

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences et Technologies de l'Information des  
Télécommunications et des Systèmes (ED 422)

*DISCIPLINE PHYSIQUE*

**THÈSE DE DOCTORAT**

Soutenu le *29 novembre 2013* par :

**Feriel Siham HAMD**

Interaction champ électrique cellule :

Conception de puces microfluidiques pour  
l'appariement cellulaire et la fusion par champ  
électrique pulsé

**Directeur de thèse :**

Elisabeth DUFOUR-GERGAM

Professeur (Univ. Paris-Sud/IEF UMR 8622)

**Co-directeur de thèse :**

Bruno LE PIOUFLE

Professeur (ENS Cachan/SATIE UMR 8029)

**Composition du jury :**

*Président du jury:*

Lluis M. MIR

Directeur de Recherche 1 (CNRS/UMR 8203)

*Rapporteurs :*

Gaëlle LISSORGUES  
Liviu NICU (HDR)

Professeur (ESSIEE/EA 2552)  
Chargé de Recherche 1 (LAAS/UMR 8001)

*Examineur :*

Marie FRENEA-ROBIN

Maître de Conférences (Univ. Lyon/UMR 5005)

*Membres invités :*

Olivier FRANÇAIS  
Frédéric SUBRA

Maître de Conférences (ENS Cachan/SATIE)  
Ingénieur de Recherche (ENS Cachan/LBPA UMR 8113)



*A la mémoire de mon père, **Ali Hamdi** (1947-1997),  
A ma mère **Yasmina**, la femme la plus forte que je connaisse.*

*« Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin »*

*Erwin Chargaff (1905-2002)*

Dans la vie aussi le chemin est plus intéressant que la fin...

## *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Gaëlle Lissorgues et le docteur Liviu Nicu d'avoir accepté et pris de leur précieux temps pour examiner ces travaux de thèse. Je remercie également les docteurs Lluís M. Mir et Marie Frénéa-Robin pour m'avoir fait l'honneur de leur présence au sein du jury.

Un grand merci à mes directeurs de thèse Elisabeth Dufour-Gergam et Bruno Le Pioufle pour m'avoir accueillie dans leurs équipes respectives. Merci de m'avoir toujours poussée pour aller plus loin et pour votre expertise précieuse dans vos domaines respectifs qui ont donné à ces travaux une vraie dimension pluridisciplinaire.

Je remercie sincèrement Olivier Français. Plus qu'un encadrant, tu m'as toujours encouragée, répondu à mes nombreuses questions et t'es beaucoup investi dans ma thèse. Les réunions café où les idées fusaient et les déjeuners d'équipe au restau Japonais resteront mémorables. J'ai beaucoup appris à ton contact, et dans la bonne humeur en plus !

Je remercie Frédéric Subra pour m'avoir appris à m'occuper de mes petites cellules et pour avoir supporté mon harcèlement quand elles n'allaient pas bien...

Trois ans c'est long et court à la fois. J'ai rencontré beaucoup de monde durant cette période. J'aimerais remercier ici toutes ces personnes mais j'ai peur d'en oublier...

Commençons par mes voisins de bureau et de labo à Cachan. Merci à Jacques Delaire et Claude Noges pour leurs conseils avisés sur la silanisation, à Valérie Génot pour sa bonne humeur et les déjeuners crêpes, à Jean-Pierre Lefevre pour le partage de ses connaissances en microfluidique et les longues discussions philosophiques ! Je remercie Claire Dalmay pour plein de choses (ses connaissances sur les dépôts d'or, les manip ensemble toujours avec plein d'énergie, les déjeuners jap, les crêpes...). Merci à Wei Wang pour sa rigueur dans le travail, j'ai pris de bonnes habitudes ! Je remercie également Patrice Vallade pour les supports magnifiques et sa gentillesse ! Un grand merci au toujours calme Arnaud Brosseau pour le temps qu'il a pris pour m'aider du côté AFM et FT-IR.

Merci à Joseph Lautru pour ses conseils en salle blanche. Merci aux thésards qui ont déjà fini : ma petite Thanh nos pauses café « relâchement de pression » me manquent, le très très patient Julien, Yuanyuan, Haitao dite Cylia, Camille, Sergei. Bon courage à ceux qui en ont encore pour quelque temps : Claudia forca Italia ! Rahima, le petit Pierre... Je remercie aussi tous ceux du LBPA qui m'ont secourue quand je paniquais en salle de culture : Silvain, Huan,

Marie-Hélène et bien d'autres. Les voisins de couloir du SATIE aussi : Eric Vourch, Jean-Pierre Barbot, Pierre-Yves Joubert (désolée d'avoir squatté tes différents bureaux partout où j'allais...). Je remercie chaleureusement les fées administratives Sophie Abriet et Béatrice Baquet, ainsi que les princes de l'ordi Gwenaël Robin et Dominique Bach. Je remercie Pascal Larzabal, directeur du SATIE, de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie également le docteur Lluís M. Mir de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à l'Institut Gustave Roussy pour certaines expériences.

Du côté de l'IEF, j'aimerais remercier les membres du département anciennement MiNaSys pour leur disponibilité, leur aide et leur gentillesse. Je remercie notamment Marion Woytasik pour son encadrement sur la caractérisation du packaging (on a pu aller un peu plus loin que « collé/pas collé » !) Merci également à Mehdi Ammar pour son expertise sur le FT-IR et l'AFM à l'IEF. Je remercie Emile Martincic pour sa gentillesse et ses bons conseils ainsi qu'Alain Bosseboeuf de m'avoir accueillie dans son département et de m'avoir offert la chance d'aller au Japon pour l'école NAMIS. Je remercie également Noriko Fujioka pour son aide durant cette expérience très enrichissante.

Par ailleurs j'aimerais tout particulièrement remercier le personnel de la CTU pour leur assistance technique indispensable durant ma thèse ainsi qu'à tout utilisateur de la salle blanche. Je remercie également Claude Chappert et André de Lustrac, directeurs successifs de l'Institut d'Electronique Fondamentale (IEF), de m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire.

Je pense ensuite avec un grand sourire aux thésards rencontrés à l'IEF, j'aurais aimé vous voir un peu plus souvent. A ceux qui ont déjà soutenu leur thèse : Magdalèna je te remercie pour tout plein de choses. Les manips de pull test et ton secours en chimie d'abord, ensuite les longues séances de plainte de petite thésarde, et enfin ton soutien ! Merci ma tite Magda ! Malo, quand est-ce que tu ouvres ta boîte et tu deviens riche ? Mériam, je te souhaite tout plein de bonnes choses, tu le mérites ! Pierre A. et Iman, vous êtes partis bien loin ! Guillaume, j'espère te revoir par hasard plus souvent ! Le labo me semble vide sans vous... Mais il ne l'est jamais en fait parce qu'il y en a encore qui restent. Je pense aux thésards qui suivent : merci Nhung et Ha pour votre aide sur le packaging réversible. Je vous souhaite bonne chance pour la suite ! Et à ceux qui sont de passage : Pauline, Nhat.

En parallèle de ces 3 années de thèse, j'ai eu la chance de pouvoir suivre le Diplôme Universitaire de Formation Supérieure en BioMédical à l'IFSBM sous la direction du

professeur Claude Malvy que je remercie, ainsi que Liliane Massade pour cette opportunité de découvrir le monde de la cancérologie. J'ai appris beaucoup durant ces cours, et surtout que je ne sais pas grand-chose ! Je pense ensuite tout naturellement aux jolies rencontres durant cette formation : Aurore, Lisou, c'est fini ou presque pour vous aussi !!

Ensuite je pense à la « mission » que j'ai eue durant ma thèse, le monitorat avec mes petits élèves de l'IUT de Cachan. Je remercie Francisco De Riviera Alves de m'avoir accueillie au sein de son département. Je pense alors à la grande chance que j'ai eue de tomber sur une équipe de travail aussi joyeuse et passionnée. Un grand merci à Stéphane Poujouly, tu incarnes totalement la passion du travail. Tu aimes tellement ce que tu fais, tu t'occupes tellement bien de ta plateforme, des TP, de tes élèves que tu as complètement bouleversé mon point de vue sur la vie que j'aimerais mener. Je te remercie aussi pour ta gentillesse et ta bonne humeur à toute épreuve ! Merci également à Nicolas Liébeaux et Marie Faret, le bureau vivait littéralement grâce à vous trois.

Durant ma thèse j'ai pu rencontrer tellement de personnes adorables dans les différents cercles que j'ai pu fréquenter. Dylan, Carine, Cat, Yotsuba et le club de culture Japonaise, vous me manquez déjà. Je pense ensuite à ceux qui n'ont rien à voir avec les milieux de ma thèse mais sans qui j'aurais peut-être sombré...Merci ma Baya, Imène, Mamut, Chou, Hervé, Claire, Sandrine et toute la Nems, ça fait du bien de penser à autre chose quand même...Paulette, Marie-Claire, quand je vous vois je pense fort à mon père qui vous a mises sur ma route alors qu'il est bien loin.

Enfin je pense à ceux qui vous soutiennent et vous supportent tous les jours, vous répètent « tu peux y arriver » ou « arrêtes de stresser ». Merci Eric pour ta patience même quand je radote, ton calme Olympien me rappelle que rien ne sert de se rendre malade. J'espère te garder près de moi le plus longtemps possible ! Merci à mes perles, mes sœurs, Amel je ne sais pas faire autant de choses que tu le penses, mais ça me réchauffe le cœur que tu le dises avec conviction. Dounia, ma « jumelle » qui est arrivée au bout d'un an, ça sert une sœur en bio ! C'est une folie familiale la thèse...bon courage avec tes petites filles. Nesrine tu grandis trop vite, ralentis ! And the last but not the least, je remercie mes parents si fort que je ne sais comment l'exprimer. Merci ma petite maman, « courage, toujours de l'avant », j'applique autant que je peux pour que tu sois fière de moi ! J'espère aussi que papa aurait été fier. La culture c'est comme la confiture, j'espère que j'en ai un peu plus à étaler...

# Table des matières

<b>Avant-propos</b>	<b>1</b>
<b>I. Contexte et état de l'art</b>	<b>3</b>
I.1. Fusion cellulaire et électroperméabilisation : mécanisme, applications.....	4
I.1.1 : Fusion cellulaire.....	4
a. Pourquoi ?.....	4
b. Comment ?.....	5
I.1.2 : Le champ électrique et le vivant :.....	6
a. Membrane cellulaire et électroperméabilisation : pore ou pas pore ?.....	7
b. Applications de l'électroperméabilisation.....	8
c. Electrofusion cellulaire : paramètres, mécanisme.....	11
I.2. Lab On Chip : de la bio pour la bio !.....	14
I.2.1. La microfluidique et les applications biomédicales.....	15
I.2.2. Systèmes microfluidiques (Lab On Chip) pour l'électrofusion.....	18
a. Piégeage par voie biochimique.....	21
b. Piégeage par voie microfluidique.....	21
c. Piégeage par voie électrique.....	22
I.3. Conclusion.....	25
<b>II. Théorie et conception</b>	<b>27</b>
II.1. Les forces mises en jeu.....	28
II.1.1 Diélectrophorèse (DEP) et facteur de Clausius-Mossotti.....	28
a. Modèle électrique d'une cellule.....	28
b. DEP conventionnelle et DEP à ondes progressives.....	29
II.1.2. Evaluation des forces mises en jeu.....	35
a. Définition des forces mises en jeu.....	36
b. Bilan des forces avec approximations.....	37
c. Calcul par éléments finis : sans approximations.....	45
II.2. Piégeage et appariement de cellules : optimisation des géométries.....	48
II.2.1. Etude de la fusion : géométrie à plots isolants.....	48
II.2.2. Parallélisation : méthode fluidique.....	49



II.2.3. Parallélisation : méthode électrique (électrodes non connectées).....	52
a. Présentation de la stratégie de capture.....	53
b. Structure d'appariement.....	54
c. Matriçage.....	55
II.3. Potentiel transmembranaire : prise en compte de l'environnement cellulaire.....	57
II.3.1. Théorie : calcul et simulation du potentiel transmembranaire.....	58
a. Calcul analytique du potentiel transmembranaire.....	58
b. Calcul numérique (en éléments finis) du potentiel transmembranaire.....	59
II.3.2. Evolution du potentiel transmembranaire pour deux cellules très proches.....	60
II.3.3. Evolution du potentiel transmembranaire dans la structure à plots isolants....	62
II.3.4. Potentiel transmembranaire dans la structure de parallélisation à plots conducteurs.....	65
II.4. Conclusion.....	66
<b>III. Microfabrication</b>	<b>68</b>
III.1. Fabrication de la biopuce.....	69
III.1.1. Résumé du protocole de fabrication.....	69
III.1.2. Cas des électrodes fines.....	72
III.1.3. Cas des électrodes épaisses : dépôt électrolytique d'or.....	73
a. Dépôt d'or.....	74
b. Gravure d'électrodes épaisses.....	77
III.1.4. Microfabrication des canaux fluidiques.....	80
III.2. Packaging.....	84
III.2.1. Packaging irréversible PDMS/SU8.....	84
a. Les différentes techniques de packaging SU8.....	84
b. Protocole développé.....	92
c. Caractérisation de la silanisation.....	95
- Etude par spectroscopie FT-IR.....	95
- Etude par microscopie AFM.....	97
- Etude de mouillabilité et de stabilité dans le temps du greffage.....	99
d. Caractérisation du collage.....	103
- Mesure de flux limite.....	103
- Mesure en traction ( <i>pull-test</i> ).....	104

e. Application au packaging de dispositifs fonctionnels et au scellement d'autres matériaux.....	107
III.2.2. Procédés de packaging réversible en cours de développement.....	109
a. Collage PDMS/PDMS.....	109
b. Collage PDMS/DMPMS.....	113
III.3. Conclusion.....	116
<b>IV. Résultats des expérimentations biologiques</b>	<b>118</b>
IV.1. Milieux de fusion.....	119
IV.1.1. Conductivité et électroperméabilisation.....	119
IV.1.2. Effet de l'osmolarité.....	120
a. Variation du volume cellulaire due au choc osmotique.....	122
b. Effet du choc osmotique sur la DEP.....	124
c. Détermination des caractéristiques cellulaires par électrorotation ..	127
d. Osmolarité et viabilité cellulaire.....	130
IV.1.3. Déformation mécanique d'une cellule pendant l'application d'un champ électrique ou « électrodéformation ».....	131
a. Déformation due à l'application de la diélectrophorèse.....	131
b. Electrodéformation durant l'application d'une impulsion.....	133
IV.1.4. La cellule après impulsion.....	135
IV.2. Etude de l'électrofusion dans une structure à plots isolants.....	139
IV.2.1. Procédure expérimentale et fusion dans la structure à plots isolants..	139
IV.2.2. Effet de la concentration du champ électrique sur la fusion.....	141
a. Rendement de fusion.....	141
b. Dynamique de fusion.....	145
IV.3. Structures pour la parallélisation de l'électrofusion sur puce.....	147
IV.3.1. Piégeage de cellules : comparaison des deux structures développées...	147
a. Piégeage fluïdique.....	147
b. Piégeage électrique (DEP).....	148
IV.3.2. Electrofusions en parallèle (B16F10, Jurkat).....	151
IV.4. Conclusion.....	154

<b>V. Conclusions et perspectives</b>	<b>156</b>
<b>Annexe 1 : Rappels sur le système immunitaire</b>	<b>161</b>
<b>Annexe 2 : Immunothérapie du cancer</b>	<b>165</b>
<b>Annexe 3 : Rappels de calcul thermique</b>	<b>171</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>175</b>
<b>Liste de publications</b>	<b>192</b>



## *Avant-propos :*

L'effet du champ électrique sur le vivant fascine depuis l'antiquité. Avant même de comprendre les phénomènes liés à l'électricité, l'Homme a commencé à l'utiliser comme traitement de certaines maladies comme la migraine. Un peu plus tard vers le 18<sup>ème</sup> siècle, elle fit même ses premiers pas dans l'agroalimentaire grâce à Benjamin Franklin qui trouvait que les poulets sacrifiés à l'aide d'un champ électrique présentaient une viande plus tendre. A travers l'Histoire, de nombreuses avancées, en particulier dans le domaine de la biologie cellulaire, ont permis d'envisager des applications plus larges du champ électrique sur le vivant. De nos jours, les chocs électriques sont entre autres utilisés en laboratoire de biologie, dans l'agroalimentaire et en médecine, en particulier en thérapie du cancer. Une des applications les plus prometteuses de l'utilisation d'impulsions électriques sur des cellules est la fusion.

Le premier chapitre de ce manuscrit de thèse présente tout d'abord quelques applications de l'utilisation du champ électrique, et plus particulièrement celles liées à la fusion cellulaire. L'application de l'électrofusion cellulaire pour l'immunothérapie du cancer est décrite plus précisément en annexe. La seconde partie de ce chapitre se focalise sur le potentiel apporté par les microtechnologies pour améliorer l'efficacité de cette électrofusion. Un bref état de l'art dans le domaine des biopuces pour l'électrofusion est proposé.

Le second chapitre est centré sur la modélisation et la simulation des microsystèmes pour l'électrofusion, que nous envisageons de réaliser. Les différentes forces (électriques, thermiques, gravité, etc) intervenant dans la chambre de fusion sont rappelées. Une analyse de la dépendance entre le potentiel transembranaire (différence de potentiel de part et d'autre de la membrane) et l'environnement de la cellule (autres cellules, géométrie de la structure) est effectuée.

Le troisième chapitre se concentre sur les étapes de microfabrication de la biopuce. Une méthode de scellement du microdispositif permettant d'obtenir une biopuce étanche est notamment présentée et caractérisée. D'autre part, deux stratégies de scellement réversible ont été développées et partiellement caractérisées.

Le quatrième chapitre quant à lui présente les résultats des expérimentations sur cellules biologiques. L'optimisation du milieu de fusion et l'effet de l'osmolarité sont d'abord présentés. Enfin, les structures sont validées par l'électrofusion de cellules. La dynamique et le rendement de fusion sont analysés.



# **Chapitre Premier**

## **Contexte et Etat de l'art**

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de l'étude de microsystèmes pour des applications biomédicales, et plus particulièrement pour l'électrofusion cellulaire. Dans ce chapitre nous rappelons tout d'abord le principe de la fusion cellulaire et les mécanismes d'électroperméabilisation/électrofusion. Une application importante de l'électrofusion concernant l'immunothérapie du cancer est introduite. Dans la seconde partie, nous introduisons le concept de laboratoire sur puce, et en particulier dans le domaine des applications biomédicales, avant d'exposer les différentes structures de puces microfluidiques appliquées à la fusion cellulaire.

## **I.1. Fusion cellulaire et électroperméabilisation : mécanismes, applications**

La fusion de deux cellules produit un hybride intégrant les fonctions des deux cellules mères. Dans cette première partie nous allons voir les principales applications de la fusion cellulaire et les différentes techniques de génération d'hybridomes.

### **I.1.1. Fusion cellulaire :**

#### **a. Pourquoi ?**

Le phénomène de fusion cellulaire, souvent présent dans la nature, représente un potentiel énorme dans les domaines de la biologie et de la médecine. La première exploitation du phénomène de fusion a été effectuée par Kohler et Milstein en 1975. Ils eurent l'idée de combiner d'une part les propriétés de reproduction des cellules de myélome (tumoraux), et d'autre part la faculté de génération d'anticorps par les lymphocytes B. Ainsi, en fusionnant ces deux types cellulaires, ils parvinrent à développer une méthode de production permanente d'anticorps monoclonaux (Kohler et Milstein 1975). En 1984, le prix Nobel de médecine fut attribué à Jerne, Kohler et Milstein pour ces travaux révolutionnaires en immunologie (rappel sur le système immunitaire en annexe 1). Plusieurs vaccins à base d'anticorps monoclonaux sont déjà sur le marché et plusieurs centaines d'autres sont à ce jour en phase de tests cliniques.

Au fil du temps, plusieurs autres applications de la fusion cellulaire dans le domaine de la médecine ont vu le jour. L'une d'elles se place aussi en immunothérapie, et plus particulièrement pour les patients cancéreux (Marten et *al.* 2003, Trefzer et *al.* 2005). Ce type de traitement consiste à injecter le produit entier de fusion d'une cellule dendritique et d'une cellule cancéreuse (en somme l'hybridome lui-même) afin de déclencher le système immunitaire du patient. Ce traitement étonnant est présenté plus en détail dans l'annexe 2.

Enfin, l'application de la fusion cellulaire la plus médiatique auprès du grand public est sans nul doute le clonage. Bien que le premier clonage à partir de cellules différenciées ait réussi en 1995 avec la naissance des brebis Megan et Morag (Campbell et *al.* 1996), c'est la naissance de leur cousine Dolly en 1996 qui fut la plus médiatisée car cette dernière fut clonée à partir d'une cellule adulte (Wilmut et *al.* 1997). Cette technique consiste à fusionner le noyau d'une cellule adulte avec l'ovule énucléé d'une autre brebis. Cette naissance a suscité l'engouement du public qui voyait déjà la possibilité de recréer à l'identique des humains. Cependant, l'embryon ainsi cloné porte le matériel génétique de la cellule adulte de base, mais n'est pas une copie conforme de l'individu car l'ovule énucléé a aussi une influence sur



le développement. Depuis Dolly, plusieurs autres espèces ont pu être clonées. Ainsi, cette méthode présente une possibilité intéressante pour la sauvegarde d'espèces en voie de disparition.

b. Comment?

Les trois principales techniques de fusion cellulaire sont résumées dans le Tableau 1.1.

**Tableau 1.1 :** Avantages et inconvénients des différentes techniques de fusion cellulaire

Méthode	Principe	Avantage	Inconvénient	Référence
Virale (ex : virus Sendai)	Exploitation des propriétés infectieuses du virus	- Rapide - Simple	- Faible rendement - Risque de propagation du virus	Bachi et al. 1973
Chimique (par PEG)	Absorption de la couche d'eau extramembranaire par le PEG et rapprochement des membranes	- Simple - Pas de matériel spécifique	- Faible rendement (< 5%) - Toxicité - Protocole peu contrôlable	Jantscheff et al. 2002
Electrique ou physique (Electrofusion)	Perméabilisation réversible de la membrane à l'aide d'impulsions électriques	- Très bon rendement (de 20% à 100%) - Pas de contamination de l'échantillon - Reproductible et fiable	- Nécessité d'un générateur de signaux électriques et de dispositif d'application (cuvette/microsystème) - Mécanisme toujours à l'étude	Bischoff et al. 1982 Usaj et al. 2013

La fusion par médiation virale repose sur les capacités naturelles du virus à traverser la membrane d'une cellule. Bien que les virus soient désactivés, il subsiste un risque de prolifération dans le corps du patient.

La fusion chimique à l'aide de polyéthylène glycol (PEG) repose sur la capacité de ce produit à absorber la couche d'eau entourant la membrane cellulaire. Ainsi, le contact entre les cellules est plus important et ces dernières s'agglutinent. Cette proximité favorise le processus de fusion. Néanmoins, toutes les cellules accolées ne fusionnent pas. De plus, l'utilisation de ce produit chimique est potentiellement cytotoxique conduisant à des rendements de fusion très faibles.

