ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 142.9, p. 1955-1966. DOI : 10.1007/s00432-016-2198-0.
- HWANG, H. J. et al. (2019). « Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate cells ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38.1, p. 258. DOI : 10.1186/s13046-019-1225-9.
- ITAGAKI, A. et al. (1974). « TES and HEPES buffers in mammalian cell cultures and viral studies : Problem of carbon dioxide requirement ». *Experimental Cell Research* 83.2, p. 351-361. DOI : 10.1016/0014-4827(74)90349-8.

- IVASCU, A. et al. (2006). « Rapid Generation of Single-Tumor Spheroids for High-Throughput Cell Function and Toxicity Analysis ». *SLAS Discovery* 11.8, p. 922-932. DOI : 10.1177/1087057106292763.
- IZZO, F. et al. (2020). « New Deployable Expandable Electrodes in the Electroporation Treatment in a Pig Model : A Feasibility and Usability Preliminary Study ». *Cancers* 12.2. Number : 2 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 515. DOI : 10.3390/cancers12020515.
- JAIN, T. et al. (2012). « In situ electroporation of surface-bound siRNAs in microwell arrays ». *Lab on a Chip* 12.5, p. 939. DOI : 10.1039/c2lc20931d.
- JAROSZESKI, M. J. et al. (2000). « Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro : » *Anti-Cancer Drugs* 11.3, p. 201-208. DOI : 10.1097/00001813-200003000-00008.
- JEN, C.-P. et al. (2004). « Site-specific enhancement of gene transfection utilizing an attracting electric field for DNA plasmids on the electroporation microchip ». *Journal of Microelectromechanical Systems* 13.6. Conference Name : Journal of Microelectromechanical Systems, p. 947-955. DOI : 10.1109/JMEMS.2004.835758.
- JEONG, S.-Y. et al. (2016). « Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment ». *PLOS ONE* 11.7. Publisher : Public Library of Science, e0159013. DOI : 10.1371/journal.pone.0159013.
- JORDAN, E. T. et al. (2008). « Optimizing Electroporation Conditions in Primary and Other Difficult-to-Transfect Cells ». 19.5, p. 7.
- KAPALCZYŃSKA, M. et al. (2016). « 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures ». *Archives of Medical Science*. DOI : 10.5114/aoms.2016.63743.
- KATT, M. E. et al. (2016). « In Vitro Tumor Models : Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 4.
- KE, N. et al. (2011). « The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability ». *Mammalian Cell Viability*. Sous la dir. de M. J. STODDART. T. 740. Series Title : Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ : Humana Press, p. 33-43. DOI : 10.1007/978-1-61779-108-6_6.
- KEITHLEY, R. B. et al. (2013). « Single Cell Metabolic Profiling of Tumor Mimics ». *Analytical Chemistry* 85.19, p. 8910-8918. DOI : 10.1021/ac402262e.
- KELM, J. M. et al. (2003). « Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types ». *Biotechnology and Bioengineering* 83.2. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.10655>, p. 173-180. DOI : 10.1002/bit.10655.
- KHINE, M. et al. (2005). « A single cell electroporation chip ». *Lab on a Chip* 5.1. Publisher : Royal Society of Chemistry, p. 38-43. DOI : 10.1039/B408352K.