L'utilisation d'impulsions électriques quant à elle repose sur une réduction de la couche d'eau à l'extérieur de la membrane couplée à une déstabilisation réversible des phospholipides constituant cette dernière. Ainsi, deux cellules en contact et

électroperméabilisées peuvent fusionner leurs membranes ; c'est le principe d'*électrofusion*. Ce phénomène fut pour la première fois étudié par l'équipe de Zimmermann (Zimmermann et al. 1982, Bischoff et al. 1982).

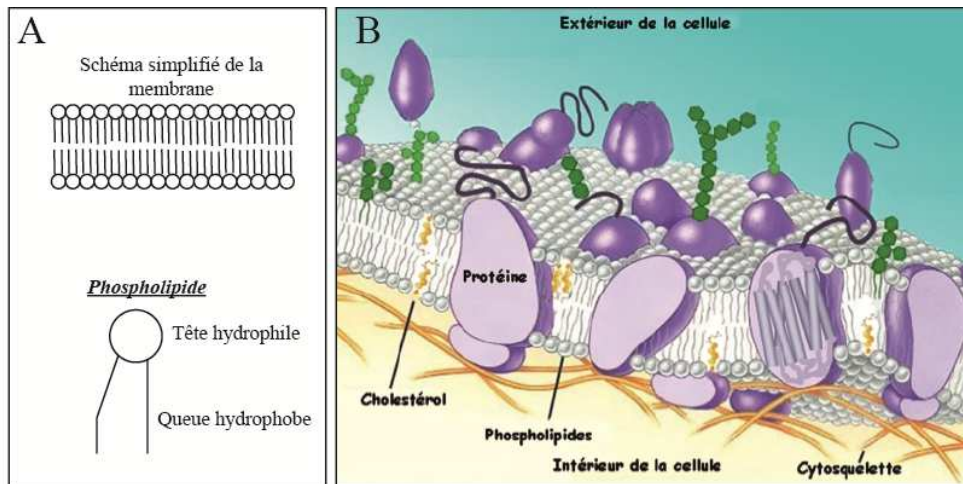
L'évaluation des rendements de ces différentes méthodes est fortement dépendante de la méthode de calcul et d'observation. Néanmoins, il semblerait que la fusion par champ électrique pulsé soit en tête de liste dans ce domaine avec des rendements allant jusqu'à 20% en cuvettes d'électroporation (Sukhorukov et al. 2006), 30 à 40% en puits avec des cellules partiellement adhérentes (Usaj et al. 2013) ou encore des rendements frôlant les 100% en microsystèmes (Gel et al 2010). Certaines équipes travaillent quant à elles sur des protocoles combinant plusieurs de ces techniques comme l'électrofusion assistée par un prétraitement biologique ou une oxydation de la membrane (Kato et al. 2011).

Les principaux avantages de l'électrofusion sont la simplicité de mise en œuvre et le développement aisé de protocoles reproductibles et efficaces. Par ailleurs, de par son caractère non invasif, l'électrofusion n'apporte aucune contamination externe aux échantillons. C'est pour cela que pour beaucoup de chercheurs, l'électrofusion est la technique la plus prometteuse. Afin de comprendre son mécanisme, intéressons-nous tout d'abord à l'effet d'impulsions électriques sur des cellules biologiques.

### **1.1.2. Le champ électrique et le vivant :**

Bien que certains effets du champ électrique sur le vivant aient été observés depuis des siècles, les premières études décrivant l'effet in vitro d'un champ pulsé datent de la fin des années 1960 (Coster 1965, Sale et al. 1968). Il a été observé que, suite à l'application d'impulsions électriques, les membranes cellulaires se déstructuraient à l'image d'un diélectrique qui claquerait sous un champ électrique intense (Neumann et al. 1972, Crowley 1973, Zimmermann et al. 1974). Quelques années plus tard, il a été démontré que cette déstructuration pouvait être réversible et permettait à certaines molécules de, contrairement à leur nature, traverser la membrane (Mir et al. 1988, Rols et al. 1998).

La membrane cellulaire est principalement constituée d'une double couche lipidique (phospholipides présentant une tête hydrophile et une queue hydrophobe) dans laquelle sont insérées des protéines (figure 1.1). Les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule se font en général à travers ces protéines, ou par diffusion à travers les phospholipides dans le cas de molécules lipophiles.



**Figure 1.1 :** Composition de la membrane cellulaire. A. Schéma simplifié représentant une bicouche lipidique. B. Schéma plus réaliste (Mauroy 2010)

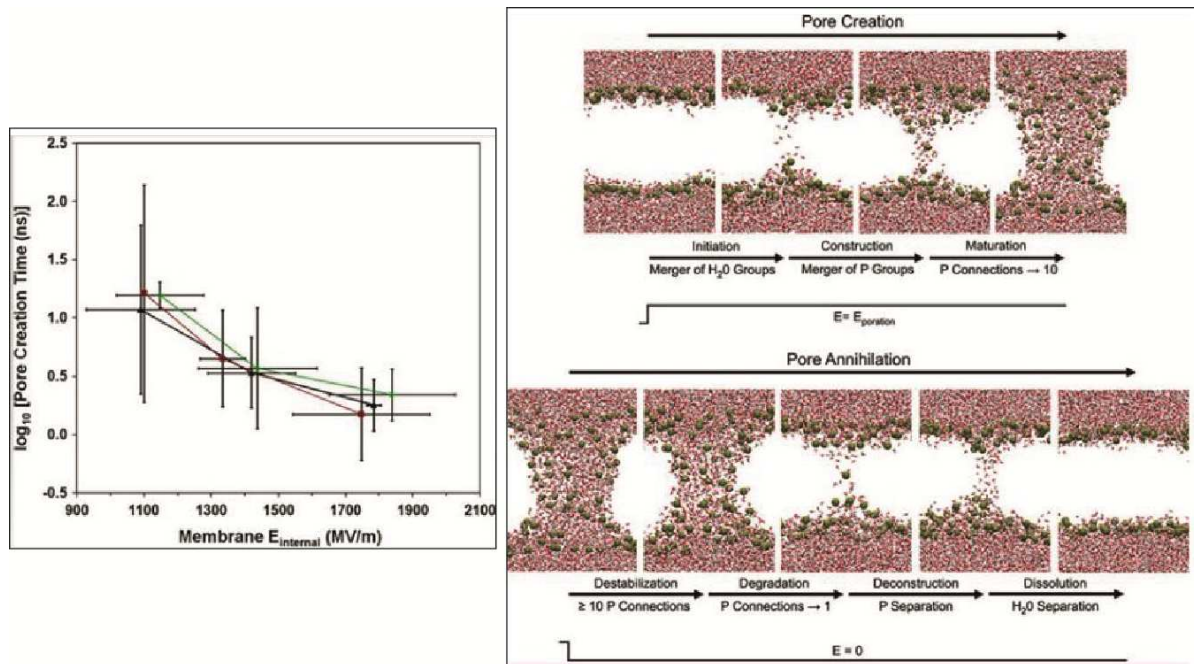
Ainsi, la membrane est très sélective concernant les échanges intra et extracellulaires. Or, durant les expériences précitées, des molécules normalement bloquées par la membrane se retrouvaient à l'intérieur de la cellule suite à l'application d'impulsions électriques. Ceci prouve que, grâce aux impulsions électriques, la membrane entre dans un état perméabilisé (restreint) laissant diffuser certaines macromolécules, et dans les deux sens.

#### a. Membrane cellulaire et électropéabilisation : pore ou pas pore ?

Dans le cas d'impulsions longues ou de très forte amplitude, la membrane est totalement détruite (lyse cellulaire) (Sale et *al.* 1968). Mais que se passe-t-il au niveau membranaire dans le cas d'impulsions plus modérées ? Il y a bien création de défauts membranaires facilitant l'accès de grosses molécules, mais les phospholipides sont-ils seulement « déstabilisés » au sens physico-chimique, ou des pores se créent-ils littéralement ? A ce jour, la communauté scientifique n'a pas définitivement statué sur le sujet et les deux théories existent (voire 3 en considérant la possibilité d'une combinaison de déstabilisation et de présence de pores). En effet, le fait, qu'à ce jour, les deux termes **électroporation** et **électropéabilisation** restent utilisés, témoigne de cette incertitude.

En se penchant sur la théorie, des simulations en dynamique moléculaires montrent qu'en appliquant un potentiel transmembranaire (différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule) à l'aide d'un champ électrique externe, il est possible de former des pores dans la membrane (Tarek 2005, Delemotte et *al.* 2008). Ces simulations montrent ainsi que la présence d'un champ électrique externe assez élevé déstabiliserait tellement la bicouche lipidique que des molécules d'eau pourraient se frayer un chemin créant ainsi un

pont hydrique à travers la membrane : un pore. Ce pont permet ensuite la diffusion de molécules hydrophiles vers le cytoplasme ou vers le milieu extracellulaire. Ce type de pores serait très peu stable et aurait une durée de vie très courte (Vernier *et al.* 2010) (Figure 1.2).



**Figure 1.2** : Simulations en dynamique moléculaire du cycle de vie d'un pore (Vernier *et al.* 2010).

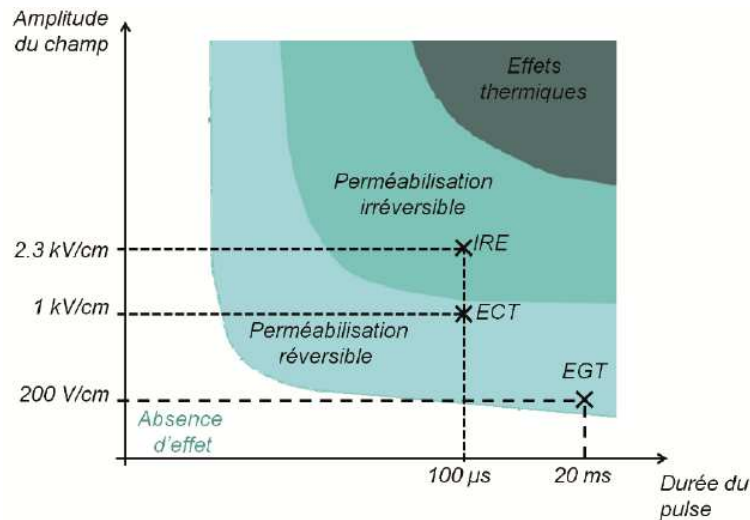
D'autre part, la dynamique moléculaire laisse penser que la formation de pores est indépendante de la durée des impulsions. En fait, pour peu que la tension transmembranaire soit supérieure à 2 V, et que l'impulsion dure plus de 2 ns, des pores se créeraient en moins de 10 ns et disparaîtraient en quelques dizaines de ns (Vernier *et al.* 2007).

Cependant, une membrane cellulaire est plus complexe qu'une bicouche lipidique car beaucoup de protéines et de molécules différentes s'y insèrent et l'entourent. La création de pores dans la membrane des modèles cellulaires est donc controversée (Teissié *et al.* 2005). D'autant plus que les ponts hydriques n'ont pas encore été expérimentalement mis en évidence. Toutefois, l'augmentation de la perméabilisation de la cellule ne peut être remise en cause. Et c'est cet accès facilité au cytoplasme qui est à l'origine du nombre et de la diversité des applications de l'électroperméabilisation.

### b. Applications de l'électroperméabilisation:

L'état perméabilisé décrit précédemment peut être réversible. Néanmoins, bien que les impulsions d'électroperméabilisation classique ne durent que quelques dizaines de microsecondes, la membrane met plusieurs minutes avant de retrouver son état naturel et

barrer la route à la majorité des molécules (Pucihar et al. 2008). Dépendamment de l'intensité et de la durée des impulsions appliquées, plusieurs états sont possibles (Figure 1.3).



**Figure 1.3 :** Schéma récapitulant les différents effets obtenus par application d'impulsions électrique sur des cellules et quelques applications : IRE = Electroporation irréversible (ablation de tumeurs), ECT = ElectroChimio thérapie, EGT = Electro transfert de gènes (Silve 2011)

Cette diversité d'états en fonction des paramètres appliqués ainsi que la possibilité d'accéder facilement à l'intérieur de la cellule ont ouvert la voie à bon nombre d'applications dont les principales sont listées ici et en figure 1.4:

- Lyse cellulaire et extraction de contenu cytoplasmique:

Déjà en 1968, Sale et Hamilton avaient mis en évidence que l'application de champs intenses entraînait la destruction de la membrane provoquant une lyse cellulaire. Cette méthode a ensuite été utilisée pour l'analyse du contenu de cellules après leur lyse. D'autre part, Neumann a très tôt démontré (1972) que même une perméabilisation réversible pouvait permettre à certaines molécules de sortir de la cellule.

- Ablation tumorale :

Toujours dans le registre de la perméabilisation irréversible, il est possible de détruire une tumeur sans intervention chirurgicale (Davalos et al. 2005). En effet, l'augmentation de la durée des impulsions ou de leur nombre peut induire des dommages irréversibles à un tissu sans induire d'effets thermiques. Ainsi, un tissu tumoral peut être détruit sans avoir à y accéder directement (par chirurgie). Cette technique proposant une méthode efficace d'ablation tumorale, même dans des zones difficiles d'accès, et sans intervention chirurgicale lourde, semble donc tout à fait cliniquement réalisable.

- Agroalimentaire :

Dans ce cadre, l'utilisation de champs intenses est exploitée par les industriels pour l'extraction de jus (raisin, betterave, canne à sucre), la stérilisation de jus de fruits ou de lait (Jeyamkondan et *al.* 1999).

- Electrochimiothérapie (ECT):

L'accès facilité au cytoplasme grâce aux impulsions électriques a permis à beaucoup d'applications, nécessitant l'entrée de molécules hydrophiles dans la cellule, de se développer. Néanmoins, l'application *in vivo* la plus aboutie dans ce domaine reste l'électrochimiothérapie. Ce traitement consiste à électroperméabiliser réversiblement et localement les cellules cancéreuses avant d'injecter un médicament cytotoxique. Dans le cadre de la chimiothérapie classique, la quantité de médicament entrant dans les cellules est faible car ces dernières sont souvent non-perméantes (n'entrant pas d'elles-mêmes dans les cellules). Les doses sont alors augmentées pour maximiser la quantité de principe actif dans les cellules tumorales. D'un autre côté, les fortes doses entraînent des effets secondaires importants. Le rôle de la perméabilisation du tissu tumoral juste avant (ou juste après) l'injection du médicament va permettre une entrée massive des molécules d'intérêt, et donc une réduction des doses nécessaires à l'induction d'un effet.

Les premiers tests *in vitro* (Mir et *al.* 1988, Orłowski et *al.* 1988) combinaient l'effet de la bléomycine (agent anti-cancéreux par induction de cassures de l'ADN) et d'impulsions électriques. Très rapidement, le traitement fut appliqué sur l'animal (Mir et *al.* 1991a) puis en tests cliniques (Mir et *al.* 1991b). En 2006, les protocoles furent standardisés et un générateur dédié mis sur le marché (Cliniporateur<sup>TM</sup>) (Mir et *al.* 2006). A ce jour, plus de 100 cliniques prodiguent efficacement des traitements par électrochimiothérapie.

- Outil de laboratoire :

Toujours dans le cadre de l'accès au cytoplasme, l'électroperméabilisation est très souvent utilisée en routine de laboratoire pour le transfert de gènes dans des bactéries (transformation) ou de cellules (transfection) (Taketo 1988, Potter 1988). Ces utilisations ont permis l'entrée sur le marché de plusieurs systèmes commerciaux d'électroperméabilisation.

- Thérapie génique (EGT):

Le transfert d'un gène à l'intérieur de cellules ou d'un tissu à l'aide d'impulsions électriques a aussi été transposé à la médecine. En effet, l'utilisation de l'électroperméabilisation permet de s'affranchir de l'emploi d'un quelconque virus qui pourrait entraîner un risque pour le patient

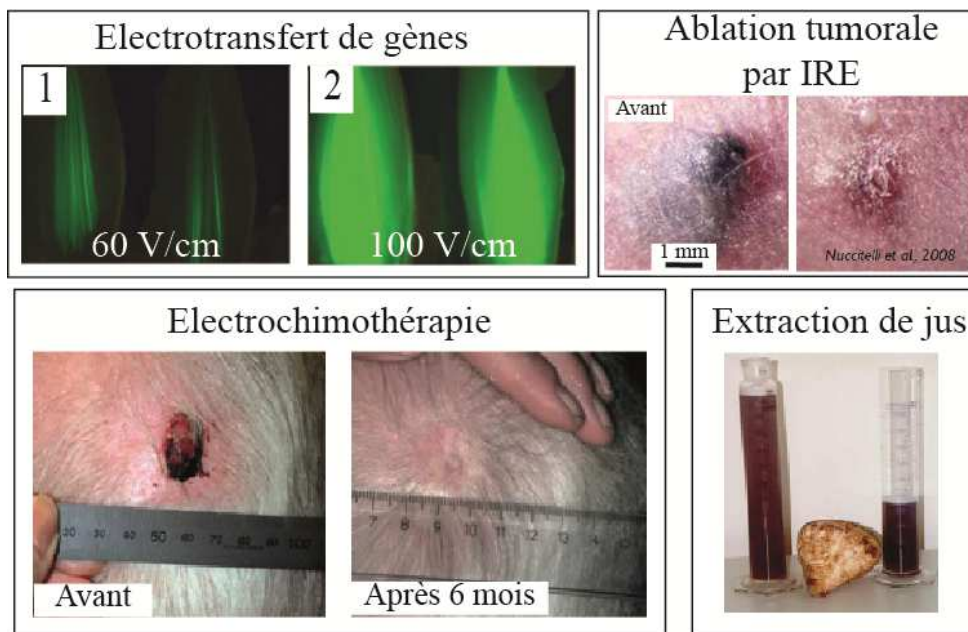
(Mir et *al.* 2005, Mir 2009). Le premier test clinique en Phase I d'électrotransfert de gène sur des patients atteints de cancer est concluant (Daud et *al.* 2008).

- Nanoporation

Grâce aux progrès technologiques, il est maintenant possible de délivrer des impulsions ultracourtes (10 ns à 300 ns) et de très forte amplitude (10 à 150 kV/cm) ; ce sont les nanopulses (nPEF). Les premières expérimentations suggèrent que l'application sur le vivant de ce genre d'impulsions très courtes pourrait entraîner la perméabilisation des membranes lipidiques internes de la cellule sans endommager l'enveloppe externe (Schoenbach et *al.* 2001). Néanmoins, bien que ces impulsions induisent des effets internes de la cellule (apoptose,...) (Schoenbach et *al.* 2007), il a été noté que la membrane externe était aussi perméabilisée. Cependant, dans ces conditions, la membrane cytoplasmique n'est perméable qu'à de petites molécules (Vernier et *al.* 2006, Villemejeane 2009, Dalmy et *al.* 2012).

- Electrofusion :

Comme mentionné en partie I.1.1.b, ce mode de production d'hybridomes fut découvert en 1982 par l'équipe de Zimmermann. La partie qui suit traite plus en détail cette application.



**Figure 1.4 :** Exemples d'applications d'électroperméabilisation.

c. Electrofusion cellulaire : paramètres, mécanisme

- Influence des paramètres électriques :

En réalité, les limites entre les états de perméabilisation ne sont pas aussi tranchées que le laisse penser la figure 1.3 ; ces états sont aussi fortement dépendants du type cellulaire. Par

ailleurs, d'autres paramètres que la durée et l'amplitude des impulsions électriques impactent la perméabilisation (Pucihar et al. 2002). Toutefois, plusieurs études ont constaté que 8 à 10 impulsions suffisaient à avoir un bon niveau d'expression de plasmides *in vivo* (Rols et al. 1998). Teissié et al. (1998) ont aussi prouvé qu'au-delà de 10 impulsions, le taux de perméabilisation ne changeait pas significativement. De même, l'augmentation de la fréquence de répétition n'améliore pas le taux de perméabilisation (Pucihar et al. 2002), mais peut augmenter son seuil. Le principal avantage de l'augmentation de la fréquence des impulsions est la diminution de la contraction musculaire durant les tests *in vivo*. Quant aux tests *in vitro*, ils utilisent généralement une fréquence de 1 ou 2 Hz.

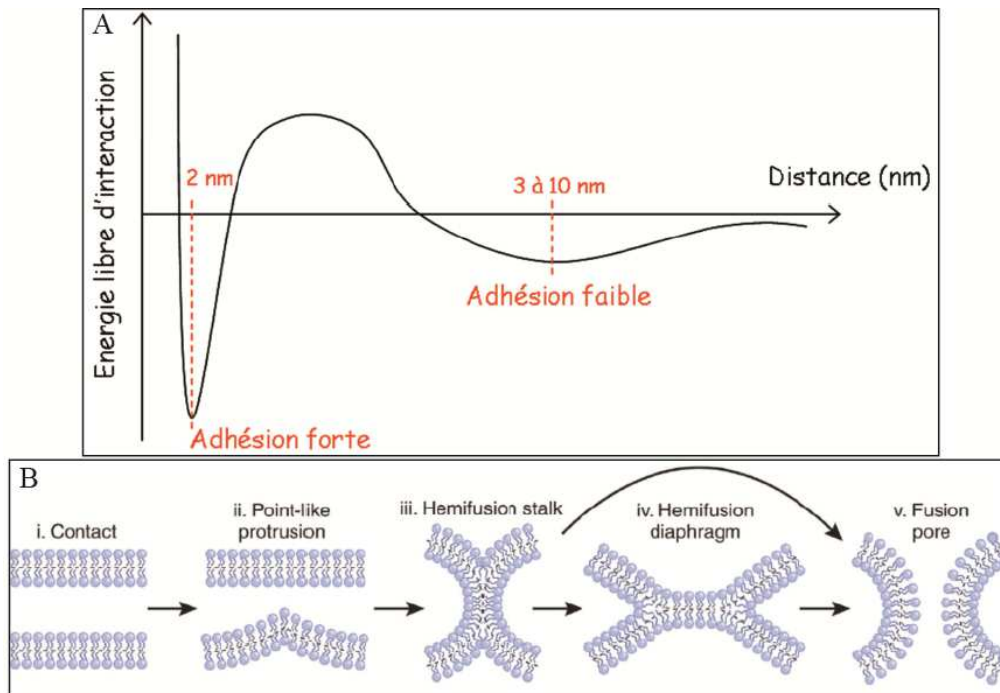
Concernant l'électrofusion, ces mêmes paramètres peuvent avoir une influence sur l'efficacité. Les expériences de Teissié (1998) ont prouvé qu'au-delà de 20 impulsions (de 100  $\mu$ s), le pourcentage de fusion chutait, en même temps que la viabilité cellulaire. D'autre part, le rendement de fusion ne changeait pas en augmentant la durée d'impulsion au-delà de 100  $\mu$ s, contrairement à la viabilité qui chutait ici aussi. L'application de 10 impulsions d'une durée de 100  $\mu$ s avec une fréquence de 1 Hz semble la plus appropriée dans le cadre de l'électrofusion.

- Mécanisme de fusion :

Afin de fusionner deux cellules, il faut tout d'abord mettre en contact leurs membranes. Or, lorsque deux cellules sont très proches, plusieurs forces entrent en jeu. L'ensemble de ces forces donne lieu à une énergie libre d'interaction gouvernant l'adhésion ou la répulsion des membranes (figure 1.5.A). Cette énergie présente deux minimas correspondant aux situations d'adhésion stable. A une distance de 3-10 nm, il existe une adhésion faible entre les membranes, gouvernée par les forces de Van Der Waals entre les molécules des deux surfaces lipidiques se faisant face. Pour des distances plus courtes (1-2 nm), le minimum, se traduisant par une adhésion forte, est gouverné par les forces d'ondulation et d'hydratation. Les forces d'ondulation sont dues aux fluctuations membranaires pouvant empêcher l'interaction entre les membranes. Quant à la force d'hydratation, elle correspond à une répulsion provenant de la couche structurée de molécules d'eau présente à la surface de la membrane. Ces deux dernières forces érigent une barrière énergétique empêchant les membranes de se mettre en contact. Pour qu'il y ait fusion, il est nécessaire que le bilan des forces corresponde à une attraction et non plus à une répulsion. Le processus de fusion doit donc être précédé par la déstabilisation des molécules d'eau inter-faciales afin de diminuer la répulsion due aux forces d'hydratation. C'est l'application d'une impulsion électrique qui entraîne, dans le cas de



l'électrofusion, cette déstabilisation conduisant à l'état fusogène (Ramos 2000, Lentz et al. 1994).



**Figure 1.5 :** Théories sur le processus d'électrofusion. A. Energie libre d'interaction entre deux membranes en fonction de leur distance (Ramos 2000). B. Modèle d'électrofusion, 'mécanisme de la tige' (Chernomordik et al. 2008, Mauroy 2010).

Dès lors que les deux membranes sont en contact (pas de continuité lipidique ou aqueuse), elles peuvent fusionner. Le modèle théorique de fusion le plus largement repris dans la littérature est le mécanisme de la tige (figure 1.5.B). Tout d'abord proposé en 1984 par Markin (Markin et al. 1984), il a ensuite été repris par Chernomordik en 1995 (Chernomordik et al. 2008). Les études ont montré l'existence, dans ce mécanisme, d'une étape intermédiaire où les feuillettes externes des membranes sont connectés mais pas les feuillettes internes : c'est la tige d'hémifusion. Cette tige est instable mais peut s'étendre en diaphragme. Enfin, un pore de fusion se forme dans la bicouche du diaphragme d'hémifusion ou directement à partir de la tige. Ce pore connecte alors les deux cytoplasmes.

Le faible taux de fusion obtenu par les différentes méthodes représente un frein à l'essor de l'électrofusion. D'autant plus que pour certaines applications comme l'immunothérapie du cancer, il est nécessaire de produire de grandes quantités d'hybridomes à partir d'un faible échantillon tumoral pour espérer avoir une dose efficace de vaccin (annexe 2). Or les rendements proposés par électrofusion en cuvette classique d'électroporation restent insuffisants. Il est important de noter que la fusion anarchique dans ces dispositifs donne lieu

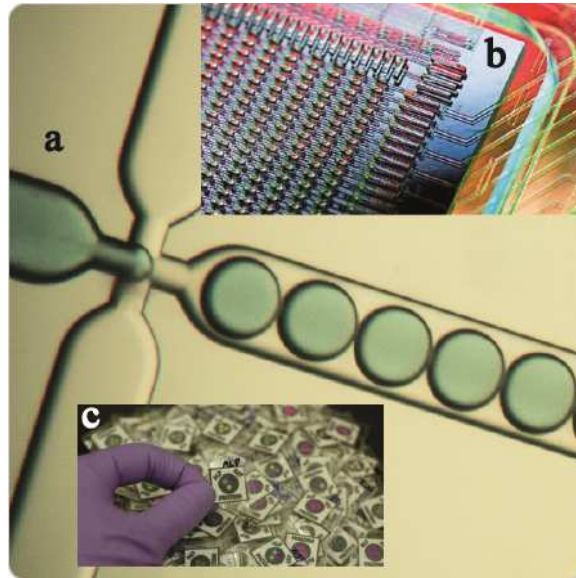
à une suspension mixte contenant des hybridomes hétérogènes souvent polynucléaires (probablement peu viables) et des fusions homogènes nécessitant une irradiation. Ainsi, le réel rendement de fusions utile est très faible. S'il était possible de placer les cellules de manière à n'avoir que des fusions binucléaires hétérogènes, le rendement réel serait décuplé. Mes travaux de thèse ont vocation à montrer que les microtechnologies ont un fort potentiel pour surmonter ce verrou.

## **I.2. Biopuces ou Lab-On-Chip : De la Bio pour la Bio !**

Le prix Nobel Richard Feynman durant son discours en 1959 sensibilisait la communauté scientifique au domaine des micro/nanotechnologies (« There's plenty of room at the bottom », Feynman 1959). Bien que la technologie ne le permettait pas encore à l'époque, ce scientifique entrevoyait déjà comment les micro/nano dispositifs pourraient révolutionner la science. Ce discours est souvent considéré comme le point de départ de la recherche en micro/nanotechnologies. Il a toutefois fallu attendre le développement des procédés technologiques de fabrication des circuits intégrés pour que les microsystèmes voient le jour. Ainsi, ce n'est qu'à partir des années 70-80 que les MEMS (pour *MicroElectroMechanical Systems*) ont commencé à émerger. Depuis les années 80, un nombre incalculable de systèmes microscopiques a été développé et commercialisé. Ces systèmes sont maintenant utilisés dans la vie de tous les jours, et le domaine reste en plein essor. Mais les ambitions du Professeur Feynman et de son doctorant Albert R. Hibbs pour les microtechnologies allaient encore plus loin. En 1959, ils voyaient déjà ce que les microsystèmes pourraient faire dans le cadre de la médecine. Des microsystèmes comme les puces implantables régulatrices d'insuline (Lang et al. 2011, Raoux et al. 2011), la mesure en continu de la pression intraoculaire (Auvray et al. 2012) ou encore dans le domaine des implants rétiniens (Djilas et al. 2011) sont à l'étude. C'est ainsi que le domaine des Bio-MEMS (par abus de langage : microsystèmes à applications Biomédicales) se développe rapidement devenant une thématique de recherche à part entière. Les laboratoires sur puce ou LOC (*Lab On Chip*) s'insèrent dans cette thématique. Dans un LOC, plusieurs fonctions sont combinées pour détecter, synthétiser, extraire, analyser ou encore utiliser des molécules chimiques ou biologiques, recréant ainsi tout un laboratoire sur quelques cm<sup>2</sup> (voire moins). Ces analyses se passent dans un environnement fluide et à l'échelle du micromètre ; les LOCs se placent dans le domaine de la microfluidique.

### 1.2.1. La microfluidique et les applications biomédicales :

Les systèmes microfluidiques sont déjà présents dans notre environnement naturel. Un arbre intègre une multitude de canaux micro et nanométriques pour acheminer la sève à toutes ses feuilles. L'araignée combine des fonctions de synthèse de protéines puis leur solidification en un fil collant ininterrompu afin de constituer sa toile (Tabeling, 2003, 2005). Les systèmes microfluidiques créés en laboratoire sont moins sophistiqués mais intègrent des fonctions de plus en plus élaborées (figure 1.6).



**Figure 1.6 :** Puces microfluidiques plus ou moins complexes. a. Générateur de gouttes (Dolomite). b. Puce microfluidique réutilisable en PDMS (PolyDiMethyl Siloxane) pour PCR contenant 2403 points de réaction (Fluidigm). c. Testeur de fonction hépatique en papier (très faible coût, Harvard).

Les applications des laboratoires sur puces vont de l'optique à la biologie, en passant par l'électronique et la chimie. Ce large spectre est dû, au-delà de la réduction des quantités nécessaires à l'analyse, à l'apport de la miniaturisation sur les forces mises en jeu. En effet, en réduisant les dimensions, la loi d'échelles entre en jeu exacerbant certaines forces et en minimisant d'autres. Ainsi, en réduisant l'échelle par 10, la force de capillarité (proportionnelle au  $m$ ) sera divisée par 10 alors que la gravité le sera par 1000 (proportionnelle au  $m^3$ ). Ceci implique qu'en environnement microfluidique, les forces surfaciques sont prépondérantes en comparaison aux forces volumiques. A cette échelle, les forces électriques sont aussi avantageuses car le champ électrique est inversement proportionnel à la distance entre les électrodes. En bref, la miniaturisation des dimensions apporte :

- La prédominance des forces de capillarité sur les forces volumiques
- Des forces électriques et des effets électrocinétiques exacerbés

- La rapidité des échanges thermiques (conduction, homogénéisation)
- La laminarisation des écoulements (écoulements très stables, non turbulents, pas de mélange en dehors de la diffusion).

Ainsi, il est possible de détecter d'infimes quantités d'un composé chimique, de rendre possibles certaines réactions chimiques ou d'en accélérer d'autres.

Certains laboratoires sur puces sont maintenant commercialisés et représenteraient un marché de 6 Milliards de \$ par an (Tabeling 2013). Parmi les systèmes microfluidiques les plus vendus, nous pouvons citer les imprimantes à jets d'encre, les tests de grossesse et les puces à ADN (analyse rapide d'Agilent, ou de diagnostic par Abbott). Les récents systèmes d'affichage réversible en relief à base de gouttes sont aussi promis à un avenir radieux (commercialisation par Tactus Technology prévue d'ici fin 2013).

Dans le cadre des LOCs pour des applications biomédicales, 3 grandes catégories sont très présentes : les puces à ADN (Andrieux, 2008), les puces à protéines (Zhu et *al.* 2001) et les puces à cellules.

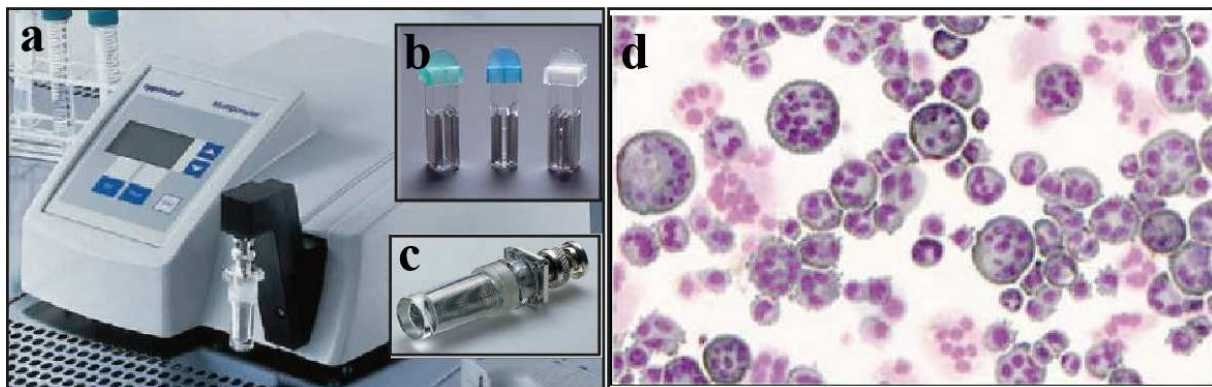
#### Les puces à cellules :

Certaines applications nécessitent la manipulation d'une cellule entière. Il peut par exemple être nécessaire de tester l'effet d'un médicament sur le système complexe qu'est la cellule avant de passer à des modèles animaux. Les puces à cellules offrent cette possibilité à l'échelle de la cellule unique, des matrices de cellules uniques, ou de tissus cellulaires. Parmi les applications nous pouvons citer le diagnostic (Lee et *al.* 2008), le criblage de différentes molécules (Labeed et *al.* 2003) ou encore l'analyse de l'impédance cellulaire (Schwarzenberger et *al.* 2011).

En vue de certaines de ces applications, le contrôle de la position des cellules peut être primordial. Plusieurs techniques de manipulation ou de piégeage cellulaire ont alors été développées. Une des méthodes les plus connues est l'utilisation d'une micropipette pour immobiliser une cellule (utilisée pour l'insémination artificielle). Dans le même esprit, des micro-pinces sophistiquées à fonctionnement mécanique (Leong et *al.* 2009, Jager et *al.* 2000) ou optique (Croitault et *al.* 2003) peuvent être utilisées pour l'immobilisation/déplacement de particules. Néanmoins, cette méthode ne peut être parallélisée. D'autres méthodes ont donc souvent été envisagées comme : l'utilisation d'anticorps (Schaper 2007) et le piégeage fluide grâce à des pièges microstructurés (Skelley et *al.* 2009, Tixier-Mita et *al.* 2004) ou au contrôle du flux. Enfin une méthode qui suscite beaucoup d'intérêt depuis quelques années est l'utilisation de forces électriques directes ou indirectes. En effet, nous verrons dans le chapitre 2 que l'application d'un champ électrique peut créer différentes forces qui, dans les

bonnes conditions, peuvent amener les cellules/particules là où le manipulateur le souhaite. Ainsi, l'électro-osmose (force hydrodynamique) et les forces électrothermiques, au départ considérées comme effets indésirables résultant d'un champ électrique, commencent à être exploitées pour la manipulation de particules. Néanmoins, la diélectrophorèse (DEP) reste la force électrique la plus utilisée pour des particules de l'ordre de la dizaine de microns comme les cellules (détail en chapitre 2). En effet, la DEP est utilisable pour des particules allant de l'ordre du nanomètre (Salomon, 2011) à plusieurs dizaines de microns. Cette force résultant de l'application d'un champ électrique non uniforme sur des particules globalement neutres comme les cellules est notamment utilisée pour le tri (Salomon *et al.* 2011, Patel *et al.* 2012), la purification d'échantillons (Bisceglia *et al.* 2013) ou encore le placement de cellules préalablement à une étape de traitement (Labeed *et al.* 2003).

L'électrofusion s'effectue classiquement dans des cuvettes d'électroporation constituées de deux électrodes plates espacées de 1-4 mm. Ces dispositifs commerciaux sont très pratiques car ne nécessitent que le mélange des deux types cellulaires dans un ratio 1:1 et le remplissage de la cuve. De la DEP est ensuite très souvent appliquée pour améliorer le contact entre les cellules avant l'application des impulsions d'électrofusion. En revanche, l'échantillon récupéré est constitué d'une multitude d'hybridomes différents car les fusions sont anarchiques. Des mastodontes polynucléaires peu viables constituent une bonne partie de l'échantillon. Ce dernier doit donc être filtré à plusieurs reprises pour sélectionner les hybridomes bi-nucléaires hétérogènes (paires A-B) (figure 1.7). Bien que certaines équipes (notamment celle de Zimmermann) arrivent à un rendement de fusions de 20%, les fusions bi-nucléaires hétérogènes n'en constituent qu'une infime partie. Par ailleurs, les cuvettes classiques ne permettent pas d'observer l'électrofusion en temps réel, limitant ainsi les possibilités d'étude du phénomène.



**Figure 1.7 :** Electrofusion en cuvettes d'électroporation (Eppendorf). a. Appareil délivrant la tension électrique à des cuvettes classiques (b) ou optimisées pour l'électrofusion (c). Le résultat est constitué d'une multitude de cellules polynucléaires (noyaux marqués, Tanaka *et al.* 2002)

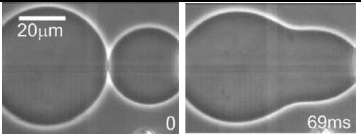
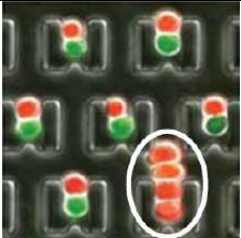
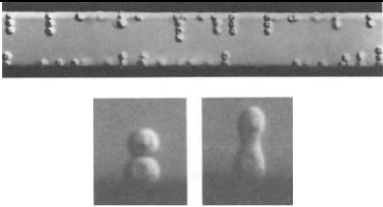
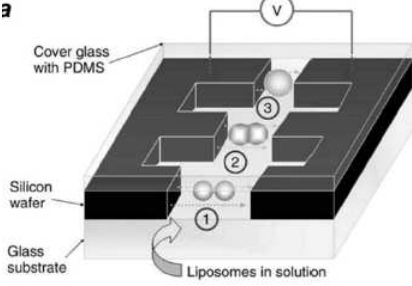
La microfluidique, en réduisant les dimensions à l'ordre de la dizaine de microns, offre la possibilité de placer les cellules où bon nous semble. Ainsi, un pré-appariement des cellules A-B peut être effectué et ainsi maximiser les fusions bi-nucléaires ET hétérogènes. Les étapes de purification étant grandement réduites (voire éliminées), la quantité de liquide qui aura été utilisée est clairement minimisée. Les échantillons dans le cadre des applications de l'électrofusion (clonage, immunothérapie) étant très précieux, la miniaturisation du volume fluide représente un avantage certain. De plus, les procédés de lithographie classiques permettent de coupler la microfluidique à des microélectrodes dont la taille, la forme et la distance peuvent être variées. Ainsi, des tensions beaucoup plus faibles peuvent être appliquées pour obtenir l'effet désiré. Enfin, le phénomène devient observable et étudiable en temps réel. Des LOCs variés ont donc été développés pour l'électrofusion. La partie suivante présente un rapide état de l'art dans ce domaine précis.

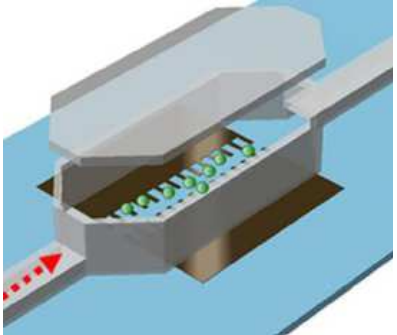
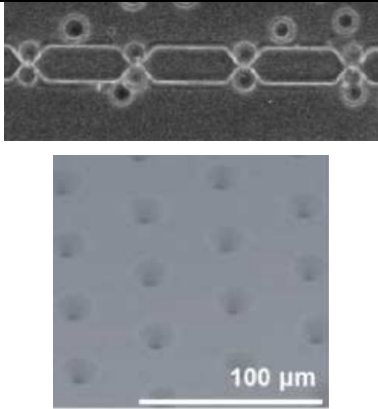
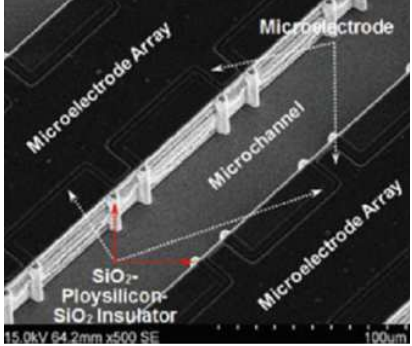
### **1.2.2. Systèmes microfluidiques (Lab-On-Chip) pour l'électrofusion :**

A ma connaissance, la première utilisation d'un microsystème dans le cadre de l'électrofusion remonte à 1982 avec l'utilisation par Halfmann et Zimmermann d'électrodes planaires afin d'observer le processus de fusion cellulaire (Halfmann et *al.* 1982). Ce dispositif apparu au tout début de la microfluidique était simple mais permettait l'observation de la DEP et de l'électrofusion. Néanmoins, l'appariement des cellules restait anarchique et les fusions polynucléaires (plus de 2 cellules) fréquentes. L'équipe de Washizu a ensuite développé une structure plus complexe intégrant 2 canaux et une concentration du champ électrique dans un orifice à travers lequel les cellules pouvaient fusionner (Masuda et *al.* 1989). Beaucoup de structures microfluidiques différentes pour l'électrofusion ont ensuite vu le jour afin d'augmenter les rendements de fusion. La plupart de ces structures sont résumées dans le tableau 1.2. L'étape de piégeage/appariement des cellules étant primordiale pour le succès de l'électrofusion, nous avons organisé le tableau récapitulatif selon les différentes techniques d'appariement :

- Biochimique (se basant sur une fonctionnalisation chimique de la surface des cellules)
- Microfluidique (n'utilisant que la structure/piège fluide pour l'appariement)
- Electrique (exploitation de la force de DEP)

**Tableau 1.2 :** Tableau récapitulatif des différents types de biopuces pour l'électrofusion cellulaire

Type d'appariement		Exemple	Avantages	Inconvénients	Références
<p>Conjugué chimique :</p> <p>Fonctionnalisation de surface des cellules et exploitation d'une jonction biochimique</p>			<p>+Hautement parallélisé</p> <p>+Pas de limite de dimensions cellulaires</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Appariement inhomogène (contact anarchique)</li> <li>- Etape de prétraitement nécessaire</li> <li>- Traitement chimique modifiant la structure membranaire</li> </ul>	<p>Clow <i>et al.</i> 2009</p> <p>Wang et Lu 2006</p> <p>Haluska <i>et al.</i> 2006</p> <p>Schaper 2007</p>
<p>Fluidique :</p> <p>Structuration de pièges microfluidiques puis appariement par contrôle de flux</p>			<p>+ Contrôle spécifique des paires formées</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Structures et contrôle fluide complexes</li> <li>- Limitation due à la taille des cellules</li> <li>- Maintien mécanique donc difficulté de récupération des hybridomes</li> </ul>	<p>Skelley <i>et al.</i> 2009</p> <p>Bai <i>et al.</i> 2010</p> <p>Kemna <i>et al.</i> 2011</p>
<p>Electrique :</p> <p>Utilisation de la force de diélectrophorèse</p>	<p>Electrodes planaires</p>		<p>+ Simplicité de mise en œuvre</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas d'appariement spécifique</li> <li>- Fusions polynucléaires anarchiques</li> <li>- Perte des cellules en contact avec les électrodes</li> </ul>	<p>Halfmann <i>et al.</i> 1982</p>
	<p>Electrodes interdigitées</p>		<p>+ La non-uniformité du champ E améliore le piégeage</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas d'appariement spécifique</li> <li>- Fusions polynucléaires anarchiques</li> <li>- Perte des cellules en contact avec les électrodes</li> <li>- Beaucoup de cellules piégées en zones « mortes » (min de champ)</li> </ul>	<p>Tresset <i>et al.</i> 2004</p> <p>Ju <i>et al.</i> 2007</p> <p>Clow <i>et al.</i> 2010</p> <p>Hu <i>et al.</i> 2011a.</p> <p>Hu <i>et al.</i> 2011b.</p>

	<p>Assisté par pression hydrodynamique</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Contrôle de la densité de cellules piégées en fonction de la pression du flux</li> <li>+ Simplicité de fabrication</li> <li>+ Pas de zones mortes de piégeage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible appariement hétérogène</li> <li>- Fusions polynucléaires</li> </ul>	<p>Ju et al. 2009</p>
<p>Electrique : Utilisation de la force de diélectrophorèse</p>	<p>Concentration du champ électrique</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>+Très bon rendement d'appariement hétérogène</li> <li>+ Très bon rendement de fusion (&gt; 97%)</li> <li>+ Fusions binucléaires</li> <li>+ Parallélisation importante pour la structure 3D</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Piégeage mécanique : difficulté de récupération de l'hybridome</li> <li>- Limitation de la fusion des noyaux si ceux-ci sont trop grands</li> <li>- Complexité de fabrication de la structure 3D</li> </ul>	<p>Masuda et al. 1989 Techaumnat et al. 2008 Gel et al. 2010 Kimura et al. 2011 Mottet et al. 2012 Hamdi et al. 2013a</p>
	<p>Concentration du champ électrique + Electrodes interdigitées</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Pas de zones mortes de piégeage</li> <li>+ Concentration du champ E améliorant l'électrofusion</li> <li>+Récupération simple des hybridomes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fabrication longue et complexe</li> <li>- Faible appariement hétérogène</li> <li>- Encore des fusions polynucléaires</li> </ul>	<p>Hu et al. 2012</p>



#### a. Piégeage par voie biochimique :

Cette méthode consiste à fonctionnaliser la surface des deux types cellulaires à l'aide de deux molécules complémentaires comme le couple biotine-streptavidine ou encore les couplets à base de lectine (se liant spécifiquement à certains glucides). Wang et Lu (2006) ont utilisé cette technique pour appairer des cellules avant leur électrofusion. Toutes les cellules furent d'abord marquées à la biotine. Ensuite, de la streptavidine a été ajoutée à une moitié de l'échantillon biotinisé. En mélangeant les deux moitiés d'échantillon, des composés cellule-biotine-streptavidine-biotine-cellule se forment grâce à l'affinité entre les deux molécules. Environ 50% de la population se retrouve ainsi liée, dont près de 30% entre seulement 2 cellules. Une autre technique consiste à greffer une des molécules sur la surface de la biopuce et l'autre sur les cellules. Ainsi, ces dernières s'alignent spécifiquement en fonction de leur greffage (Schaper, 2007). Les compositions cellulaires sont ensuite soumises à des impulsions électriques DC afin d'amorcer la fusion. L'appariement par voie biochimique permet de s'affranchir de l'utilisation d'un générateur AC pour le piégeage. De plus, la structure microfluidique peut être très simple vu que les cellules sont déjà appariées. Enfin, ce type d'appariement ne dépendant pas de la taille des cellules, il est possible de l'utiliser pour appairer des cellules de diamètres très différents. Néanmoins, la fonctionnalisation est une étape (voire plus) supplémentaire pouvant rallonger le processus. De plus, elle peut conduire à des agrégats cellulaires et des fusions polynucléaires non hétérogènes. D'autre part, la modification chimique de la membrane cellulaire pourrait entraîner des dommages sur la viabilité cellulaire ou des conséquences sur le processus d'électrofusion.