- KIENINGER, J. et al. (2018). « Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip ». *Lab on a Chip* 18.9. Publisher : Royal Society of Chemistry, p. 1274-1291. DOI : 10.1039/C7LC00942A.
- KIMURA, H. et al. (2008). « An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models ». *Lab on a Chip* 8.5, p. 741-746. DOI : 10.1039/b717091b.
- KINOSITA, K. et al. (1977). « Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane ». 268.5619, p. 438-441. DOI : doi:10.1038/268438a0.
- KLEINMAN, H. K. et al. (2005). « Matrigel : basement membrane matrix with biological activity ». *Seminars in Cancer Biology* 15.5, p. 378-386. DOI : 10.1016/j.semcancer.2005.05.004.
- KOKLU, A. (2019). « Investigation of the Electrode Polarization Effect for Biosensor Applications ». *Mechanical Engineering Research Theses and Dissertations*.
- KOSHELEVA, N. V. et al. (2020). « Cell spheroid fusion : beyond liquid drops model ». *Scientific Reports* 10.1, p. 12614. DOI : 10.1038/s41598-020-69540-8.
- KOTNIK, T., MIKLAVCIC, D. (2000). « Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields ». *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 47.8, p. 1074-1081. DOI : 10.1109/10.855935.
- KOTNIK, T., PUCIHAR, G. et al. (2003). « Role of pulse shape in cell membrane electropermeabilization ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1614.2, p. 193-200. DOI : 10.1016/S0005-2736(03)00173-1.
- KOTNIK, T. (2016). « Transmembrane Voltage Induced by Applied Electric Fields ». *Handbook of Electroporation*. Sous la dir. de D. MIKLAVCIC. Cham : Springer International Publishing, p. 1-17. DOI : 10.1007/978-3-319-26779-1_8-1.
- KOTNIK, T., MIR, L. M. et al. (2001). « Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses ». *Bioelectrochemistry* 54.1, p. 83-90. DOI : 10.1016/S1567-5394(01)00114-1.
- KOTNIK, T., REMS, L. et al. (2019). « Membrane Electroporation and Electropermeabilization : Mechanisms and Models ». *Annual Review of Biophysics* 48.1. Number : 1, p. 63-91. DOI : 10.1146/annurev-biophys-052118-115451.
- LANNIN, T. et al. (2016). « Automated electrorotation shows electrokinetic separation of pancreatic cancer cells is robust to acquired chemotherapy resistance, serum starvation, and EMT ». *Biomicrofluidics* 10.6, p. 064109. DOI : 10.1063/1.4964929.
- LAPERROUSAZ, B. et al. (2018). « Direct transfection of clonal organoids in Matrigel microbeads : a promising approach toward organoid-based genetic screens ». *Nucleic Acids Research* 46.12, e70-e70. DOI : 10.1093/nar/gky030.

- LARKIN, J. O. et al. (2007). « Electrochemotherapy ». *Annals of Surgery* 245.3, p. 469-479. DOI : 10.1097/01.sla.0000250419.36053.33.
- LAZZARI, G. et al. (2018). « Multicellular spheroid based on a triple co-culture : A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity ». *Acta Biomaterialia* 78, p. 296-307. DOI : 10.1016/j.actbio.2018.08.008.
- LEE, J.-H. et al. (2018). « Microfluidic co-culture of pancreatic tumor spheroids with stellate cells as a novel 3D model for investigation of stroma-mediated cell motility and drug resistance ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37.1, p. 4. DOI : 10.1186/s13046-017-0654-6.
- LEENHARDT, R. et al. (2019). « Ultrasound-induced Cavitation enhances the efficacy of Chemotherapy in a 3D Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with its microenvironment ». *Scientific Reports* 9.1, p. 18916. DOI : 10.1038/s41598-019-55388-0.
- LEI, K. F. et al. (2017). « Real-time and label-free impedimetric analysis of the formation and drug testing of tumor spheroids formed via the liquid overlay technique ». *RSC Advances* 7.23, p. 13939-13946. DOI : 10.1039/C7RA00209B.
- LIAO, W. et al. (2019). « High-throughput three-dimensional spheroid tumor model using a novel stamp-like tool ». *Journal of Tissue Engineering* 10, p. 204173141988918. DOI : 10.1177/2041731419889184.
- LIEW, A. et al. (2013). « Robust, Efficient, and Practical Electroporation Method for Human Mesenchymal Stem Cells Using Square Electric Pulses ». *Human Gene Therapy Methods* 24.5, p. 289-297. DOI : 10.1089/hgtb.2012.159.
- LU, H. et al. (2005). « A microfluidic electroporation device for cell lysis ». *Lab on a Chip* 5.1. Publisher : Royal Society of Chemistry, p. 23-29. DOI : 10.1039/B406205A.
- LUFT, C. et al. (2015). « Electroporation Knows No Boundaries : The Use of Electrostimulation for siRNA Delivery in Cells and Tissues ». *Journal of Biomolecular Screening* 20.8, p. 932-942. DOI : 10.1177/1087057115579638.
- LUONGO, K. et al. (2013). « Microfluidic device for trapping and monitoring three dimensional multicell spheroids using electrical impedance spectroscopy ». *Biomicrofluidics* 7.3. Publisher : American Institute of Physics, p. 034108. DOI : 10.1063/1.4809590.
- LYSSIOTIS, C. A. et al. (2017). « Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment ». *Trends in Cell Biology*. Special Issue : Cell Communication 27.11, p. 863-875. DOI : 10.1016/j.tcb.2017.06.003.
- MAHNIČ-KALAMIZA, S. et al. (2020). « Scratching the electrode surface : Insights into a high-voltage pulsed-field application from in vitro & in silico studies in indifferent fluid ». *Electrochimica Acta* 363, p. 137187. DOI : 10.1016/j.electacta.2020.137187.
- MARTY, M. et al. (2006). « Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases : Results of ESOPE (European Standard Opera-