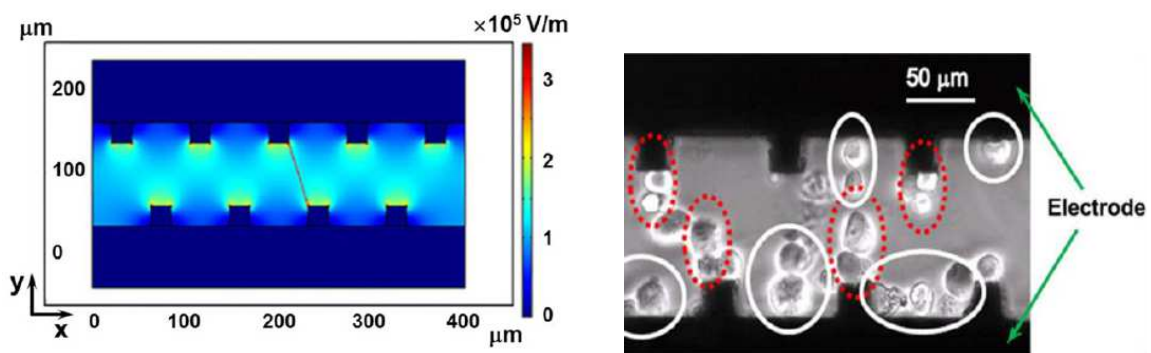
#### b. Piégeage par voie microfluidique :

La microfluidique connaissant des progrès rapides, un mode d'appariement se basant seulement sur le flux et la structure fluidique (présence de pièges) commence à attirer l'attention. Skelley et al. (2009) ont par exemple développé un appariement cellulaire, à base de motifs de piégeage, appliqué à la fusion cellulaire (plus de détails sur le mode de fonctionnement sont présentés dans le chapitre 2). Ils ont par exemple pu démontrer, en utilisant leur structure, que l'électrofusion pouvait présenter de meilleurs rendements que la fusion chimique par PEG. Comme la précédente, cette méthode permet de diminuer le nombre de générateurs durant l'expérience. De plus, elle est applicable sur de grandes matrices ouvrant la voie à la fusion haute densité sur puce. Néanmoins, la structure de Skelley est quelque peu complexe (2 niveaux fluidiques) et les étapes de chargement de la biopuce fastidieuses. De plus, les pièges doivent être adaptés à la taille des cellules. Enfin, le piégeage

*mécanico-fluidique*, très efficace pour le maintien des cellules lors de la fusion, peut être problématique pour la récupération des hybridomes formés, qui sont donc plus gros et difficiles à évacuer.

c. Piégeage par voie électrique :

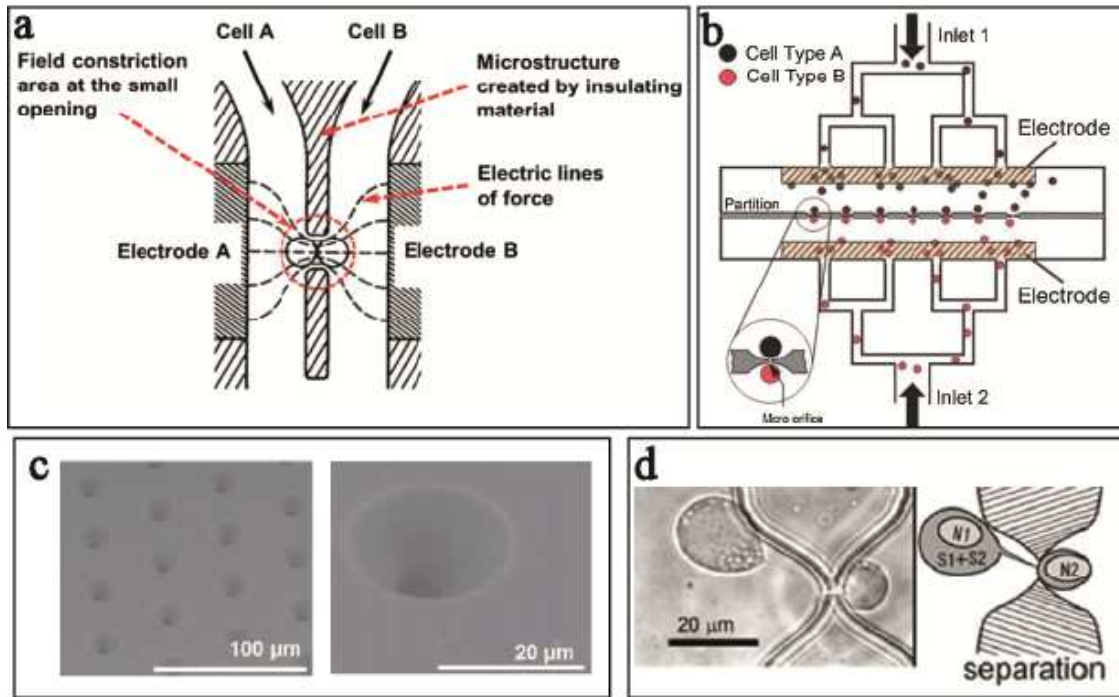
Grâce aux possibilités offertes par le piégeage électrique, cette technique est de loin la plus explorée, et donc la plus diversifiée (Hu et *al.* 2013). Dans cette méthode, les cellules sont appariées grâce à un gradient de champ électrique créant une force de diélectrophorèse (DEP). Des électrodes simples ont tout d’abord été utilisées (Halfmann et *al.* 1982). Bien que cette structure soit très simple à fabriquer, elle ne permet pas un appariement spécifique des cellules. Les fusions polynucléaires sont donc nombreuses et l’hétérogénéité des agrégats (paire de cellules AB) est faible. De plus, ne présentant pas un fort gradient de champ, la force de DEP n’est pas très élevée. En microstructurant la forme des électrodes, il est possible de créer ce gradient nécessaire à la DEP. Des électrodes inter-digitées peuvent par exemple facilement produire un champ électrique non-uniforme (Tresset et *al.* 2003, Ju et *al.* 2007, Clow et *al.* 2010, Hu et *al.* 2011a, Hu et *al.* 2011b). Celles-ci consistent à mettre face à face deux électrodes en forme de peignes (figure 1.8). Les cellules peuvent donc s’apparier en DEP positive entre les dents des deux peignes. En réduisant cette distance, il est donc possible de limiter le nombre de cellules en contact. Néanmoins, une « zone morte » apparaît où les cellules sont parfois piégées mais faiblement perméabilisées à cause du champ électrique faible.



**Figure 1.8 :** Principe des électrodes interdigitées. Simulation électrique (gauche, Hu et al 2011a) et piégeage de cellules (droite, Tresset et *al.* 2004). Les cercles rouges indiquent les cellules appariées correctement, et les blanc les « zones mortes ».

En se basant sur le même type d’électrodes, Ju et *al.* (2009) ont toutefois ajouté une composante hydrodynamique lors du piégeage. Dans ce dispositif, le canal est constamment alimenté en cellules lors de l’application du champ électrique AC. Ainsi, les cellules non

piégées sont évacuées et la concentration de cellules est contrôlée grâce à la pression différentielle fluide exercée entre l'entrée et la sortie du canal. Bien que cette structure, simple à fabriquer, offre un meilleur contrôle de densité cellulaire, elle ne permet toutefois pas d'obtenir un bon rendement de piégeage de couples cellulaires hétérogènes. De plus, les cellules en contact direct avec l'électrode peuvent être endommagées lors de l'application de l'impulsion d'électrofusion. Le groupe de Washizu a très tôt (1989) introduit une structure très efficace pour un tel appariement. Ce dispositif est basé sur un polymère isolant constituant deux canaux distincts (pour les deux types cellulaires). Cependant, le mur isolant les deux canaux intègre des orifices laissant passer les lignes de champ électrique. Plus l'ouverture est petite, plus le champ E est concentré. Les cellules peuvent alors s'apparier de part et d'autre de l'orifice et fusionner (figure 1.9). En contrôlant l'intensité de l'impulsion DC, il est possible de ne provoquer que la fusion des cellules en contact à travers l'orifice (Techaumnat et *al.* 2008). Cette structure est particulièrement efficace quant à l'appariement hétérogène de cellules et leur électrofusion (~ 97% des cellules appariées fusionnent). Tout d'abord en 2D, une limitation de la densité des motifs existait, incompatible avec la parallélisation. Le groupe a alors imaginé cette même structure en 3D. Cette dernière consistait en 2 chambres séparées d'une membrane isolante percée de trous (de bas en haut : chambre contenant les cellules A, membrane, chambre contenant les cellules B). Ainsi, il a été possible d'augmenter considérablement la densité de fusion (6000 orifices sur une membrane de 4 mm de diamètre) (Kimura et *al.* 2011). Néanmoins, la maîtrise de la taille de l'orifice est quelque peu complexe. De plus, l'hybridome formé reste difficilement récupérable car ce dernier est mécaniquement piégé par l'orifice (en particulier pour des ouvertures inférieures à 5  $\mu\text{m}$ ). Les noyaux cellulaires peuvent même ne pas fusionner dans le cas d'un orifice de 3  $\mu\text{m}$ .



**Figure 1.9:** Structure Washizu. a. Principe de la constriction du champ électrique (Masuda *et al.* 1989), b. Principe de la structure complète d'appariement/fusion (Gel *et al.* 2010), c. Membrane pour la structure 3D (Kimura *et al.* 2011), d. hybridome coincé par un orifice de 3 µm (Gel *et al.* 2010)

Vu l'efficacité des microsystèmes de fusion basés sur la constriction de champ électrique, Hu *et al.* (2012) ont proposé une structure se basant sur le principe d'électrodes interdigitées en intégrant des isolants pour concentrer le champ électrique. Un canal en serpentin de la structure « 2D » permet d'augmenter le rendement (comparativement à un canal droit). Les dents des peignes sont intégrés au mur microfluidique pour faciliter l'évacuation des cellules, et les zones mortes sont isolées pour les rendre inactives. Cette structure combine les avantages de plusieurs des méthodes précitées. Ainsi les cellules sont efficacement fusionnées et évacuées, sans être bloquées dans des zones mortes. Néanmoins, les cellules peuvent être endommagées lors de l'application de l'impulsion DC à cause du contact direct avec les électrodes. De plus, l'appariement hétérogène reste faible, car aucun piégeage spécifique des cellules n'est effectué, et les fusions polynucléaires sont possibles. D'autre part, la fabrication de la structure est particulièrement longue et complexe à cause du nombre de couches différentes (4 matériaux différents constituant le canal/électrode).

### **I.3. Conclusion :**

Bien que les mécanismes associés à l'électroperméabilisation ou à l'électrofusion soient encore incertains, les possibilités d'application de ces méthodes sont vastes dans des secteurs allant de l'agroalimentaire à la médecine. Parmi ces applications, l'électrofusion représente un outil prometteur pour l'immunothérapie du cancer ou le clonage. Le faible rendement de fusions hétérogènes en cuvettes d'électroporation classiques représente un des freins à l'essor de cette technique. La microfluidique, grâce à un contrôle du flux et un placement précis des cellules, devient alors un outil prometteur pour la production d'hybridomes d'une part, et l'étude des mécanismes de fusion d'autre part.



## **Chapitre 2**

# **Théorie et conception**

Ce chapitre est centré sur les calculs et les simulations par éléments finis. Dans la première partie, nous allons passer en revue les principales forces mises en jeu lors de l'application d'un champ électrique sur une cellule. Ensuite, un bilan des forces est dressé afin de déterminer celles qui ont une influence significative dans notre cas.

Les trois principales géométries étudiées pour le piégeage et l'électrofusion sont présentées puis le comportement électrique et/ou fluide de ces structures analysé à l'aide du calcul en éléments finis.

Enfin, l'effet d'une impulsion électrique sur le potentiel de la cellule est abordé. Le modèle classique est détaillé et une nouvelle approche de calcul, plus précise que le modèle classique et plus flexible que le modèle analytique est présentée. Cette nouvelle méthode est ensuite appliquée à l'étude de l'évolution du potentiel cellulaire dans les différentes structures.

## **II.1. Les forces mises en jeu :**

L'électrophorèse est une méthode de séparation très utilisée dans le domaine de la biologie. Cette technique consiste à appliquer un champ électrique continu (DC pour *Direct Current*) sur des particules chargées (ADN, protéines, etc) afin de les faire migrer vers l'électrode opposée à leur charge. Ainsi, il est possible de séparer différentes substances chargées d'un mélange, en fonction de plusieurs paramètres (taille, forme, etc).

Dans le cas de particules globalement neutres, mais polarisable (comme les cellules), une autre force électrique est souvent utilisée dans le but de les séparer, les trier ou les placer : la diélectrophorèse (DEP). Néanmoins, la DEP n'est pas la seule force générée par l'application d'un champ électrique. Nous verrons que différentes forces électrohydrodynamiques peuvent apparaître. Au départ considérées comme parasites, ces dernières forces sont actuellement exploitées pour la manipulation des particules biologiques. Dans cette partie, nous allons passer en revue les forces directes et indirectes pouvant affecter le déplacement d'une particule. Un bilan est ensuite dressé afin de déterminer les forces dominantes.

### **II.1.1. Diélectrophorèse et facteur de Clausius-Mossotti**

#### **a. Modèle électrique d'une cellule :**

Bien qu'elle soit plus complexe que cela, une cellule biologique peut être, en première approximation, modélisée électriquement par une sphère conductrice (représentant le cytoplasme) entourée d'une membrane isolante : c'est le modèle *single shell* (figure 2.1). Chacune de ces deux parties est, d'un point de vue global, semblable à un milieu diélectrique caractérisé par une conductivité réelle  $\sigma_x$  et une permittivité relative  $\epsilon_x$  ( $x = 'me'$  pour la membrane et 'cy' pour le cytoplasme).

Soit un élément infinitésimal de milieu diélectrique ( $\epsilon_x, \sigma_x$ ) entouré d'un tube de champ électrique. Cet élément peut être approximé à un circuit RC parallèle dont les composants s'expriment comme suit :

$$C = \frac{S}{L} \epsilon_0 \epsilon_x \quad (2.1)$$

$$R = \frac{L}{S \cdot \sigma_x} \quad (2.2)$$

avec 'S' la section du tube de champ, 'L' sa longueur et  $\epsilon_0$  la permittivité du vide ( $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$  F/m). Ce circuit RC parallèle est équivalent à une capacité complexe  $C_x^*$  égale à :



$$C_x^* = C - j \frac{1}{R\omega} \quad (2.3)$$

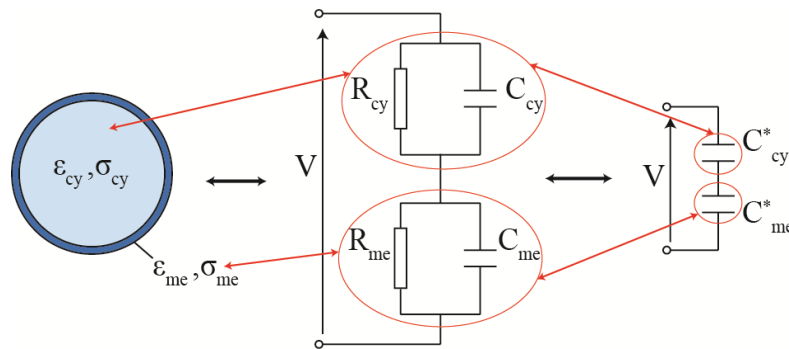
où 'j' est le nombre complexe ( $j^2 = -1$ ) et  $\omega$  la vitesse angulaire ( $\omega = 2\pi f$ , f étant la fréquence). A partir des relations (2.1) à (2.3), il est possible d'écrire la capacité équivalente sous la forme suivante :

$$C_x^* = \frac{S}{L} \left( \epsilon_0 \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{\omega} \right) = \frac{S}{L} \epsilon_x^* \quad (2.4)$$

L'équation (2.4) permet de fixer le terme de permittivité complexe  $\epsilon^*$  en fonction des conductivités et permittivités réelles, définissant le matériau diélectrique :

$$\epsilon_x^* = \epsilon_0 \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{\omega} \quad (2.5)$$

Chacun des compartiments de la cellule (membrane et cytoplasme) est caractérisé par cette permittivité complexe et peut être électriquement modélisé par un circuit RC parallèle (figure 2.1).



**Figure 2.1 :** Caractéristiques électriques et schéma électrique équivalent d'une cellule et sa membrane

Cette sphère multicouche peut à son tour être ramenée à une sphère uniforme de permittivité équivalente (Jones, 1995):

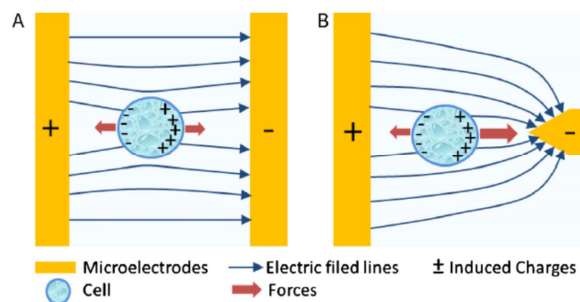
$$\epsilon_c^* = \epsilon_{me}^* \frac{\left( \frac{R_c}{R_c - e} \right)^3 + 2 \left( \frac{\epsilon_{cy}^* - \epsilon_{me}^*}{\epsilon_{cy}^* + 2\epsilon_{me}^*} \right)}{\left( \frac{R_c}{R_c - e} \right)^3 - \left( \frac{\epsilon_{cy}^* - \epsilon_{me}^*}{\epsilon_{cy}^* + 2\epsilon_{me}^*} \right)} \quad (2.6)$$

Avec 'R<sub>c</sub>' le rayon de la cellule et 'e' l'épaisseur de la membrane (environ 5 nm).

### b. DEP conventionnelle et DEP à ondes progressives :

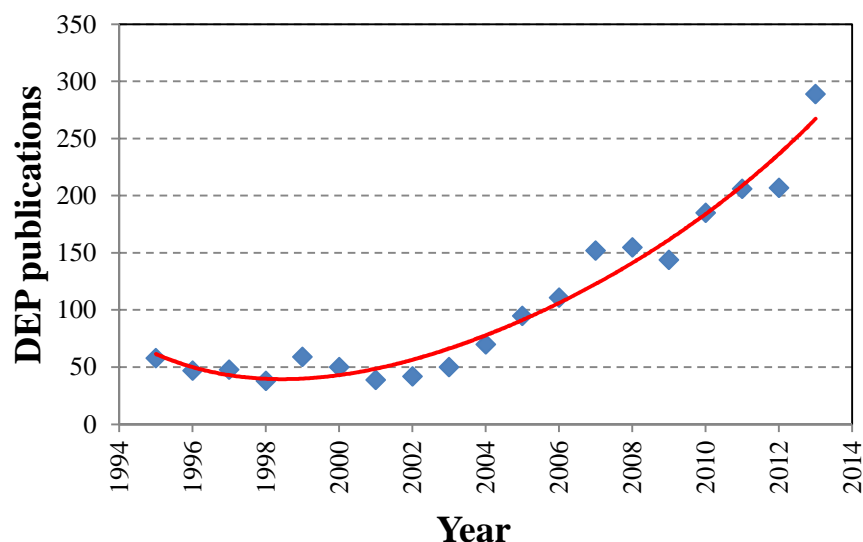
L'exposition d'une particule diélectrique (comme une cellule) à un champ électrique conduit à sa polarisation. Cette dernière se comporte alors comme un doublet électrostatique

soumis à deux forces de Coulomb opposées. Lorsque le champ électrique est uniforme, ces forces s'annulent (figure 2.2.a). Dans le cas d'un champ électrique non uniforme (gradient de champ), ces dernières ne se compensent pas et l'objet polarisé est soumis à une force globale non nulle. Cette force, appelée diélectrophorèse (DEP), entraîne alors la particule (figure 2.2.b). Cette dernière peut donc être attirée par les zones de fort/faible champ électrique, dépendamment de la polarisabilité de la particule en comparaison de celle du milieu de suspension. La direction de la force de DEP dépend de la fréquence du signal appliqué, de la géométrie de la particule et des caractéristiques diélectriques de la particule et du milieu externe.



**Figure 2.2 :** Réponse d'une particule polarisable (cas d'une particule conductrice) à un champ uniforme (a) ou non uniforme (b). En considérant que la particule est plus polarisable que le milieu de suspension, plus de charges sont induites à l'intérieur de la particule et les lignes de champ sont courbées vers la surface de cette dernière. Sous un champ électrique non-uniforme, la particule est soumise à une force globale non-nulle et poussée vers la zone de fort champ (Khoshmanesh et *al.* 2011).

Introduit par Pohl dans les années 50, le terme 'diélectrophorèse', dérivé du Grec *Phorein* (transporter), traduit le fait de transporter des particules grâce à leurs propriétés diélectriques. En effet, contrairement à l'électrophorèse, qui dépend du ratio charge/taille des particules, la DEP dépend de leurs propriétés diélectriques offrant la possibilité de manipuler sélectivement et avec précision des bioparticules non chargées. La principale difficulté étant de pouvoir créer un champ électrique non uniforme en délivrant de faibles tensions, l'utilisation de la DEP a connu un réel succès depuis le milieu des années 2000 (figure 2.3), et ce grâce à la démocratisation des micro-dispositifs. Avec la réduction des dimensions et la possibilité de modification des géométries d'électrodes procurées par les procédés de microtechnologie, il est maintenant très facile de créer de forts champs non-uniformes à partir de tensions faibles (inférieures à 10 ou 20 V).



**Figure 2.3 :** Nombre de publications sur la DEP depuis 1995 sur la base de données ScienceDirect.  
(L'estimation pour l'année 2013 est basée sur 181 papiers au 11 Août).

Les publications prises en compte dans la figure 2.3 ne concernent que celles référencées dans la base de donnée ScienceDirect mais le nombre est en réalité encore plus élevé (Pethig 2010). Ces articles traitent des différents aspects théoriques de la DEP et du développement technologique autour, mais surtout des applications nombreuses qui en sont faites, en particulier depuis 2010. Ces dernières sont souvent orientées vers les biocapteurs, le diagnostic médical, thérapie cellulaire, la microfluidique, les nanoassemblages ou encore le filtrage. Parmi les principales applications de la DEP :

- Transport, concentration, séparation et caractérisation de bioparticules de différents types cellulaires (Frenea et *al.* 2004, Salomon et *al.* 2011, Velugotla et *al.* 2012, Gascoyne et *al.* 2009, Alshareef et *al.* 2013), de cellules tumorales circulantes (Shim et *al.* 2013), séparation de cellules vivantes et mortes (Patel et *al.* 2012) mais aussi de bactéries (Lapizco-Encinas et *al.* 2005, Bisceglia et *al.* 2013), virus (Morgan et *al.* 1999), et de composants subcellulaires comme l'ADN (Regtmeier et *al.* 2007) et de protéines (Holzel et *al.* 2005)
- Lyse cellulaire (Ramadan et *al.* 2006, Clow et *al.* 2010) et électroporation/electrofusion (Mottet et *al.* 2010)
- Etude de la réponse cellulaire à certaines molécules ou autres stimuli (Labeed et *al.* 2003)
- Assemblage de nanotubes de carbone ou de nanofils de silicium (Salomon 2011, Seichepine et *al.* 2012)

La moyenne de la force de DEP appliquée sur une particule *sphérique* s'exprime comme suit (Morgan et Green 2003, Pethig et *al.* 2003) :

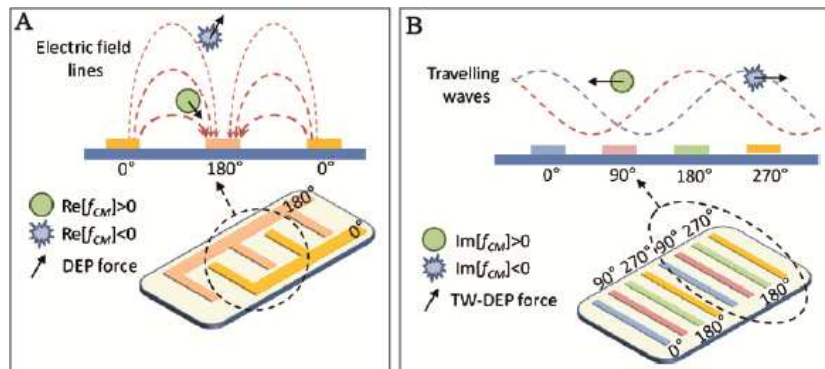
$$\langle F \rangle = \underbrace{2\pi R_{Cell}^3 \epsilon_0 \epsilon_m \Re[K_{CM}]}_{\langle F_{DEP} \rangle} \nabla E_{RMS}^2 + \underbrace{4\pi R_{Cell}^3 \epsilon_0 \epsilon_m \Im[K_{CM}]}_{\langle F_{TW-DEP} \rangle} \sum_{x,y,z} E_{RMS}^2 \nabla \phi \quad (2.7)$$

avec  $R_{Cell}$  le rayon de la particule,  $E_{RMS}$  et  $\phi$  respectivement la valeur efficace et la composante en phase du champ électrique appliqué (RMS pour *Root-Mean-Square*),  $\epsilon_m$  la permittivité relative du milieu de suspension et  $K_{CM}$  le facteur complexe de Clausius-Mossotti. C'est ce dernier coefficient qui décrit la polarisabilité relative de la particule en comparaison du milieu de suspension. Il dépend des caractéristiques (di)électriques et géométriques de la particule mais aussi de la fréquence appliquée. Dans le cas d'une particule sphérique, le coefficient de Clausius-Mossotti s'exprime comme suit:

$$K_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2.8)$$

où  $\epsilon_x^*$ , comme introduit dans la section II.1.1.a, correspond à la permittivité complexe de l'élément  $x$  ('p' pour particule et 'm' pour milieu de suspension). Il est important de noter que dans le cas d'une cellule, ce paramètre correspond à la permittivité équivalente de la cellule dans son ensemble (équation 2.6).

L'équation (2.7) se compose de 2 termes contribuant à la force de DEP. Le premier terme, connu sous le nom de *DEP conventionnelle*, est proportionnel à la partie réelle du coefficient de Clausius-Mossotti ( $\Re[K_{CM}]$ ) ainsi qu'à la non-uniformité spatiale de  $E$ , lorsqu'il forme des ondes stationnaires. Cette force dirige les particules vers les maxima de champ dans le cas où  $\Re[K_{CM}] > 0$  (on parle alors de DEP positive ou pDEP) et vers les minim dans le cas contraire (DEP négative ou nDEP) (exemple en figure 2.4.A).



**Figure 2.4 :** La non-uniformité spatiale du champ électrique produit une DEP conventionnelle (A) alors qu'une non-uniformité de phase crée une DEP à onde progressive ou TW-DEP (B) (Khoshmanesh et *al.* 2011).

- DEP à ondes progressives :

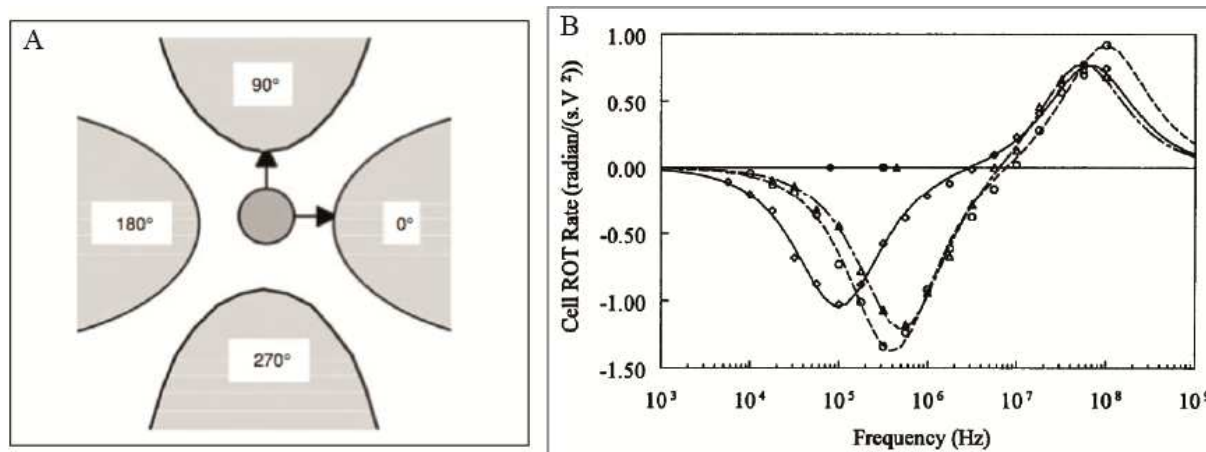
Le second terme de l'équation (2.7), connu sous le terme *DEP à onde progressive* (ou *Travelling Wave*) est proportionnel à la partie imaginaire de  $K_{CM}$  ainsi qu'à la non-uniformité spatiale de la phase de  $E$  (ondes progressives). Cette force transporte les cellules dans la direction de propagation (ou le sens opposé) en fonction du signe de la partie imaginaire du coefficient de Clausius-Mossotti ( $\text{Im}[K_{CM}]$ ). Par exemple, quand cette dernière est positive, les particules sont attirées vers les phases les plus basses (de  $90^\circ$  à  $0^\circ$ , sens appelé « co-field TW ») et inversement si  $\text{Im}[K_{CM}] < 0$  (« anti-field TW » pour un mouvement vers les phases supérieures) (exemple en figure 2.4.B) (Gascoyne et Vykoukal 2004).

- Electrorotation (ROT) et multi-cell-rotation (MCR) :

Lorsque l'onde progressive est linéaire, elle entraîne un mouvement en translation de la particule (figure 2.4.B). Dans le cas où le champ électrique est tournant, la particule est entraînée dans un mouvement rotatif (figure 2.5) car le dipôle induit tente de s'aligner sur la rotation du champ appliqué. Le moment de rotation induit est contrebalancé par le moment de frottements dû à la viscosité ' $\eta$ ' du milieu de suspension ( $8\pi R^3_{\text{Cell}} \eta \Omega$ ). Ainsi, la vitesse de rotation de la particule s'écrit comme suit (Arnold et Zimmermann 1988):

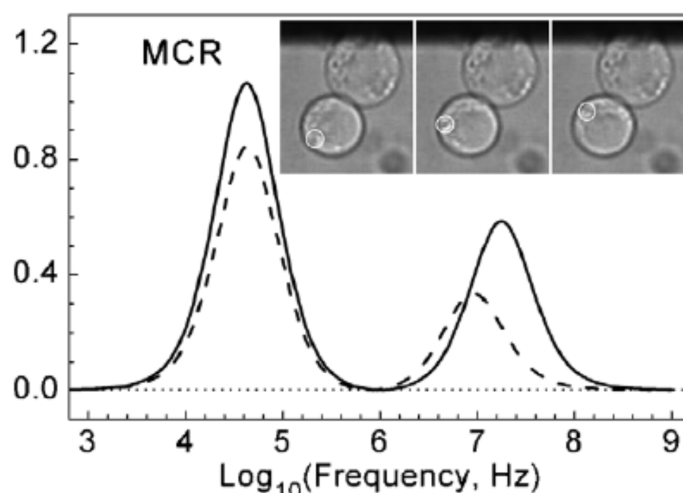
$$\Omega_{ROT} = -\frac{\epsilon_0 \epsilon_m E^2}{2\eta} \Im[K_{CM}(\omega)] \quad (2.9)$$

Le spectre de la partie imaginaire de  $K_{CM}$  est obtenu en mesurant la vitesse de rotation des particules à différentes fréquences (figure 2.5.B). Il est ensuite possible d'extraire les paramètres électriques des cellules (Laforêt-Ast 2009, Trainito 2012) permettant par exemple de prévoir leur comportement diélectrophorétique. L'électrorotation est un outil pouvant donc être utilisé en amont d'une expérience de séparation de différents types cellulaires (Arnold et Zimmermann 1988, Sukhorukov et al. 2006, Becker et al. 1995, Gimsa et al. 1991, Yang et al. 1999).



**Figure 2.5 :** Principe de l'électrorotation. A. Cellule dans une structure classique d'électrodes quadripolaires (Jones 2003). B. Spectre d'électrorotation (Becker et al. 1995)

Il arrive que les deux types de mouvement soient combinés (DEP et rotation) dans un phénomène appelé multi-cell Rotation (MCR). Ceci peut arriver lors d'une expérience de DEP à l'aide d'un champ électrique stationnaire pour créer une chaîne de cellules (*pearl chain*). Un désalignement de la chaîne par rapport aux lignes de champ peut entraîner la rotation de la cellule non-alignée (figure 2.6). Dans ce cas, chaque cellule est soumise à un champ net local ayant une composante rotative due à la superposition du champ imposé et un champ secondaire généré par le dipôle constitué par la cellule voisine (Mahaworasilpa et al. 1996).



**Figure 2.6 :** Spectre théorique de MCR calculé à partir de caractéristiques déterminées par électrorotation (Sukhorukov et al. 2006)

La présence de cette rotation peut être problématique dans le cadre de l'électrofusion car les cellules doivent être stables durant la fusion. Néanmoins, durant nos expériences d'électrofusion, nous avons remarqué que, lorsqu'elle apparaissait, la rotation cessait à l'application de l'impulsion de perméabilisation. Nous pensons que le tressaillement de la

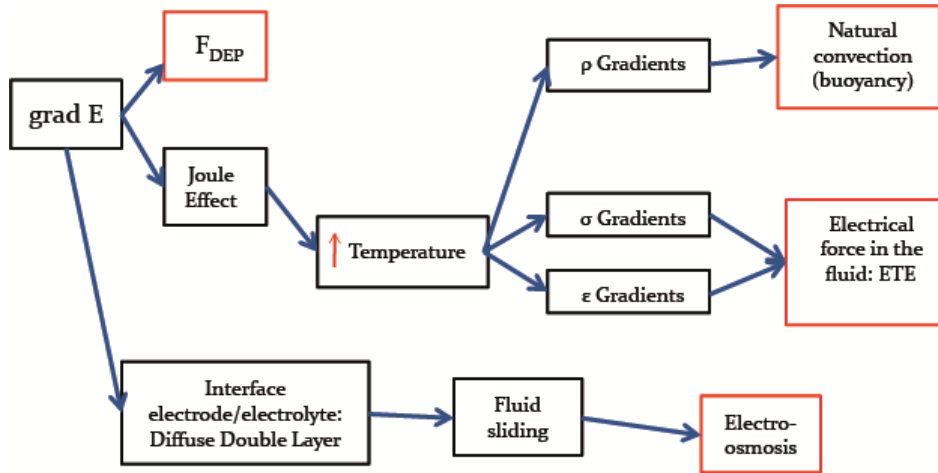
cellule, provoqué par l'impulsion, la replace dans l'alignement. Nous pouvons ajouter à cela la variation des caractéristiques électriques de la cellule suite à la perméabilisation (plus amplement détaillée dans le chapitre 4) et une forte adhésion entre les cellules (suite à la déstabilisation de la couche hydrique structurée entre les membranes). Toutes ces modifications pourraient expliquer la disparition du phénomène de MCR suite à l'application d'impulsions électriques sur des cellules.

Certains biologistes sont parfois réticents quant à l'utilisation d'un champ électrique AC sur les cellules. Il a pourtant déjà été prouvé, à plusieurs reprises, que la force de DEP, pour peu qu'elle soit inférieure à un certain seuil, n'affectait en rien la viabilité des cellules, même sous une application prolongée (Gray et *al.* 2004). C'est pour cela que la DEP est de nos jours autant utilisée sur cellules biologiques pour des applications biomédicales. Néanmoins, lors de l'application d'un champ électrique AC sur une cellule, la DEP n'est pas la seule force qui influence le mouvement de cette dernière.

### **II.1.2. Evaluation des forces mises en jeu :**

Nous venons de voir qu'il était possible de déplacer des particules par diélectrophorèse en appliquant un champ électrique non-uniforme. Néanmoins, plusieurs autres phénomènes découlent de l'application d'un champ électrique. Dans cette partie, nous allons lister la plupart des forces mises en jeu qui pourraient avoir un impact sur le déplacement des particules (figure 2.7). Afin de dresser un bilan, nous nous sommes basés sur les travaux décrits dans la littérature (Ramos et *al.* 1998, Ramos et *al.* 1999, Castellanos et *al.* 2003). Certains rappels sur le développement des formules sont présentés en annexe 3.

Appliquées à un cas simple, certaines approximations permettent d'exprimer les formules plus simplement et de les calculer sous Matlab©. D'autre part, les équations non approximées sont implémentées sous Comsol© (calcul par éléments finis) afin de calculer les forces plus précisément. Les deux résultats sont ensuite comparés afin de valider les approximations effectuées. Enfin, le même calcul numérique est utilisé pour analyser le comportement électrothermique d'une structure plus complexe.



**Figure 2.7 :** Diagramme récapitulatif des forces induites par application d'une tension  $V$  sur une particule. Ces forces s'ajoutent aux forces toujours présentes (Gravité et mouvement Brownien)

a. Définition des forces mises en jeu :

- Forces toujours présentes :

La particule plongée dans le milieu de suspension sédimente sous l'effet de la gravité. D'autre part, l'agitation thermique des molécules du milieu induit un mouvement non déterministe de la particule appelé mouvement Brownien. Nous verrons que dans certains cas, ces deux types de déplacement ne sont pas négligeables.

- Force électrique directe : DiElectroPhorèse (DEP)

Nous n'utiliserons la force de DEP qu'en ondes stationnaires. La moyenne de cette force électrique peut alors s'exprimer comme suit :

$$\langle F_{DEP}(t) \rangle = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m R_p^3 \Re[K_{CM}(\omega)] \nabla E^2 \quad (2.10)$$

- Forces électriques indirectes : forces ElectroHydroDynamiques (EHD)

L'application d'un champ électrique entre deux électrodes plongées dans un fluide provoque indirectement des mouvements de fluide entraînant les particules. Les forces résultantes sont regroupées sous l'acronyme EHD

- **Forces électrothermiques (ETE pour *Electro Thermal Effect*)**

L'application d'un champ électrique  $E$  dans un milieu de conductivité électrique  $\sigma$  provoque un échauffement dû à l'effet Joule. La puissance ainsi générée par unité de volume vaut  $\sigma E^2$ . Pour évaluer la variation de température qui en découle, l'équation simplifiée de bilan d'énergie doit être résolue (annexe 3):

$$k \cdot \nabla^2 T + \sigma \cdot E^2 = 0 \quad (2.11)$$



L'élévation de température entraîne des variations locales de conductivité, de permittivité et de masse volumique du milieu ; ces inhomogénéités créent ensuite des forces dans le fluide. Les deux premiers gradients donnent lieu à des charges libres dans le volume, donc : à une force Coulombienne pour les variations de conductivité, et une force diélectrique pour les variations de permittivité ; ce sont les forces électrothermiques (Ramos et *al.* 1998):

$$\langle \vec{f}_E \rangle = -\frac{1}{2} \left[ \left( \frac{\vec{\nabla} \sigma}{\sigma} - \frac{\vec{\nabla} \epsilon}{\epsilon} \right) \cdot \vec{E} \frac{\epsilon \vec{E}}{1 + (\omega\tau)^2} + \frac{1}{2} |E|^2 \vec{\nabla} \epsilon \right] \quad (2.12)$$

Force de Coulomb

Force diélectrique

#### - Convection naturelle (Buoyancy)

L'élévation de température induit un gradient de densité volumique dans le fluide donnant lieu à de la convection naturelle (buoyancy ou *flottabilité*). En effet, au contact d'un endroit plus « chaud » la masse volumique diminue et les particules plus légères remontent, alors qu'au contact d'une température plus faible la masse volumique augmente, ce qui entraîne les particules vers le bas. Ainsi une force de Buoyancy, dépendant du gradient de densité volumique et de la gravité, crée des lignes de flux dans le volume.

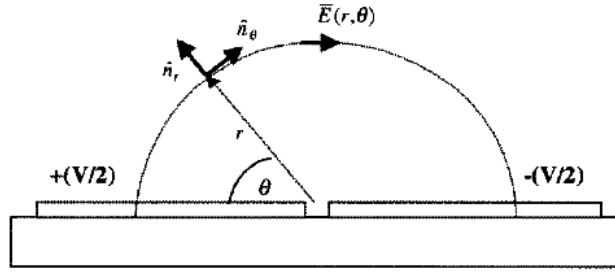
#### - Electro-osmose (ACEO)

Lors de la polarisation d'électrodes plongées dans un électrolyte, des charges apparaissent à l'interface électrode-électrolyte changeant la densité de charge. Le déplacement des charges sous l'influence de la composante tangentielle du champ électrique entraîne les particules de fluide. Ce phénomène est appelé électro-osmose (notée ACEO dans le reste du manuscrit pour *Alternative Current Electro-Osmosis*).

#### b. Bilan des forces avec approximations :

Afin d'évaluer l'influence de ces forces, il est nécessaire de simplifier les expressions analytiques dépendant du gradient de champ électrique. Pour cela, Ramos et *al.* se sont placés dans le cas d'électrodes coplanaires infiniment proches (25  $\mu\text{m}$  de gap). Les lignes de champ électrique suivent alors une trajectoire circulaire (figure 2.8). Le champ électrique étant tangent à ces lignes, il s'exprime comme suit :

$$\vec{E}(r) = \frac{V}{\pi r} \vec{u}_\theta \quad (\text{Zahn 1979}).$$



**Figure 2.8** : Diagramme schématique (gauche) et représentation simplifiée idéale (droite) d'électrodes coplanaires et du champ électrique associé (Ramos et *al.* 1998)

Il devient alors possible d'exprimer les déplacements dus au gradient de champ en fonction du potentiel appliqué. Le tableau 2.1.a dresse un récapitulatif de ces effets selon les équipes de Ramos et Castellanos. Le tableau 2.1.b indique les notations utilisées.