- ting Procedures of Electrochemotherapy) study ». *European Journal of Cancer Supplements*. Electrochemotherapy 4.11, p. 3-13. DOI : 10.1016/j.ejcsup.2006.08.002.
- MCADAMS, E. et al. (1995). « The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface ». *Biosensors and Bioelectronics* 10.1-2, p. 67-74. DOI : 10.1016/0956-5663(95)96795-Z.
- MCMAHON, K. M. et al. (2012). « Characterization of Changes in the Proteome in Different Regions of 3D Multicell Tumor Spheroids ». *Journal of Proteome Research* 11.5, p. 2863-2875. DOI : 10.1021/pr2012472.
- MELLOR, H. R. et al. (2006). « Optimising non-viral gene delivery in a tumour spheroid model ». *The Journal of Gene Medicine* 8.9, p. 1160-1170. DOI : 10.1002/jgm.947.
- MENAD, S. et al. (2015). « nDEP-driven cell patterning and bottom-up construction of cell aggregates using a new bioelectronic chip ». *Acta Biomaterialia* 17, p. 107-114. DOI : 10.1016/j.actbio.2015.01.011.
- MERCANZINI, A. et al. (2009). « In Vivo Electrical Impedance Spectroscopy of Tissue Reaction to Microelectrode Arrays ». *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING* 56.7, p. 10.
- MICHEL, T. et al. (2018). « Mathematical modeling of the proliferation gradient in multicellular tumor spheroids ». *Journal of Theoretical Biology* 458, p. 133-147. DOI : 10.1016/j.jtbi.2018.08.031.
- MODI, U. et al. (2021). « Molecular insights of metastasis and cancer progression derived using 3D cancer spheroid co-culture in vitro platform ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 168, p. 103511. DOI : 10.1016/j.critrevonc.2021.103511.
- MOLCKOVSKY, A. et al. (2001). « Monitoring of cell and tissue responses to photodynamic therapy by electrical impedance spectroscopy ». *Physics in Medicine and Biology* 46.4, p. 983-1002. DOI : 10.1088/0031-9155/46/4/306.
- MONTEIRO, M. V. et al. (2021). « Stratified 3D Microtumors as Organotypic Testing Platforms for Screening Pancreatic Cancer Therapies ». *Small Methods* 5.5. [_eprint : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/smt.202001207](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/smt.202001207), p. 2001207. DOI : 10.1002/smt.202001207.
- MÜLLER, K. (2003). « Electrotransfection of anchorage-dependent mammalian cells ». *Experimental Cell Research* 288.2, p. 344-353. DOI : 10.1016/S0014-4827(03)00224-6.
- NEUMANN, E., SCHAEFER-RIDDER, M. et al. (1982). « Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. » *The EMBO Journal* 1.7, p. 841-845. DOI : 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x.
- NEUMANN, E., ROSENHECK, K. (1972). « Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes ». *The Journal of Membrane Biology* 10.1, p. 279-290. DOI : 10.1007/BF01867861.