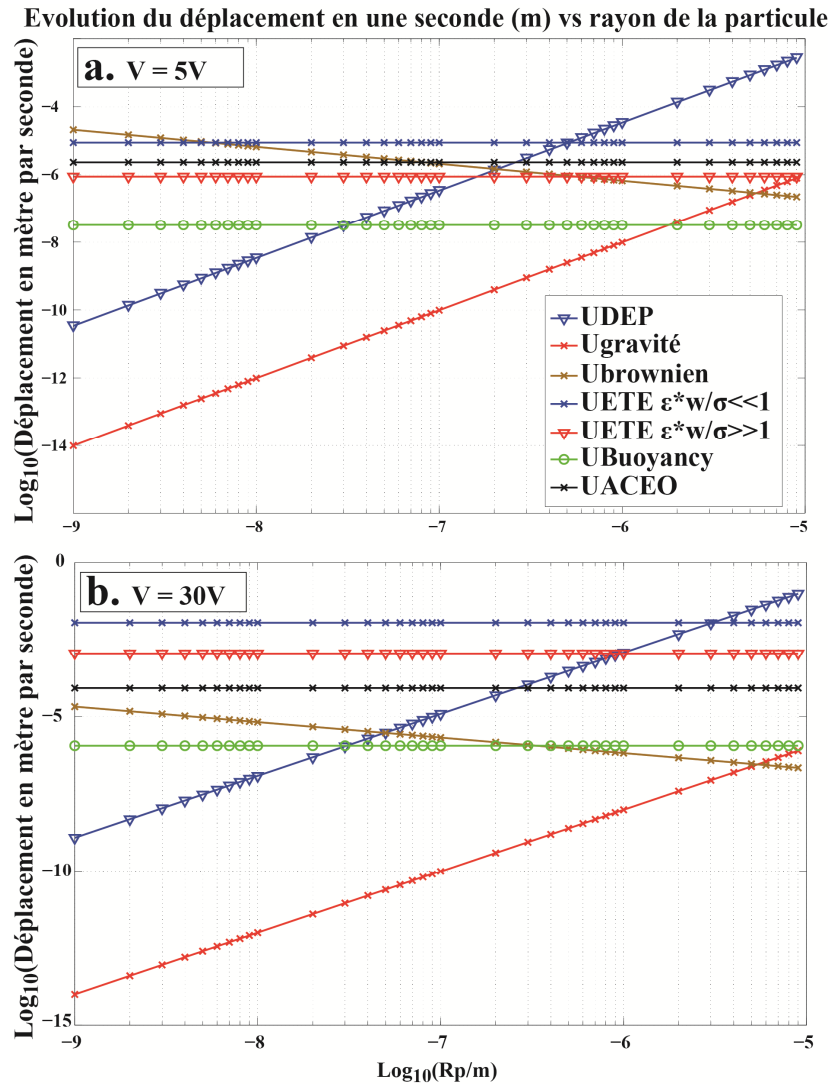
**Tableau 2.1.a** : Récapitulatif des différentes forces mises en jeu (en tenant compte de la chute de potentiel dans la couche de Stern) lors de l'application d'un champ électrique AC sur une particule sphérique

Force	Expression du déplacement par seconde (U)
Gravité	$U_g = 0,001 \frac{R_p^2 \rho_m}{\eta} g$
Mouvement Brownien	$ \Delta \bar{x}  = \sqrt{\frac{k_B T \cdot t}{2\pi\eta \cdot R_p}}$
Diélectrophorèse	$U_{DEP} = \frac{2\varepsilon_0 \varepsilon_m R_p^2 \cdot \Re e(K_{CM}) (cV)^2}{3\pi^2 \eta \cdot r^3}$
Electrothermie (ETE) quand $\omega\varepsilon/\sigma \ll 1$	$U_{ETE} \approx 5 \times 10^{-4} \frac{\varepsilon \sigma (cV)^4}{k\eta r} \left( \left  \frac{\partial \sigma}{\partial T} \right  \right)$
Electrothermie (ETE) quand $\omega\varepsilon/\sigma \gg 1$	$U_{ETE} \approx 2,5 \times 10^{-4} \frac{\varepsilon \sigma (cV)^4}{k\eta r} \left( \left  \frac{\partial \varepsilon}{\partial T} \right  \right)$
Convection naturelle (Buoyancy)	$U_B \approx 2 \times 10^{-2} \left( \frac{\partial \rho_m}{\partial T} \right) \frac{\sigma (cV)^2 g \cdot r^2}{k\eta}$
Electro-Osmose	$U_{ACEO} = 0,1 \cdot \Lambda \frac{\varepsilon (cV)^2}{\eta \cdot r} \frac{\Omega^2}{(1 + \Omega^2)^2}$

**Tableau 2.1.b :** Définition des notations utilisées dans le tableau 2.1.a

Symbole	Quantité	Symbole	Quantité
g	gravité	$R_p$	Rayon de la particule
$\rho_m$	Masse volumique du milieu	V	Tension appliquée
$\eta$	Viscosité du milieu	$\epsilon$	Permittivité du milieu
$k_B$	Constante de Boltzman	$\sigma$	Conductivité du milieu
T	Température	k	Conductivité thermique du milieu
t	Temps	$K_{CM}$	Coefficient de Clausius-Mossotti
c	Coefficient de chute de potentiel dans la couche de Stern $c = \frac{\Omega}{\sqrt{1 + \Omega^2}}$	$\Omega$	Fréquence sans dimension $\Omega = \Lambda \frac{\omega \epsilon \pi \cdot r}{2\sigma \lambda_D}$
$\Lambda$	$\Lambda = \frac{C_s}{C_s + C_d}$	Cd	Capacitance de la double couche diffuse
$\lambda_D$	Longueur de Debye	Cs	Capacitance de la couche de Stern (couche compacte)

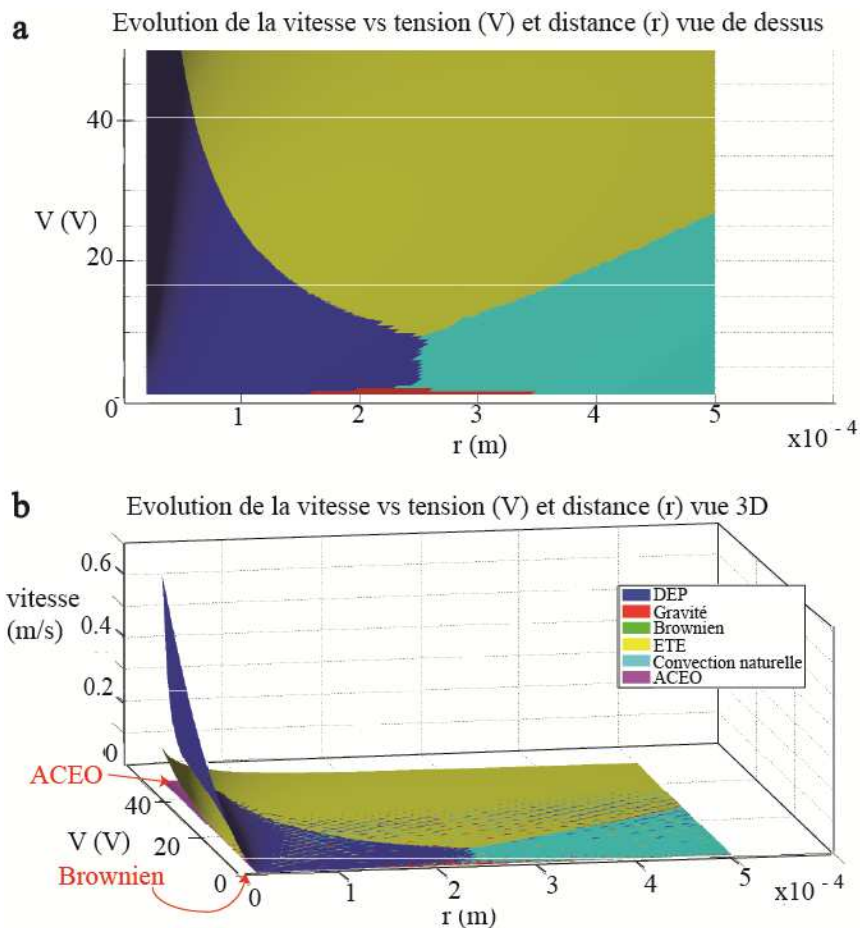
En observant les équations des forces concernées, il apparait qu'en tout, 4 paramètres variables entrent en jeu : la taille de la particule ( $R_p$ ), la tension appliquée 'V' (et à fortiori la température induite 'T', figure 2.7), la fréquence appliquée 'f' et enfin la distance du centre du gap inter-électrodes 'r'. Nous avons donc étudié l'influence de chacun de ces paramètres sur l'ensemble des forces résumées dans le tableau 2.1 à l'aide de Matlab©. Le premier paramètre à analyser est la taille de la particule (figure 2.9.a). Nous pouvons par exemple confirmer que le mouvement Brownien n'a de réel impact que pour les particules submicroniques (voire en-dessous de la centaine de nanomètres). D'autant plus que pour ces particules, la DEP et la gravité sont faibles. Contrairement aux « grosses » particules dépassant la dizaine de microns (comme dans le cas des cellules) où la DEP semble dominer, même en n'appliquant que 5 V. De plus, l'augmentation de la tension appliquée rehausse le niveau de DEP. Néanmoins, ceci augmente aussi le niveau des forces hydrodynamiques, en particulier les forces thermiques car ces dernières sont en puissance 4 de V (figure 2.9.b pour V = 30V). Afin de décorrélérer l'effet de la tension et celui de la taille de la particule, nous avons ensuite évalué les forces dans le cas de  $R_p = 10 \mu m$  (cas d'une cellule dans le milieu de fusion détaillé dans le chapitre 4).



**Figure 2.9 :** Influence du rayon de la particule sur les forces mises en jeu, sous l'application d'une tension  $V = 5$  V (a) et 30 V ( $f = 300$  kHz,  $Re[K_{CM}] = 1$ ).

En appliquant donc les formules du tableau 2.1.a à la fréquence de 300 kHz,  $\sigma = 0,03$  S/m, sur une particule de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre et en considérant un coefficient de Clausius-Mossotti égal à 1 (cas le plus favorable), on obtient les courbes de la figures 2.10 (déplacements calculés pour une tension 'V' entre 1 et 50V et à une distance 'r' entre 20 et 500 $\mu\text{m}$  du centre du gap inter électrodes). Sur la figure 2.10 nous pouvons observer qu'à 300kHz, la convection naturelle, le mouvement Brownien et l'ACEO n'ont pas d'influence sur les particules de ce diamètre (elles n'apparaissent pas sur la vue de dessus (a) car leur intensité est toujours plus faible que les autres forces (b)). Nous constatons aussi que la DEP est très importante quand r est faible (et augmente avec la tension) mais à partir d'une certaine distance r, même en augmentant la tension, la DEP reste dominée par une des autres forces.

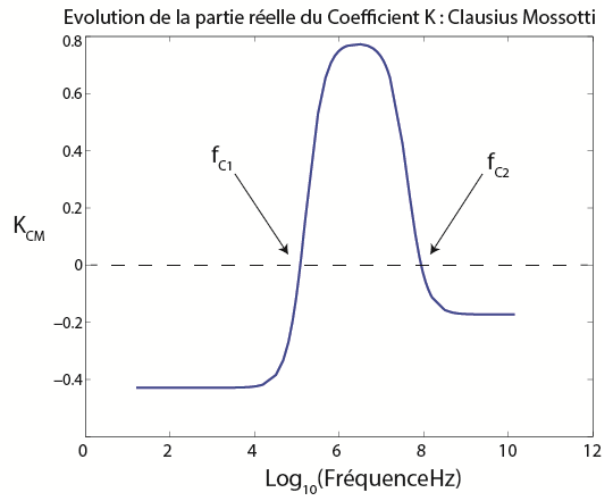
Sur la figure 2.10.a l'ombre des surfaces colorées représente l'amplitude des déplacements (et donc des forces associées). Nous pouvons déjà en conclure que pour manipuler des cellules par DEP, elles devaient rester proches des électrodes (à une distance inférieure à  $200\mu\text{m}$ ) car au-delà, les phénomènes thermiques prennent trop d'ampleur. En effet, la convection naturelle par exemple qui était considérée négligeable devient relativement importante dès lors qu'on s'éloigne des électrodes, même sous tensions basses. Nous avons pu confirmer ce phénomène sur des structures non scellées (dépôt d'une goutte contenant des cellules entre deux électrodes) ; les cellules du dessus de la goutte tournoyaient rapidement. Ce phénomène était accentué par des tensions plus élevées. Ces calculs et expériences confirment l'importance de la fermeture des structures lors des expériences de DEP obligeant les particules à rester proche des électrodes.



**Figure 2.10 :** Etude de l'influence de la tension appliquée 'V' et de la distance 'r' sur les forces mises en jeu (cas d'une particule de  $20\mu\text{m}$  de diamètre,  $\sigma = 0,03\text{ S/m}$ ,  $f = 300\text{ kHz}$  et  $\text{Re}[K_{\text{CM}}] = 1$ )

Néanmoins, ces derniers calculs ne sont valables que pour une fréquence de  $300\text{ kHz}$  et pour un facteur  $K_{\text{CM}}$  idéalisé à 1. Afin d'analyser l'effet de la fréquence, nous avons inclus ce paramètre dans le calcul, en tenant compte, entre autres choses, de la variation de la partie

réelle de  $K_{CM}$  en fonction de la fréquence (figure 2.11). Les figures qui en découlent sont présentées en figure 2.12 (pour des distances  $r = 25$  et  $200 \mu\text{m}$  et des tensions  $V = 5$  et  $30 \text{ V}$ ).

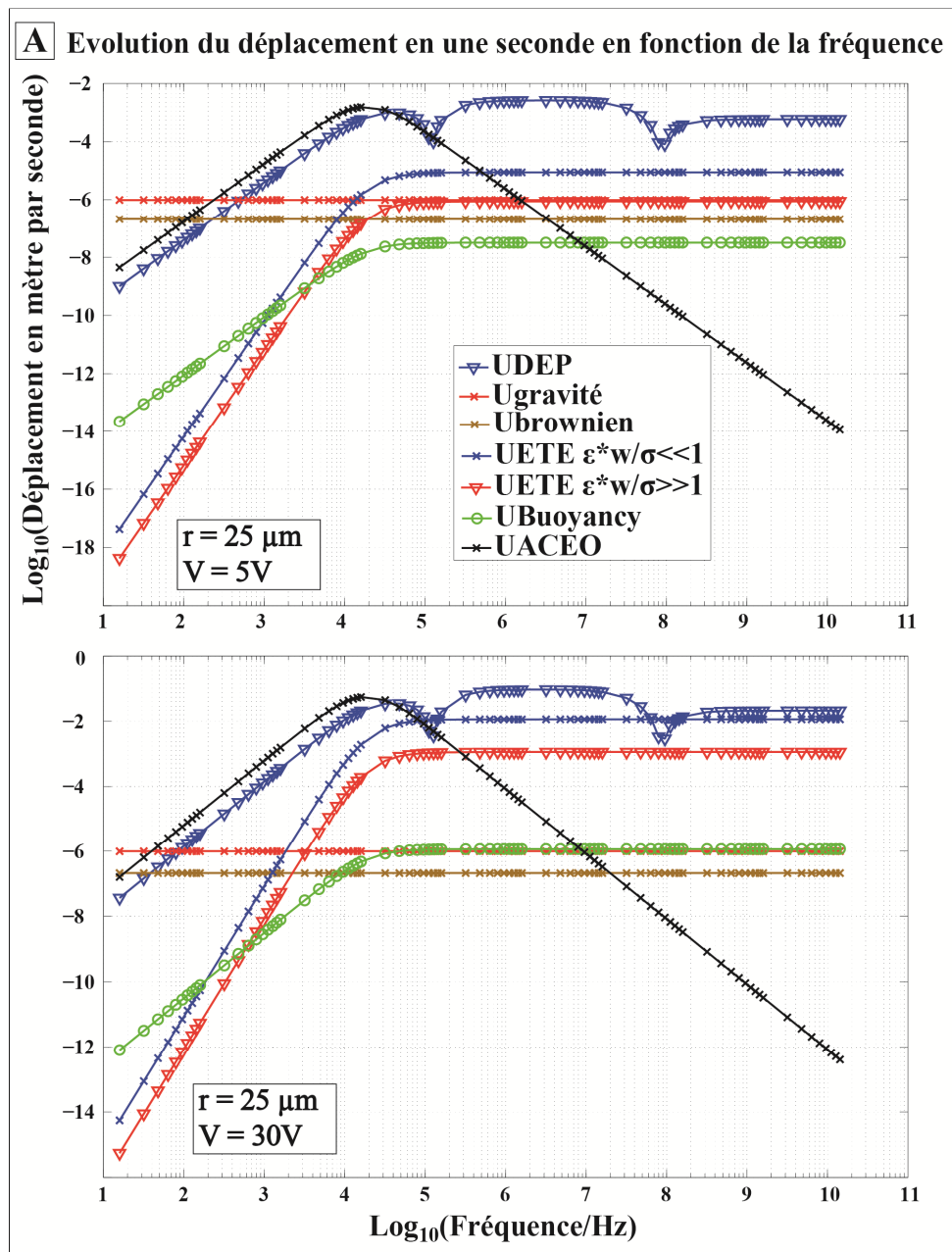


**Figure 2.11 :** Evolution de la partie réelle du coefficient de Clausius-Mossotti pour une particule de  $20 \mu\text{m}$  de diamètre dans un milieu de conductivité  $\sigma = 0.03 \text{ S/m}$ , single shell model.

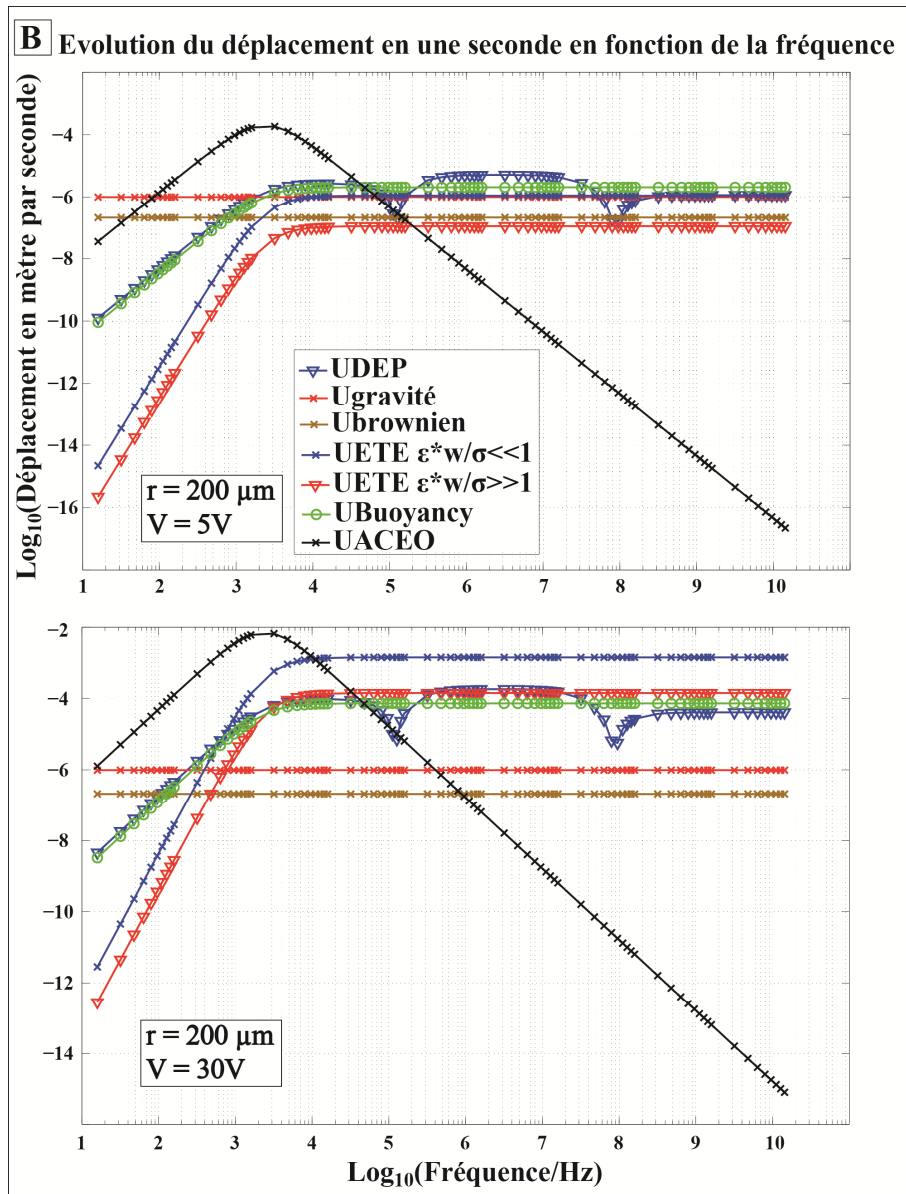
Ne nous intéressant qu'à l'intensité des forces, nous avons représenté la valeur absolue de ces dernières ce qui explique les 2 pics sur la courbe de DEP qui représentent les deux fréquences de coupure induites par  $\text{Re}[K_{CM}]$  ( $f_{c1}$  et  $f_{c2}$ ). De plus, les deux types de forces ETE sont représentés séparément (force coulombienne en x bleus et force diélectrique en triangles rouges). Cependant, il est important de noter que la force Coulombienne prédomine pour des fréquences inférieures à la fréquence de transition (20 MHz dans le cas du milieu de fusion choisi) alors que la force diélectrique prend le pas aux fréquences supérieures. Connaissant les fréquences de travail, nous ne considérerons donc que la force Coulombienne (x bleus).

D'une part, les courbes de la figure 2.12 confirment les résultats présentés en figure 2.10 tout en apportant une vision fréquentielle du problème, importante dans le cas de l'ACEO. Nous constatons que cette dernière contribution est une force agissant aux basses fréquences. En effet, il n'y a qu'à très basse fréquence que l'électro-osmose a un impact (en compétition avec la DEP en étant proche des électrodes et même supérieure à celle-ci quand on s'en éloigne). Ces résultats concordent avec les travaux de la littérature indiquant que l'ACEO diminue drastiquement au-delà de 1,5 kHz (Canpolat et *al.* 2013, Yalcin et *al.* 2011, Squires et *al.* 2004) et dans le cas de faibles conductivités (Castellanos et *al.* 2003). De plus, la force semble fortement surestimée par les calculs en comparaison des mesures réelles (vitesses mesurées 40 fois inférieures au calcul) (Canpolat et *al.* 2013). En conclusion, l'ACEO/ICEO est une force très utilisée pour la manipulation de particules à très basse fréquence mais n'a probablement pas d'impact dans notre gamme de fréquences de travail

[100 kHz – 2 MHz]. Quant aux forces hydrodynamiques, elles dépendent toutes de la fréquence et atteignent un maximum à partir de quelques kHz. Néanmoins, elles ne se comparent à la DEP qu'en s'éloignant des électrodes et/ou en augmentant fortement la tension appliquée. Dans les bonnes conditions, ces forces peuvent être utilisées pour des mélanges, très difficiles en environnement microfluidique (Feng *et al.* 2007, Sigurdson *et al.* 2005) ou encore pour l'évacuation de particules d'une structure (Hoettges *et al.* 2003).



**Figure 2.12.A :** Etude de l'influence de la fréquence combinée à celle de la tension appliquée  $V$  et de la distance  $r$  du centre de l'espace interélectrodes (figure 2.8),  $r = 25 \mu\text{m}$ .



**Figure 2.12.B :** Etude de l'influence de la fréquence combinée à celle de la tension appliquée  $V$  et de la distance  $r$  du centre de l'espace interélectrodes (figure 2.8),  $r = 200 \mu\text{m}$ .

Il est à noter que ce modèle n'est pas forcément correct quand on augmente la distance inter-électrodes car les formules précédentes sont valables pour des lignes de champ circulaires (gap inter-électrode petit). Or, dans le cas où le gap n'est pas infiniment petit devant la taille des électrodes ou encore quand la géométrie du microsystème est plus complexe (eg. présence d'isolants pour la focalisation du champ), la forme du champ électrique est différente, ainsi que la distribution de température, impliquant des forces électrothermiques différentes.

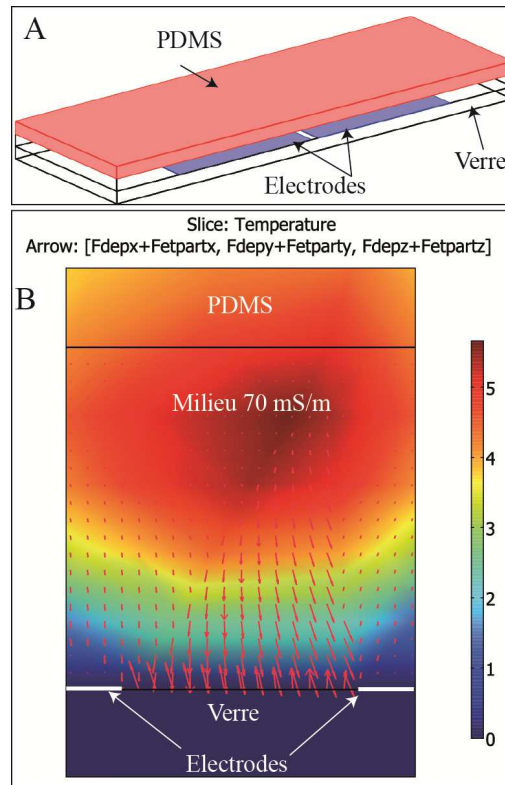


Afin de prévoir le déplacement des particules dans un cas simple d'électrodes coplanaires espacées, il faudrait résoudre les équations de bilan thermique et de force électrothermique en utilisant une autre formule analytique du champ électrique. On pourrait par exemple utiliser la formule calculée par Demierre et *al.* 2007 à l'aide de transformées d'espace. Cependant, même dans un cas simple d'électrodes coplanaires, ce type de résolution est lourd. D'autre part, la résolution par transformée conforme ne s'applique pas aux structures comprenant des matériaux différents (isolants et conducteurs) dans des configurations non classiques. L'autre possibilité est de passer par un calcul numérique sous Comsol© pour faire une simulation couplée du champ électrique et de la température puis en déduire les vecteurs de force en tout point pour avoir une meilleure idée de la trajectoire d'une cellule dans une géométrie donnée. De plus, la résolution numérique présente la souplesse nécessaire à la modélisation de structures complexes.