- NGUYEN, N.-V. et al. (2018). « Impedance detection integrated with dielectrophoresis enrichment platform for lung circulating tumor cells in a microfluidic channel ». *Biosensors and Bioelectronics* 121, p. 10-18. DOI : 10.1016/j.bios.2018.08.059.
- NOWOSAD, K. et al. (2021). « The application of PEF technology in food processing and human nutrition ». *Journal of Food Science and Technology* 58.2, p. 397-411. DOI : 10.1007/s13197-020-04512-4.
- OLARIU, M. A. et al. (2022). « HT-29 Colon Cancer Cell Electromanipulation and Assessment Based on Their Electrical Properties ». *Micromachines* 13.11. Number : 11 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 1833. DOI : 10.3390/mi13111833.
- PADRÓN, L. J. et al. (2022). « Sotigalimab and/or nivolumab with chemotherapy in first-line metastatic pancreatic cancer : clinical and immunologic analyses from the randomized phase 2 PRINCE trial ». *Nature Medicine* 28.6. Number : 6 Publisher : Nature Publishing Group, p. 1167-1177. DOI : 10.1038/s41591-022-01829-9.
- PAGANIN-GIOANNI, A. et al. (2020). « Cyclin B1 knockdown mediated by clinically approved pulsed electric fields siRNA delivery induces tumor regression in murine melanoma ». *International Journal of Pharmaceutics* 573, p. 118732. DOI : 10.1016/j.ijpharm.2019.118732.
- PAMPALONI, F. et al. (2013). « High-resolution deep imaging of live cellular spheroids with light-sheet-based fluorescence microscopy ». *Cell and Tissue Research* 352.1, p. 161-177. DOI : 10.1007/s00441-013-1589-7.
- PAN, Y. et al. (2019). « 3D cell-based biosensor for cell viability and drug assessment by 3D electric cell/matrigel-substrate impedance sensing ». *Biosensors and Bioelectronics* 130, p. 344-351. DOI : 10.1016/j.bios.2018.09.046.
- PAPADATOS-PASTOS, D. et al. (2014). « FOLFIRINOX – a new paradigm in the treatment of pancreatic cancer ». *Expert Review of Anticancer Therapy* 14.10. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1586/14737140.2014.957188>, p. 1115-1125. DOI : 10.1586/14737140.2014.957188.
- PAPE, J. et al. (2021). « 3D Cancer Models : The Need for a Complex Stroma, Compartmentalization and Stiffness ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, p. 660502. DOI : 10.3389/fbioe.2021.660502.
- PASQUET, L. (2018). « Safe and efficient novel approach for non-invasive gene electrotransfer to skin ». *Scientific Reports*, p. 13.
- PATARO, G. et al. (2020). « Limitations of pulsed electric field utilization in food industry ». *Pulsed Electric Fields to Obtain Healthier and Sustainable Food for Tomorrow*. Elsevier, p. 283-310. DOI : 10.1016/B978-0-12-816402-0.00013-6.
- PAVLIN, M., PAVSELJ, N. et al. (2002). « Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system ». *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 49.6, p. 605-612. DOI : 10.1109/TBME.2002.1001975.

- PAVLIN, M., MIKLAVČIČ, D. (2008). « Theoretical and experimental analysis of conductivity, ion diffusion and molecular transport during cell electroporation — Relation between short-lived and long-lived pores ». *Bioelectrochemistry* 74.1, p. 38-46. DOI : 10.1016/j.bioelechem.2008.04.016.
- PELOFY, S. et al. (2021). « Transfer of small interfering RNA by electropermeabilization in tumor spheroids ». *Bioelectrochemistry* 141, p. 107848. DOI : 10.1016/j.bioelechem.2021.107848.
- PHAM, T. N. D. et al. (2021). « Preclinical Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Utility in Immunotherapy Studies ». *Cancers* 13.3. Number : 3 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 440. DOI : 10.3390/cancers13030440.
- PILLET, F. et al. (2017). « Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model ». *Biofabrication* 9.2, p. 025017. DOI : 10.1088/1758-5090/aa6ed5.
- PINTO, B. et al. (2020). « Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research ». *Pharmaceutics* 12.12, p. 1186. DOI : 10.3390/pharmaceutics12121186.
- PIRC, E. et al. (2020). « Early Cost-effectiveness Analysis of Electrochemotherapy as a Prospect Treatment Modality for Skin Melanoma ». *Clinical Therapeutics* 42.8, 1535-1548.e2. DOI : 10.1016/j.clinthera.2020.06.013.
- PLUEN, A. et al. (1999). « Diffusion of Macromolecules in Agarose Gels : Comparison of Linear and Globular Configurations ». *Biophysical Journal* 77.1. Number : 1, p. 542-552. DOI : 10.1016/S0006-3495(99)76911-0.
- POURCHET, L. et al. (2019). « Large 3D bioprinted tissue : Heterogeneous perfusion and vascularization ». *Bioprinting* 13, e00039. DOI : 10.1016/j.bprint.2018.e00039.
- POWERS, M. J. et al. (2002). « A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture ». *Biotechnology and Bioengineering* 78.3, p. 257-269. DOI : 10.1002/bit.10143.
- PRON, G. et al. (1999). « Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity : a receptor-mediated endocytosis mechanism ». *Biochemical Pharmacology* 57.1, p. 45-56. DOI : 10.1016/S0006-2952(98)00282-2.
- PRUNET, A. et al. (2020). « A new agarose-based microsystem to investigate cell response to prolonged confinement ». *Lab on a Chip* 20.21, p. 4016-4030. DOI : 10.1039/D0LC00732C.
- PRUNET, A. (2020). « Développement de système pour l'étude de l'impact des contraintes mécaniques sur le comportement de cellules cancéreuses ». Biophysique. Université de Lyon.
- RABBITT, R. D. et al. (1999). « Electric Impedance Spectroscopy Using Microchannels with Integrated Metal Electrodes ». *IEEE JOURNAL OF MICROELECTROMECHANICAL SYSTEMS* 8.1, p. 50-57.

- REBERŠEK, M. (2017). « Beyond Electroporation Pulse Parameters : From Application to Evaluation ». *Handbook of Electroporation*. Sous la dir. de D. MIKLAVČIČ. Cham : Springer International Publishing, p. 1-21. DOI : 10.1007/978-3-319-26779-1_222-1.
- REDDY, V. Y. et al. (2018). « Ablation of Atrial Fibrillation With Pulsed Electric Fields ». *JACC : Clinical Electrophysiology* 4.8. Publisher : American College of Cardiology Foundation, p. 987-995. DOI : 10.1016/j.jacep.2018.04.005.
- RICE, J. J. et al. (2013). « Engineering the regenerative microenvironment with biomaterials ». *Advanced Healthcare Materials* 2.1, p. 57-71. DOI : 10.1002/adhm.201200197.
- RIVIÈRE, C. et al. (2018). « Plaque de micropuits en hydrogel biocompatible. » Patent FR3079524A1.
- RIZZUTI, I. F. et al. (2020). « Mechanical Control of Cell Proliferation Increases Resistance to Chemotherapeutic Agents ». *Physical Review Letters* 125.12. Publisher : American Physical Society, p. 128103. DOI : 10.1103/PhysRevLett.125.128103.
- ROLS, M. P. et al. (1990). « Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure ». *Biochemistry* 29.19, p. 4561-4567. DOI : 10.1021/bi00471a009.
- ROLS, M.-P. et al. (1998). « Electroporation of Mammalian Cells to Macromolecules : Control by Pulse Duration ». *Biophysical Journal* 75.3, p. 1415-1423. DOI : 10.1016/S0006-3495(98)74060-3.
- ROSAZZA, C. et al. (2016). « Gene Electrotransfer : A Mechanistic Perspective ». *Current Gene Therapy* 16.2, p. 98-129. DOI : 10.2174/1566523216666160331130040.
- ROSSER, J. et al. (2015). « Recent Advances of Biologically Inspired 3D Microfluidic Hydrogel Cell Culture Systems ». 2.1. Number : 1, p. 15. DOI : DOI:10.24966/CBCM-1943/100005.
- ROZARIO, T. et al. (2010). « The extracellular matrix in development and morphogenesis : a dynamic view ». *Developmental Biology* 341.1, p. 126-140. DOI : 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.
- RUBINSKY, B. et al. (2007). « Irreversible Electroporation : A New Ablation Modality — Clinical Implications ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 6.1, p. 37-48. DOI : 10.1177/153303460700600106.
- RUDNO-RUDZIŃSKA, J. (2021). « New therapeutic strategy : Personalization of pancreatic cancer treatment-irreversible electroporation (IRE), electrochemotherapy (ECT) and calcium electroporation (CaEP) – A pilot preclinical study ». *Surgical Oncology*, p. 8.
- RYU, N.-E. et al. (2019). « Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells ». *Cells* 8.12, p. 1620. DOI : 10.3390/cells8121620.
- SABRI, E. (2022). « Multiphysics numerical modeling of electrodeformation and electroporation of biological cells ». Thèse de doct. Université de Bretagne occidentale - Brest.