### *c. Calculs par éléments finis : sans approximations*

Dans cette partie nous proposons de confronter les estimations issues des modèles analytiques approchés décrits ci-dessus aux calculs numériques par éléments finis. Pour cela, nous nous plaçons dans les mêmes conditions que la partie II.1.2 et II.1.3.a. Nous avons modélisé sous Comsol© (en 3 D) des électrodes planaires immergées dans un liquide. Les équations (2.10) et (2.12) ont été intégrées au calcul ainsi qu'un couplage des simulations électrique, thermique (eq. 2.11) et milieu conducteur afin de modéliser l'augmentation de température et les forces électriques et thermiques.

Suite aux premières simulations ne prenant pas en compte l'évacuation de chaleur possible par le capot (en polymère PDMS), nous avons remarqué que les forces thermiques étaient trop importantes. En effet, ces dernières dépassent largement la valeur de DEP, contrairement aux prévisions analytiques.



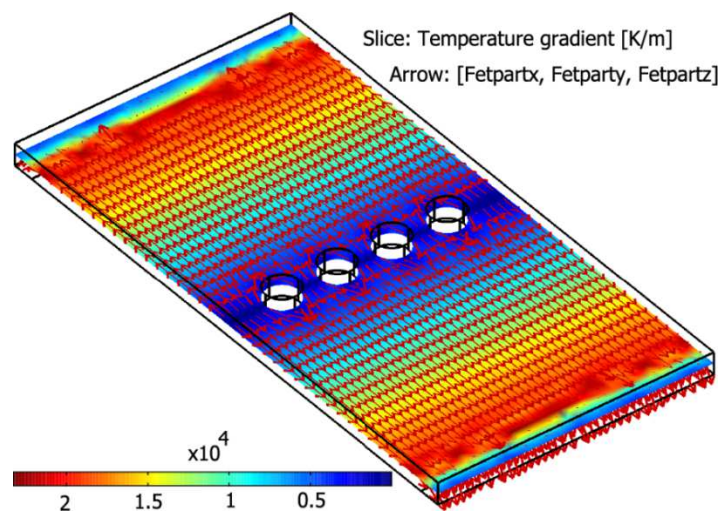
**Figure 2.13 :** Simulation électrothermique électrodes fines.  $d_{\text{électrodes}} = 25 \mu\text{m}$ ,  $V = 20 V_{pp}$ , milieu :  $\sigma_m = 0,07$  S/m,  $k_m = 0,55 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ,  $k_{PDMS} = 0,15 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ,  $k_{Qz} = 400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\text{K}^{-1}$

Cette différence est due à une surestimation de l'élévation de température car l'évacuation à travers le capot n'a pas été prise en compte (Tableau 2.2). Or les expériences en environnement microfluidique impliquent l'utilisation d'un capot, en PDMS par exemple. En ajoutant cette composante (figure 2.13), l'élévation de température est très proche de l'approximation analytique. Cependant, elle reste plus élevée que les mesures expérimentales effectuées par Ramos *et al.* (1998).

**Tableau 2. 2 :** Comparaison des différentes méthodes de calcul de l'augmentation de température dans le cas d'électrodes infiniment proches ( $V = 20 V_{pp}$ ,  $d = 25 \mu\text{m}$ ). Les forces représentent l'ordre de grandeur du point le plus élevé.

$\sigma_m$ (mS/m)	8	30	70
Méthode			
$\Delta T \approx \frac{\sigma \cdot V_{RMS}^2}{k}$ (approximation eq. 2.11)	0,7°	2,7°	6,2°
Comsol (sans PDMS)	1,1°	4,3°	10,2°
Comsol (avec PDMS)	0,6°	2,4°	5,6°
Force électrothermique (N)	10e-10	10e-9	10e-9
Force de DEP (N)	10e-7	10e-7	10e-7
Mesure (Ramos <i>et al.</i> 1998)	0,2°	-----	2°

Le calcul numérique a l'avantage de permettre l'analyse d'une grande variété de structures, en particulier dans certains cas où le modèle analytique serait lourd ou imprécis (développements limités). La figure 2.14 présente par exemple la simulation électrothermique d'une structure intégrant des plots isolants. Sans considérer le capot de PDMS, l'élévation de température (pour  $20 V_{pp}$ ,  $d = 460 \mu m$  et  $\sigma_m = 0,03 S/m$ ) est de  $2,7^\circ$ . Une première simulation incluant un capot en PDMS collé aux plots montre une élévation plus faible ( $2,2^\circ$ ). Néanmoins, cette dernière doit être optimisée pour se rapprocher des conditions expérimentales (espace entre le PDMS et les plots) sans augmenter le temps de calcul à cause du maillage important dans le faible interstice.



**Figure 2.14 :** Simulation électrothermique (sans PDMS) d'une structure incluant des plots isolants ( $460 \mu m$  de distance inter-électrodes,  $20V_{pp}$  appliqués,  $\sigma_m = 0,03 S/m$ ,  $f = 100kHz$ ,  $Re[K_{CM}]=1$ ). Couleurs : gradient de température, flèches : forces électrothermiques. Ces dernières sont dirigées vers les électrodes ; les zones de fort gradient thermique. La DEP (max  $\sim 10e-9$ ) reste supérieure à Fete (max  $\sim 10e-12$ ) près des plots.

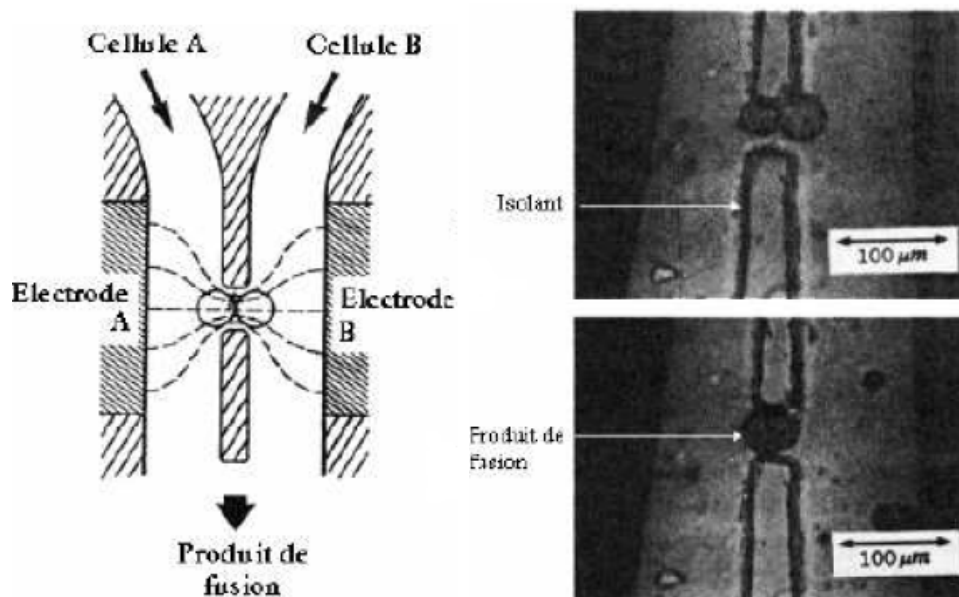
Il est à noter que les mesures de Ramos et *al.* avaient été effectuées à l'aide d'un thermocouple placé  $1 mm$  au-dessus des électrodes sous estimant peut-être l'élévation de température. Nous avons tenté de procéder à des mesures à l'aide d'une caméra thermique mise à disposition à l'IEF. Malheureusement, cette caméra étant adaptée aux matériaux solides, il n'a pas été possible d'évaluer la température du liquide. Certains groupes utilisent un marqueur fluorescent afin de mesurer la température d'un liquide. La Rhodamine présentant une intensité de fluorescence inversement proportionnelle à la température, il est possible de l'utiliser comme thermomètre interne (Seger, 2006). Cependant, la variation de fluorescence de la Rhodamine étant faible ( $1$  à  $5\%$  par  $^\circ C$ ), il paraît difficile, en utilisant cette méthode, d'obtenir des mesures avec une résolution inférieure à  $1^\circ$ .

## II.2. Piégeage et appariement de cellules : optimisation des géométries

Afin de contrôler l'appariement de cellules et d'améliorer la qualité d'électrofusion, différents dispositifs miniaturisés ont été développés durant les 20 dernières années. Ces dispositifs utilisent différentes techniques de piégeage de cellules. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à 3 structures distinctes : 2 structures se basant sur la diélectrophorèse, et l'autre utilisant un piégeage fluïdique.

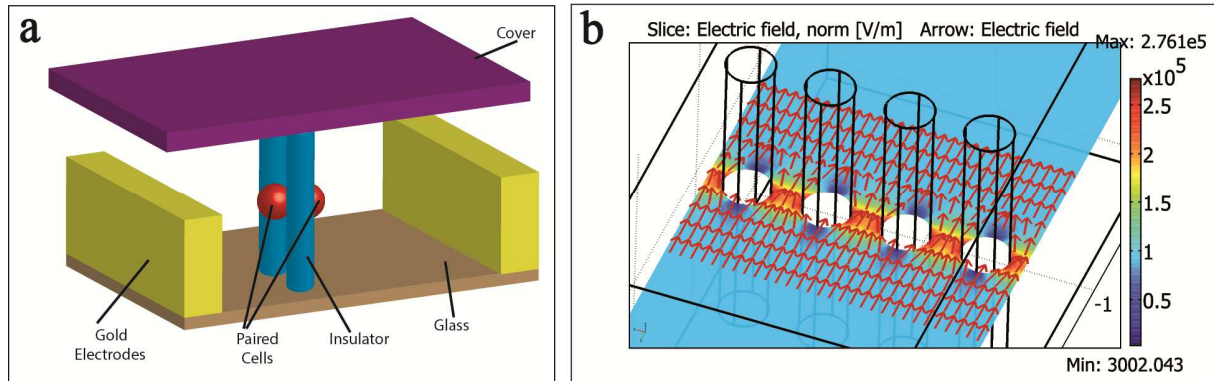
### II.2.1. Etude de la fusion : géométrie à plots isolants

Afin d'utiliser la force de DEP décrite précédemment, il est impératif de créer un gradient de champ électrique dans la structure. Pour cela, il est possible d'exploiter la présence d'obstacles isolants (comme un polymère) pour déformer les lignes de champ et créer un gradient. Le premier dispositif introduisant une structure en polymère pour changer la cartographie du champ à des fins d'électrofusion cellulaire a été présenté par Masuda et *al.* en 1989. La structure consistait en un mur isolant intégrant des ouvertures (figure 2.15.a) donnant lieu à une zone de DEP positive piégeant les cellules avant leur fusion (figure 2.15.b). L'utilisation d'autres structures en polymère pour la DEP a par la suite été décrite dans plusieurs travaux (Cummings et *al.* 2003, Moncada-Hernandez et *al.* 2011).



**Figure 2. 15 :** Première structure développée par Masuda et *al.* (1989) utilisant des isolants afin de déformer les lignes de champ électrique (gauche) pour capturer et fusionner des cellules (droite).

La structure de concentration du champ que nous utiliserons se base sur ce même principe. Afin d'augmenter la densité d'ouvertures, nous optons pour des plots cylindriques de  $30\ \mu\text{m}$ , espacés de  $20\ \mu\text{m}$  (figure 2.16). De cette façon, les cellules auront moins de difficultés à être évacuées du piège après fusion.



**Figure 2. 16 :** Image 3D de la structure à piliers cylindriques isolants (a) et simulation de la distribution de l'intensité (couleurs) et de la direction (flèches) du champ électrique dans cette structure (b)

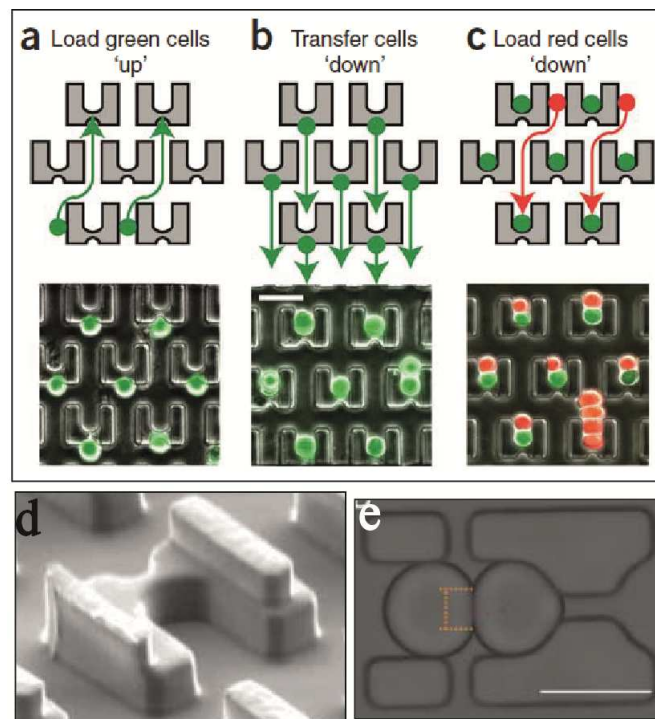
La figure 2.16.b présente une simulation électrique de la structure. Le champ électrique étant contraint à passer entre les plots, cet endroit constitue une zone de fort champ électrique incitant les cellules à s'y appaier en DEP positive. Nous verrons en section II.3 que cette augmentation du champ est par ailleurs bénéfique pour l'étape d'électrofusion. Ce type de structure s'est avéré très utile pour l'étude du comportement des cellules en présence d'un champ électrique (étude de la DEP, des caractéristiques électriques de la cellule et du processus d'électrofusion). Néanmoins, l'utilisation de plots isolants est limitant en termes de densité de structures sur puces. En effet, à part l'option de mettre des lignes de plots sur des canaux en serpentins, cette structure reste limitée. Nous avons donc étudié deux autres types de structures permettant un piégeage de cellules haute densité et prometteuses pour l'électrofusion hautement parallélisée.

### **II.2.2. Parallélisation : méthode fluidique**

Une des méthodes d'immobilisation de cellules consiste à disposer des obstacles non conducteurs en forme de 'U' sur leur passage dans le but de les collecter. A ma connaissance, ce genre de piège à cellules fluidique est apparu en 2004 (Li et al. 2004, Li et al. 2011). Cette structure en U (ouverture vers l'entrée du canal) a tout d'abord été utilisée pour le piégeage afin d'observer dans le temps l'effet de certaines molécules sur les cellules, ou encore pour l'observation de la culture de cellules isolées (Di Carlo et al. 2006). Ce motif a par la suite été utilisé pour la création de modèles tumoraux 3D en empaquetant plusieurs cellules dans un

piège plus large (Wu *et al.* 2008). Ce type de piège a ensuite été ingénieusement modifié par Skelley afin de créer des paires de cellules spécifiques (Skelley *et al.* 2009). Un mode de chargement en 3 temps (détaillé en figures 2. 17.a,b,c) permettait de piéger des paires de cellules puis de leur appliquer des impulsions d'électrofusion, ou du PolyEthylene Glycol afin de comparer les deux modes de fusion.

Le chargement en 3 temps est basé sur des éléments isolants constitués de 2 'U' : un petit ne pouvant contenir qu'une cellule, et un piège en U plus large/long pouvant contenir 2 cellules. Ces éléments sont disposés sur des lignes décalées d'un demi piège, de sorte que chaque grand 'U' d'une rangée fasse face à un petit 'U' de la rangée suivante (figure 2. 17.a). La première étape consiste à piéger le 1<sup>er</sup> type cellulaire. Dans un second temps, le flux est inversé et les cellules collectées dans les grands pièges en vis-à-vis. Enfin, le second type cellulaire est envoyé de sorte à compléter ce piège (figure 2. 17.c).

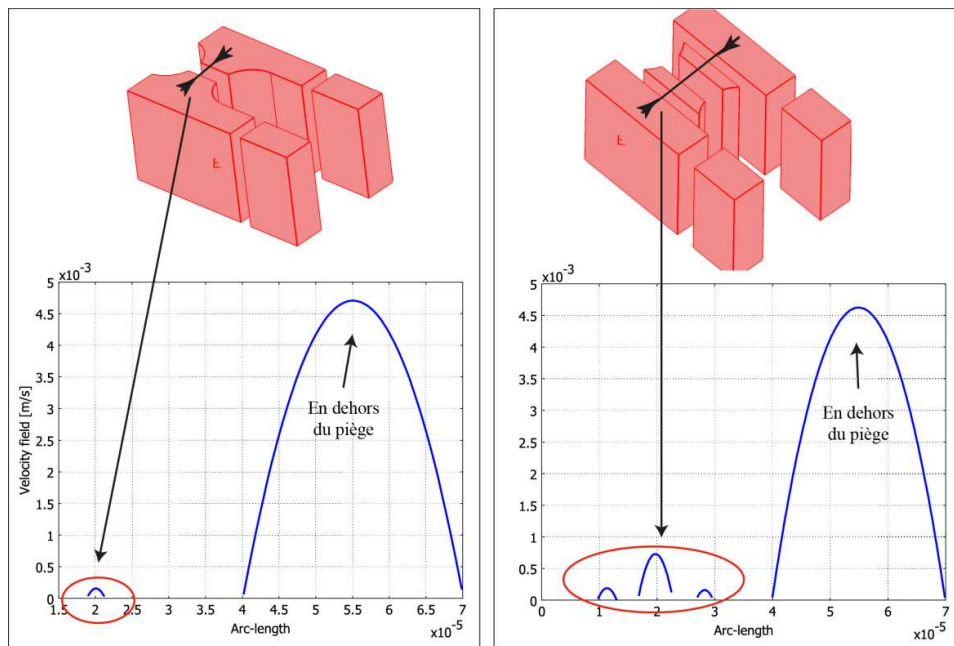


**Figure 2. 17 :** Système de piégeage fluide en 3 temps. a. Piégeage des cellules 'A' dans les petits pièges, puis leur transfert dans les grands pièges (b) (barre = 50  $\mu\text{m}$ ). c. Complément de la paire par les cellules 'B'. d. Piège à 2 étages (3 dimensions) de Skelley *et al.* (2009). e. Piège à 1 étage, deux gouttes piégées (barre = 60 $\mu\text{m}$ ) (Bai *et al.* 2010)

Néanmoins, la structure développée par Skelley utilise une fabrication complexe des pièges car deux niveaux fluidiques sont nécessaires afin de constituer la structure 3D. Le niveau de piliers sert à surélever le piège (figure 2. 17.d). Ainsi, le flux peut s'écouler sous le piège lorsqu'il est vide. Lorsqu'une cellule occupe ce dernier, le passage est obstrué. La

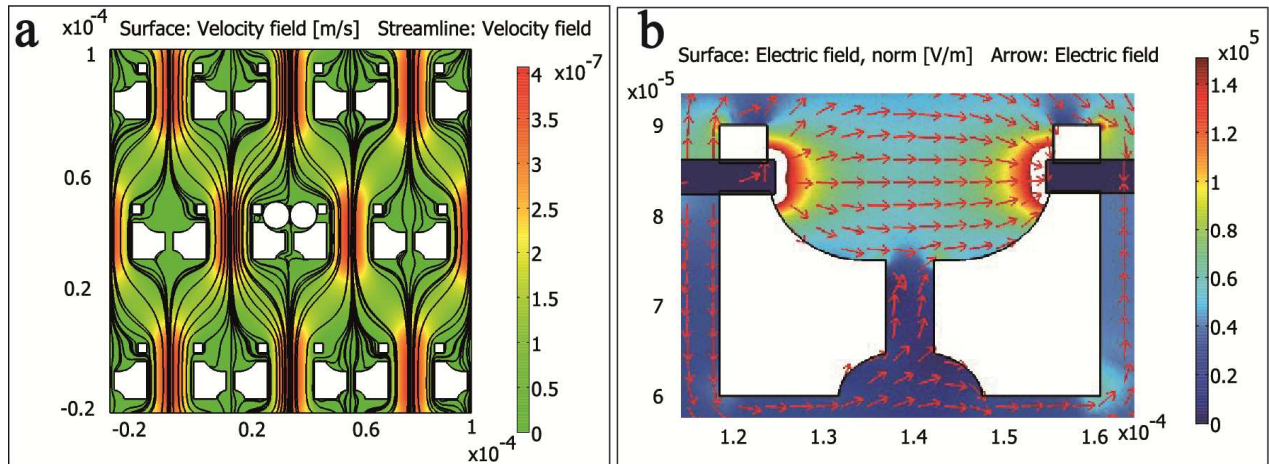
structure à deux niveaux peut être compliquée à réaliser à cause de l’alignement. En 2010, Bai et *al.* ont trouvé le moyen d’obtenir le même effet de piégeage en 3 temps grâce à une structure à un seul niveau, et ce en incluant des microcanaux dans le piège lui-même (Bai et *al.* 2010) (figure 2. 17.e). Grâce à ces canaux, le flux peut s’écouler à travers le piège vide pour attirer les particules. Cette dernière solution étant bien plus simple à mettre en œuvre, nous avons décidé de l’appliquer à notre cas.

La largeur des microcanaux intégrés est primordiale dans le dimensionnement du piège. En effet, une ouverture trop faible ne laisserait pas passer assez de flux pour attirer les cellules, qui préféreraient passer par le chemin le plus facile : l’extérieur du piège (résistance fluide faible). D’autre part, une trop grande ouverture laisserait passer la cellule (grâce à son élasticité, une cellule de plus de 10  $\mu\text{m}$  peut passer à travers une ouverture de moins de 5  $\mu\text{m}$ ). Afin de fixer les dimensions des structures de piégeage, nous avons effectué des simulations à l’aide du module fluide de Comsol®. Nous avons ensuite comparé les vitesses de flux à l’intérieur du petit canal et à l’extérieur du piège. En utilisant une seule ouverture, un rapport de flux de 1/20 est obtenu entre cette dernière et l’extérieur du piège (figure 2. 18.gauche). Afin d’améliorer ce rapport (meilleure attraction des cellules) nous avons pensé à augmenter le nombre d’ouvertures. Grâce au bon dimensionnement de ces dernières, il est possible d’obtenir un rapport de flux d’environ 7 (figure 2. 18.droite). Ce dernier motif serait donc plus efficace pour le piégeage de cellules.



**Figure 2. 18 :** Vues 3D de structures à 1 étage et résultat de simulation fluide ; le rapport de vitesses de flux max entre l’extérieur du piège et les petits canaux passe de 20 pour une ouverture (à gauche) à 7 pour 3 ouvertures (à droite)

Nous avons ensuite imaginé un autre piège se basant sur la même technique. Ce dernier serait placé en largeur (figure 2. 19). Avec une seule ouverture, il est possible d'obtenir un rapport de flux de 5. De plus, la simulation fluide confirme que les lignes de flux traversent le piège lorsqu'il est vide, mais le contournent lorsqu'il est occupé par 2 cellules (figure 2. 19.a).