- EL-SADEK, I. A. et al. (2021). « Three-dimensional dynamics optical coherence tomography for tumor spheroid evaluation ». *Biomedical Optics Express* 12.11, p. 6844. DOI : 10.1364/BOE.440444.
- SANTRA, T. S. et al. (2016). « Dielectric passivation layer as a substratum on localized single-cell electroporation ». *RSC Advances* 6.13, p. 10979-10986. DOI : 10.1039/C5RA18258A.
- SARVEPALLI, D. et al. (2019). « Gemcitabine : A Review of Chemo-resistance in Pancreatic Cancer ».
- SCHMID, Y. R. F. et al. (2016). « Electrical Impedance Spectroscopy for Microtissue Spheroid Analysis in Hanging-Drop Networks ». *ACS sensors* 1.8, p. 1028-1035. DOI : 10.1021/acssensors.6b00272.
- SCHWAN, H. P. (1957). « Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions ». *Advances in Biological and Medical Physics*. T. 5. Elsevier, p. 147-209. DOI : 10.1016/B978-1-4832-3111-2.50008-0.
- SCHWARZ, R. P. et al. (1992). « Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels : an application of simulated microgravity ». *Journal of Tissue Culture Methods : Tissue Culture Association Manual of Cell, Tissue, and Organ Culture Procedures* 14.2, p. 51-57. DOI : 10.1007/BF01404744.
- SERSĀ, G. (1998). « Electrochemotherapy with Cisplatin : Potentiation of Local Cisplatin Antitumour Effectiveness by Application of Electric Pulses in Cancer Patients ». *European Journal of Cancer* 34.8, p. 1213-1218.
- SHERBA, J. J. et al. (2020). « The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency ». *Scientific Reports* 10.1, p. 3053. DOI : 10.1038/s41598-020-59790-x.
- SHOWKAT, I. et al. (2023). « A review of bio-impedance devices ». *Medical & Biological Engineering & Computing*. DOI : 10.1007/s11517-022-02763-1.
- SIENI, E. et al. (2020). « Breast cancer cells grown on hyaluronic acid-based scaffolds as 3D in vitro model for electroporation ». *Bioelectrochemistry* 136, p. 107626. DOI : 10.1016/j.bioelechem.2020.107626.
- SIHVOLA, A. et al. (1988). « Effective permittivity of dielectric mixtures ». *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 26.4. Conference Name : IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing, p. 420-429. DOI : 10.1109/36.3045.
- SILVE, A. et al. (2014). « Comparison of the effects of the repetition rate between microsecond and nanosecond pulses : Electroporation-induced electro-desensitization ? » *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840.7, p. 2139-2151. DOI : 10.1016/j.bbagen.2014.02.011.
- SINGH, M. et al. (2016). « Three-Dimensional Breast Cancer Models Mimic Hallmarks of Size-Induced Tumor Progression ». *Cancer Research* 76.13, p. 3732-3743. DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-15-2304.

- SKLOOT, R. (2010). « The Immortal Life of Henrietta Lacks ».
- SOUSA CAVALCANTE, L. de et al. (2014). « Gemcitabine : Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer ». *European Journal of Pharmacology* 741, p. 8-16. DOI : 10.1016/j.ejphar.2014.07.041.
- SOUZA, G. R. et al. (2010). « Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation ». *Nature Nanotechnology* 5.4. Number : 4 Publisher : Nature Publishing Group, p. 291-296. DOI : 10.1038/nnano.2010.23.
- STÄMPFLI, R. (1954). « A new method for measuring membrane potentials with external electrodes ». *Experientia* 10.12, p. 508-509. DOI : 10.1007/BF02166189.
- SUNDARARAJAN, R. et al. (2016). « Gemcitabine + Cisplatin Combination Electrochemotherapy for Triple Negative Breast Cancers : An in vitro Model Study ». *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies*. Sous la dir. de T. JARM et al. T. 53. Series Title : IFMBE Proceedings. Singapore : Springer Singapore, p. 280-284. DOI : 10.1007/978-981-287-817-5_62.
- TAMRA, A. (2017). « Spectroscopie diélectrique HyperFréquence de cellules individualisées sous électroporation ». Thèse de doct. Université de Toulouse.
- TANAKA, H. et al. (2002). « Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells ». *Cellular Immunology* 220.1, p. 1-12. DOI : 10.1016/S0008-8749(03)00009-1.
- TANG, Y. et al. (2016). « Agarose multi-wells for tumour spheroid formation and anti-cancer drug test ». *Microelectronic Engineering*, p. 5.
- TEISSIE, J., GOLZIO, M. et al. (2005). « Mechanisms of cell membrane electropermeabilization : A minireview of our present (lack of?) knowledge ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1724.3, p. 270-280. DOI : 10.1016/j.bbagen.2005.05.006.
- TEISSIE, J., ROLS, M. P. (1988). « Electropermeabilization and Electrofusion of Cells ». *Dynamics of Membrane Proteins and Cellular Energetics*. Sous la dir. de N. LATRUFFE et al. Berlin, Heidelberg : Springer, p. 251-268. DOI : 10.1007/978-3-642-73905-7_17.
- TEISSIÉ, J. et al. (1993). « An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization ». *Biophysical Journal* 65.1, p. 409-413. DOI : 10.1016/S0006-3495(93)81052-X.
- THANH-TUAN, N. (2015). « Contribution à la mesure de bioimpédance électrique de cellules biologiques par micro-capteurs interdigités : Optimisation, Conception et Validation de capteurs ». Systèmes électroniques. Université de Lorraine.
- THANH-TUAN, N. et al. (2014). « A Planar Interdigital Sensor for Bio-impedance Measurement : Theoretical analysis, Optimization and Simulation ». Accepted : 2014-06-24T11 :13 :37Z Publisher : Sumy State University.

- TIXIER-MITA, A. et al. (2014). « Detection of micro-beads by impedance spectroscopy : Towards a wholly integrated electronic device for biological cells applications ». *2014 Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEMS (DTIP)*. Cannes, France : IEEE, p. 1-6. DOI : 10.1109/DTIP.2014.7056696.
- TORISAWA, Y.-s. et al. (2007). « Efficient formation of uniform-sized embryoid bodies using a compartmentalized microchannel device ». *Lab on a Chip* 7.6, p. 770. DOI : 10.1039/b618439a.
- TUNG, Y.-C. et al. (2011). « High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array ». *The Analyst* 136.3, p. 473-478. DOI : 10.1039/C0AN00609B.
- URSIC, K. et al. (2021). « Potentiation of electrochemotherapy effectiveness by immunostimulation with IL-12 gene electrotransfer in mice is dependent on tumor immune status ». *Journal of Controlled Release* 332, p. 623-635. DOI : 10.1016/j.jconrel.2021.03.009.
- VALIC, B. et al. (2003). « Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells : theory and experiment ». *European Biophysics Journal* 32.6, p. 519-528. DOI : 10.1007/s00249-003-0296-9.
- VERMA, I. M. et al. (2005). « GENE THERAPY : Twenty-First Century Medicine ». *Annual Review of Biochemistry* 74.1, p. 711-738. DOI : 10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637.
- WANG, J. et al. (2010). « Vortex-assisted DNA delivery ». *Lab on a Chip* 10.16. Publisher : Royal Society of Chemistry, p. 2057-2061. DOI : 10.1039/C004472E.
- WASUNGU, L. et al. (2009). « A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation ». *International Journal of Pharmaceutics* 379.2, p. 278-284. DOI : 10.1016/j.ijpharm.2009.03.035.
- WEAVER, J. C. et al. (2012). « A brief overview of electroporation pulse strength-duration space : A region where additional intracellular effects are expected ». *Bioelectrochemistry* 87, p. 236-243. DOI : 10.1016/j.bioelechem.2012.02.007.
- WU, H. et al. (2018). « Electrical impedance tomography for real-time and label-free cellular viability assays of 3D tumour spheroids ». *The Analyst* 143.17, p. 4189-4198. DOI : 10.1039/C8AN00729B.
- WU, L. et al. (2012). « Dielectrophoretic capture voltage spectrum for measurement of dielectric properties and separation of cancer cells ». *Biomicrofluidics* 6.1, p. 014113. DOI : 10.1063/1.3690470.
- XIE, B. et al. (2020). « Pseudopterosin and O-Methyltylophorinidine Suppress Cell Growth in a 3D Spheroid Co-Culture Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Bioengineering* 7.2, p. 57. DOI : 10.3390/bioengineering7020057.
- XU, Y. et al. (2011). « The construction of an individually addressable cell array for selective patterning and electroporation ». *Lab on a Chip* 11.14, p. 2417. DOI : 10.1039/c11c20183b.

- YAKAVETS, I. et al. (2020). « Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli : optimization study ». *Scientific Reports* 10.1. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 21273. DOI : 10.1038/s41598-020-78087-7.
- YAMAUCHI, F. et al. (2004). « Spatially and temporally controlled gene transfer by electroporation into adherent cells on plasmid DNA-loaded electrodes ». *Nucleic Acids Research* 32.22, e187. DOI : 10.1093/nar/gnh176.
- ZARRINTAJ, P. et al. (2018). « Agarose-based biomaterials for tissue engineering ». *Carbohydrate Polymers* 187, p. 66-84. DOI : 10.1016/j.carbpol.2018.01.060.
- ZHANG, W. et al. (2016). « Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells : How to reliably produce a biomimetic 3D model ». *Analytical Biochemistry* 515, p. 47-54. DOI : 10.1016/j.ab.2016.10.004.
- ZHANG, Z. et al. (2020). « Single-cell individualized electroporation with real-time impedance monitoring using a microelectrode array chip ». *Microsystems & Nanoengineering* 6.1. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 1-10. DOI : 10.1038/s41378-020-00196-0.
- ZHOU, Z. et al. (2023). « A T Cell-Engaging Tumor Organoid Platform for Pancreatic Cancer Immunotherapy ». *Advanced Science* n/a, p. 2300548. DOI : 10.1002/advs.202300548.
- ZHU, Q. et al. (2019). « 3D-printing enabled micro-assembly of a microfluidic electroporation system for 3D tissue engineering ». *Lab on a Chip* 19.14, p. 2362-2372. DOI : 10.1039/C9LC00046A.
- ZITZMANN, F. D. et al. (2022). « Multielectrode biosensor chip for spatial resolution screening of 3D cell models based on microcavity arrays ». *Biosensors and Bioelectronics* 202, p. 114010. DOI : 10.1016/j.bios.2022.114010.

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 25 mai 2016 modifié par l'arrêté du 26 août 2022,

Vu la demande du directeur de thèse

Monsieur C. VOLLAIRE

et les rapports de

Mme M-P. ROLS
Directrice de Recherche - Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale
205, route de Narbonne BP 64182 - 31077 TOULOUSE Cedex 4

et de

M. V. SENEZ
Directeur de Recherche - Bâtiment ONCOLILLE-CHR, boulevard du Professeur Jules Leclerc
59045 LILLE Cedex

Madame BREGIGEON Pauline

est autorisée à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE

Fait à Ecully, le 10 octobre 2023

Pour le directeur de l'École Centrale de Lyon
Le directeur de la recherche



Christophe CORRE