**Figure 2. 19 :** Simulation fluide (a) et électrique (b) d'un piège 1 étage en largeur. Lorsque le piège est vide, les lignes de flux le traversent, attirant ainsi les cellules à l'intérieur. Lorsqu'il est plein, les lignes de flux contournent ce dernier entraînant les cellules vers les pièges vides (a). Quant au champ électrique, en plaçant les électrodes au plus proche des cellules, il est possible d'appliquer un champ électrique de l'ordre du kV/cm grâce à une tension d'environ 2V.

Afin d'optimiser l'étape d'électroperméabilisation, nous avons opté pour des électrodes au plus proche du piège. De plus, une faible tension ( $\sim 2V$ ) entre les électrodes permettrait de créer un champ électrique de l'ordre du kV/cm, nécessaire à l'électrofusion (figure 2. 19.b).

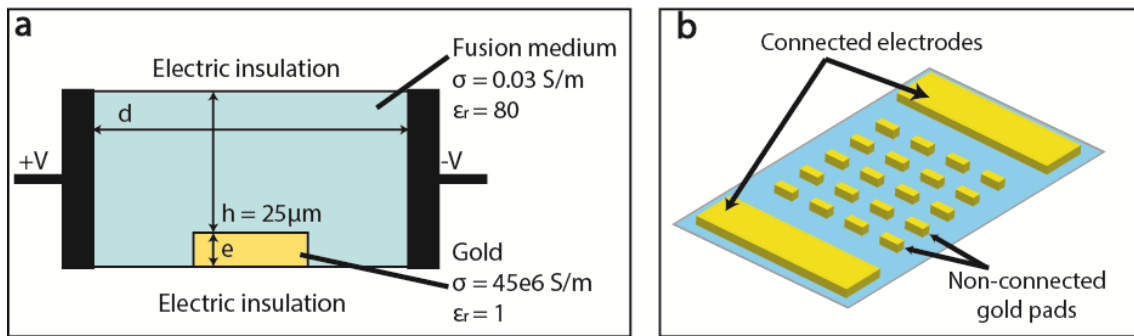
### II.2.3. Parallélisation : méthode électrique (électrodes non connectées)

La seconde stratégie que nous avons mise en œuvre pour la capture et la fusion parallélisées de cellules est l'utilisation de la force de diélectrophorèse. Pour cela, il est nécessaire d'établir un gradient de champ électrique. L'inhomogénéité du champ peut être induite en jouant sur la forme des électrodes ou alors en exploitant une variation de conductivités (Khoshmanesh et al. 2011) grâce à l'introduction d'obstacles isolants ( $\sigma_{\text{obstacle}} \sim 10^{-7}$  S/m) dans un milieu de faible conductivité ( $\sigma_{\text{milieu}} \sim 10^{-3} - 10^{-2}$  S/m pour des fréquences de 0 à 10 MHz) comme présenté dans la section II.2.1. Dans cette partie, nous allons présenter une nouvelle approche se basant sur l'introduction de plots conducteurs ( $\sigma_{\text{plot}} \sim 10^{+7}$  S/m) pour créer l'inhomogénéité nécessaire.



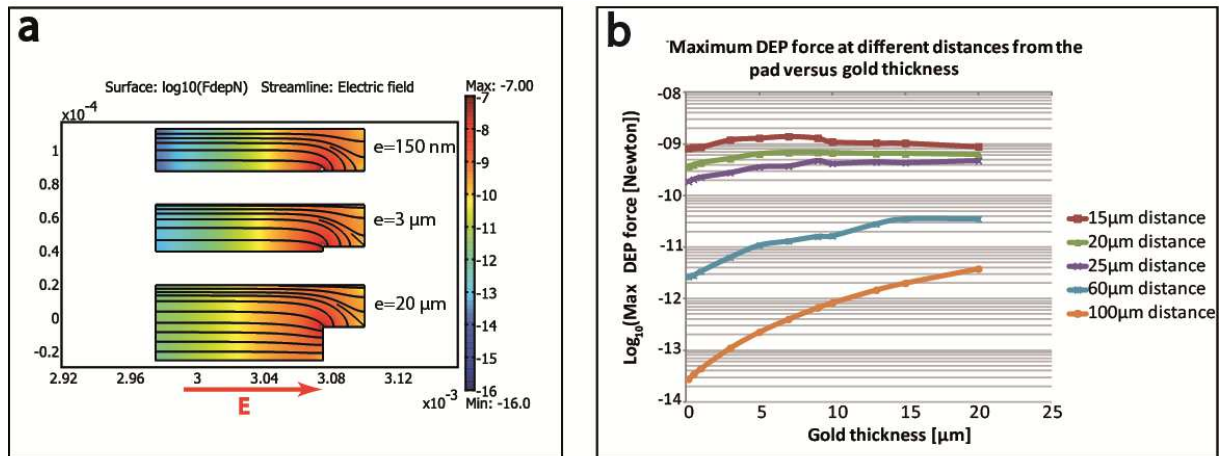
a. Présentation de la stratégie de capture :

La structure d'appariement et de fusion est constituée d'un réseau non-connecté de plots en or ( $20 \times 50 \mu\text{m}$ , distants de  $45 \mu\text{m}$ ) placés entre électrodes connectées distantes de  $410\text{-}460 \mu\text{m}$  (figure 2.20.b). La chambre est délimitée par une résine photosensible constituant les micro-canaux. Dans le but d'évaluer l'effet de l'épaisseur du plot métallique sur l'amplitude de la force de DEP, des calculs numériques du champ électrique ont été effectués en utilisant une méthode en éléments finis sous Comsol Multiphysics®. L'or a été choisi comme matériau pour les plots à cause de ses propriétés de biocompatibilité et de bonne conductivité électrique. Les dimensions et conditions aux limites utilisés lors des simulations sont détaillés en figure 2.20.a.



**Figure 2. 20 :** Conditions aux limites pour la simulation électrique de la structure à plots conducteurs (a) et schéma de la matrice de plots non-connectés (b).

Nous avons tout d'abord étudié l'effet d'un plot en or immergé dans un milieu faiblement conducteur et soumis à un champ électrique externe uniforme. Comme l'indique la figure 2.21.a, la présence du plot déforme les lignes de champ dans lequel il est immergé. Ces inhomogénéités créent le gradient nécessaire au mouvement des dipôles (comme les cellules) grâce à la DEP. Dans cette partie, nous allons étudier l'effet de l'épaisseur du plot sur cette force. La figure (b) présente l'évolution de la force de DEP en fonction de l'épaisseur d'or, et ce à différentes distances du plot.

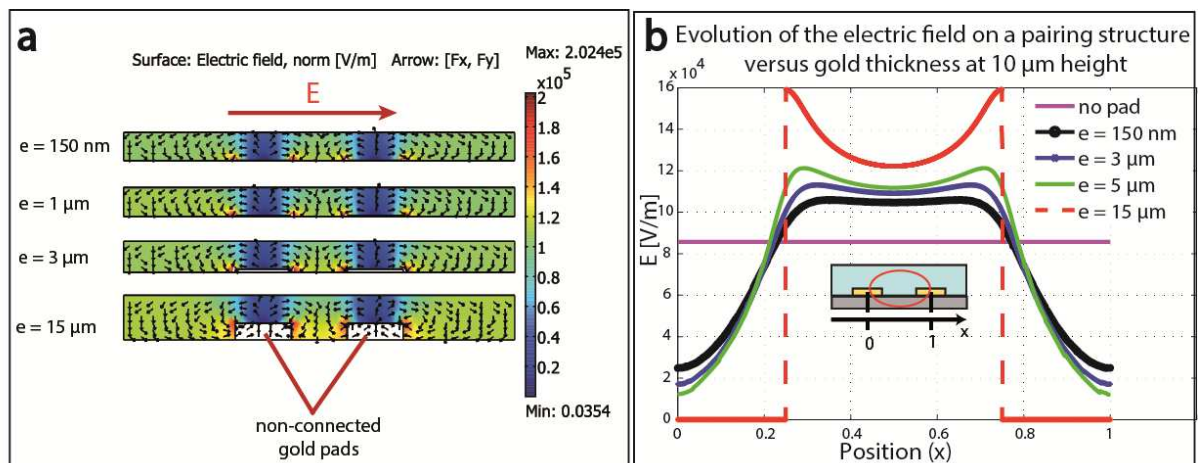


**Figure 2. 21 :** Force de DEP en fonction de l'épaisseur d'or et de la distance de l'électrode ; cellule de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre avec un coefficient  $K_{CM} = 0,4$  (fréquences comprises entre 400 kHz et 1 MHz). a. Les couleurs représentent  $\log_{10}(F_{DEP})$ , b. Evolution du max de  $F_{DEP}$  à différentes distances du plot.

Près de l'électrode,  $F_{DEP}$  est quasiment la même quelle que soit l'épaisseur du plot conducteur. Conformément à la théorie (tableau 2.1),  $F_{DEP}$  diminue rapidement en s'éloignant de la zone d'inhomogénéité du champ (en  $1/d^3$  pour des électrodes parallèles). Cette diminution est plus prononcée dans le cas d'électrodes fines. En conséquence, la zone de capture par DEP est plus large lorsque des électrodes épaisses sont utilisées.

**b. Structure d'appariement :**

Profitant de l'effet de concentration du champ induit par un plot en or, nous pouvons créer une structure d'appariement en utilisant 2 plots espacés d'une distance équivalente à la taille de deux cellules. En effet, comme présenté en figure 2.22.a, la zone d'appariement (entre les plots) représente une zone de fort champ électrique pouvant capturer les cellules par DEP positive (flèches). Dans les bonnes conditions (conductivité du milieu et fréquence appropriés), les cellules seront piégées entre les plots.



**Figure 2. 22:** Simulation d’une structure d’appariement et de fusion (2 plots) pour différentes épaisseurs d’or. a. Le champ électrique (couleurs) et la force de DEP (flèches), b. Comparaison de la forme du champ électrique dans la zone de piégeage (à 10  $\mu\text{m}$  de hauteur).

La figure 2.22.b représente l’évolution du champ électrique à 10  $\mu\text{m}$  de hauteur pour différentes épaisseurs d’or. Nous pouvons noter que l’amplitude de E est plus élevée pour de fortes épaisseurs ‘e’. En effet, il y a une augmentation de 16% de E pour  $e = 15 \mu\text{m}$  en comparaison de  $e = 150 \text{ nm}$ . De plus, la zone d’appariement à électrodes épaisses constitue un piège physique pour les cellules.

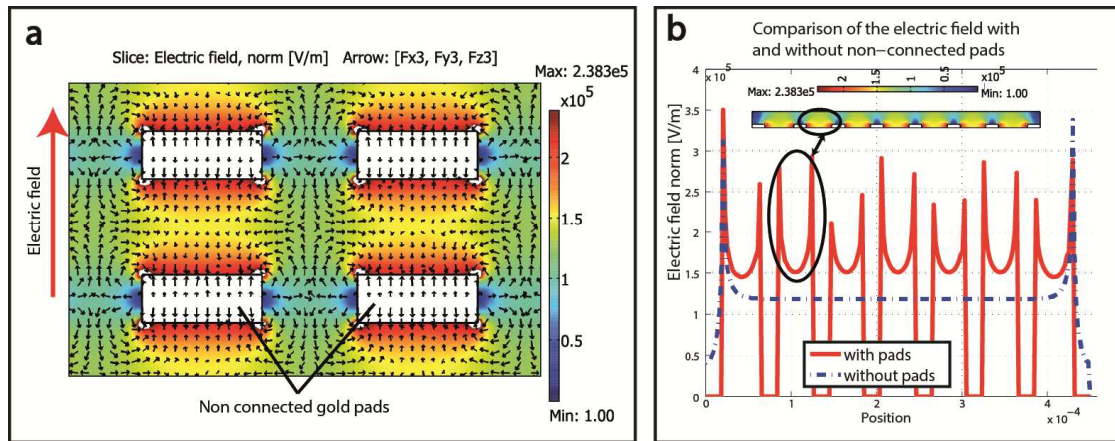
Comme le résume le tableau 2.3, des plots d’or épais sont plus avantageux pour la capture de cellules distantes et leur appariement entre les plots. De plus, l’augmentation du champ électrique dans la zone de piégeage permet de réduire l’intensité de l’impulsion d’électrofusion. D’un autre côté, des plots épais requièrent un procédé de fabrication plus long (étapes d’électrodéposition et de gravure plus longues). De plus, le facteur de forme du plot doit aussi être pris en considération car il est difficile de fabriquer des plots étroits et épais. Ces difficultés technologiques seront présentées en détail dans le chapitre 3. Un comparatif des avantages et des inconvénients des électrodes fines et épaisses est présenté dans le tableau 2.3. Finalement, un compromis a été fixé à 5  $\mu\text{m}$  d’épaisseur pour les plots en or.

**Tableau 2.3:** Récapitulatif de l’effet de l’épaisseur du plot en or

Plots en or fin	Plots en or épais
<ul style="list-style-type: none"> <li>• +Processus de fabrication simple</li> <li>• - Champ électrique dans le piège non optimal</li> <li>• - Zone de capture par DEP réduite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• + Champ électrique augmenté dans le piège</li> <li>• + Zone de capture par DEP plus étendue</li> <li>• + Piège physique (puits) pour une paire de cellules</li> <li>• - Facteur de forme du plot difficile à contrôler</li> </ul>

c. Matricage:

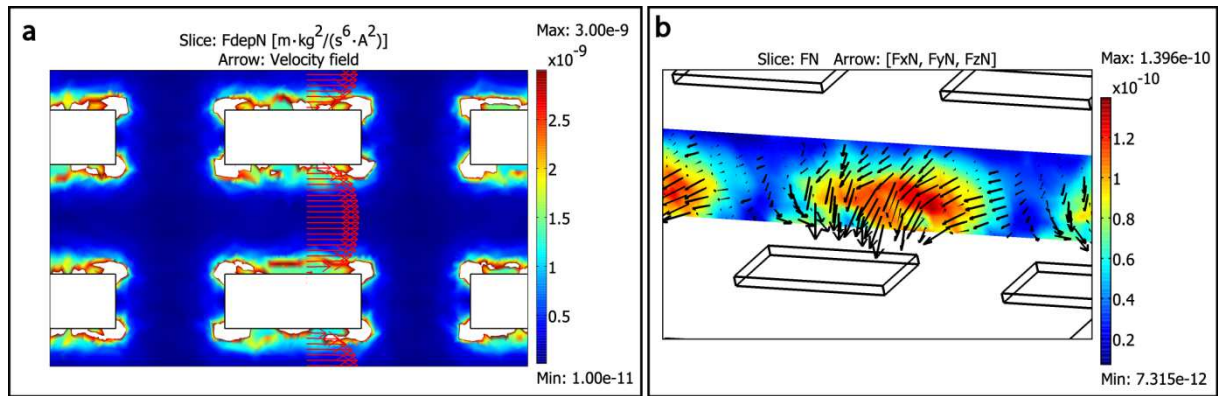
En reproduisant la microstructure d’appariement, un micro-réseau pour l’appariement et la parallélisation de l’électrofusion peut être réalisé (figure 2.23.a). En utilisant le module 3D AC/DC de Comsol Multiphysics©, nous avons simulé une structure de 5  $\mu\text{m}$  d’épaisseur d’or, composée d’une matrice de 6 x 4 plots métalliques non connectés (de 10  $\mu\text{m}$  x 40  $\mu\text{m}$ , séparés par 50  $\mu\text{m}$  de distance) placés entre 2 électrodes (410  $\mu\text{m}$  de distance) soumises à 50 V. Les conditions de simulation sont les mêmes que celles de la figure 2.20.a.



**Figure 2. 23:** Micro-matrice d'appariement et de fusion. a. Simulation 3D de la structure présentant la topologie du champ électrique (couleurs) et de la direction de la  $F_{DEP}$  (flèches, cas de DEP positive). b. Distribution du champ électrique le long d'une ligne de plots (courbe continue) et sans les plots (ligne discontinue).

Comme le montre la figure 2.23.a, l'espace entre les plots (parallèle à  $E$ ) constitue la zone de piégeage en pDEP. En effet, selon les flèches de cette figure, les cellules sont acheminées vers la zone d'appariement lorsque la fréquence adéquate est appliquée (zones de champ électrique maximal). L'espace est dimensionné pour accueillir deux cellules dans l'alignement du champ électrique, afin de minimiser les fusions polynucléaires (plus de 2 noyaux). De plus, la présence des plots augmente la valeur de  $E$  dans la zone de piégeage et de fusion (figure 2.23.b), ce qui semble logique lorsque nous considérons que la circulation de  $E$  est nulle dans le plot métallique. Ainsi, le champ électrique entre les plots peut être approximé à :  $E_{inter-plots} = V / (d - n*L)$ , où ' $d$ ' est la distance entre les deux électrodes connectées, ' $n$ ' le nombre de plots rencontrés par la ligne de champ et ' $L$ ' la largeur de chaque plot. Cette augmentation homogène permet de réduire la tension appliquée pour avoir un effet lors des phases de piégeage et d'électrofusion. De plus, nous verrons que le fait que le champ soit supérieur dans le piège augmente les chances de fusions à cet endroit (bi-nucléaires) comparativement à l'extérieur de ce dernier.

D'autre part, en tests réels sur structure fermée, les cellules ne sont pas soumises à la seule force de DEP. En effet, la force fluïdique de remplissage du canal pousse les cellules et les fait glisser le long des pièges. La figure 2.24 présente les résultats de simulation couplée de la force électrique (DEP) et de la fluïdique (pression de 1 Pa entre l'entrée et la sortie de la structure). Si la force de flux est trop élevée, les cellules glissent le long des pièges. Dans le cas contraire, les cellules sont piégées par DEP.



**Figure 2. 24:** Simulations électro-fluidiques de la structure à plots conducteurs. a. Simulation de l'intensité de la force de pDEP (couleurs) et de la vitesse du fluide (flèches). Jusqu'à une certaine hauteur, les pièges dévient les lignes de flux. b. Résultante de la force ( $F_{DEP} + F_{flux}$ ) au centre de la zone de piégeage. Les flèches sont proportionnelles à la force.

Néanmoins, il est préférable d'utiliser la structure en statique ( $F_{flux} \sim 0$ ) afin de maximiser l'effet du piégeage par DEP, et de ne pas perturber les cellules pendant le processus d'électrofusion.

### **II.3. Potentiel transmembranaire : prise en compte de l'environnement cellulaire**

Lors de l'application d'impulsions électriques classiques (de quelques dizaines de microsecondes à quelques millisecondes) sur une solution biologique contenant des cellules vivantes, des charges de signes opposés s'accumulent de part et d'autre de la membrane plasmique. Ceci est dû à la nature conductrice des milieux intra- et extracellulaires (respectivement, le cytoplasme et le milieu de suspension) séparés par une barrière diélectrique (isolante) empêchant la recombinaison des charges opposées : la membrane. Ainsi, cette accumulation de charges induit une différence de potentiel entre les parois (interne et externe) de la membrane. Ce potentiel, appelé potentiel transmembranaire induit ( $\Delta\Psi_i$ ), s'ajoute au potentiel de repos  $\Delta\Psi_0$  de la cellule. Ce dernier, lié au gradient de concentrations ioniques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, vaut typiquement  $\Delta\Psi_0 = -50$  mV (Kleber, 1983).

En augmentant ainsi le potentiel transmembranaire à l'aide d'impulsions électriques, il est possible de perméabiliser la membrane (Neumann et *al.* 1992). Dépendamment de la structure membranaire, le potentiel critique de perméabilisation peut aller de 90 mV à 750 mV voire plus (Mauroy 2010). De plus, en fonction de la valeur de  $\Delta\Psi_i$ , ce phénomène peut rester

réversible ou détruire complètement la membrane. Il est donc primordial de pouvoir évaluer la valeur du potentiel transmembranaire dans le cadre de l'électropermabilisation.

### II.3.1. Théorie : calcul et simulation du potentiel transmembranaire :

Dans cette partie, nous allons passer en revue les différentes méthodes de calcul du potentiel transmembranaire induit.

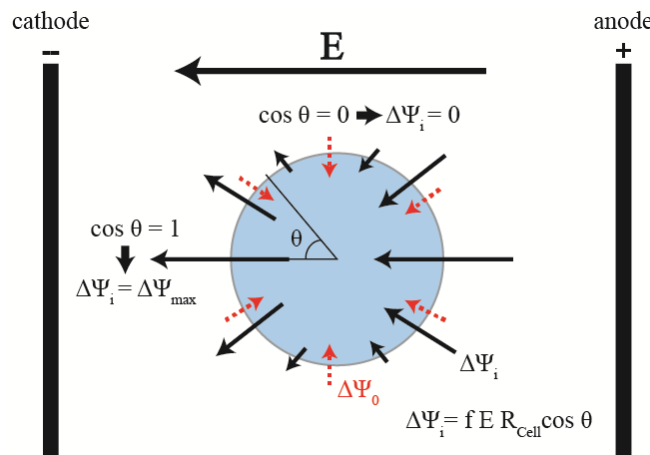
#### a. Calcul analytique du potentiel transmembranaire :

Herman P. Schwan fut le premier à développer une formule de calcul du potentiel transmembranaire induit (Schwan 1957). Cette dernière, fut ensuite généralisée afin de prendre en compte le paramètre temporel de l'impulsion (Pauly et Schwan, 1959) :

$$\Delta\Psi_i = V_{\text{int}} - V_{\text{ext}} = f \cdot E \cdot R_{\text{Cell}} \cos \theta \cdot \left(1 - e^{-t/\tau_m}\right) \quad (2.13)$$

où  $R_{\text{Cell}}$  représente le rayon de la cellule,  $f$  un facteur dépendant des caractéristiques électriques du cytoplasme, de la membrane et du milieu extracellulaire,  $E$  l'intensité du champ électrique appliqué et  $\theta$  l'angle entre le point de calcul et la direction du champ électrique (voir figure 2.25). Enfin, la constante de temps de charge de la membrane  $\tau_m$  s'exprime comme suit en fonction des permittivités de la membrane ( $\sigma_{me}$ ) du cytoplasme ( $\sigma_c$ ) et du milieu externe ( $\sigma_m$ ) ainsi que la permittivité ( $\epsilon_{me}$ ) et l'épaisseur ( $e$ ) de la membrane :

$$\tau_m = \frac{R_{\text{Cell}} \epsilon_0 \epsilon_{me} / e}{\frac{2\sigma_m \sigma_c}{2\sigma_m + \sigma_c} + \frac{R_{\text{Cell}}}{e} \cdot \sigma_{me}} \quad (2.14)$$



**Figure 2.25 :** Schéma explicatif de la variation de potentiel transmembranaire  $\Delta\Psi_i$  sur une cellule plongée dans un champ électrique uniforme  $E$ . Le potentiel  $\Delta\Psi_0$  représente le potentiel au repos de la cellule. Les flèches sont la représentation vectorielle de la direction des potentiels décroissants.

La formule (2.13) permet ainsi la prise en compte du temps de charge de la membrane, critère primordial dans le cas d'impulsions ultra courtes (nanopulses) (Villemejeane 2010). Néanmoins,  $\tau_m$  étant en général inférieur ou égal à la microseconde, le terme temporel peut être omis dans le cas d'impulsions 'classiques' (durées supérieures à 10  $\mu$ s). De plus, dans le cas de cellules sphériques ayant une membrane très faiblement conductrice, le coefficient f est égal à 3/2 (Kotnik et al. 1997). On obtient ainsi la formule de Schwan (1957) :

$$\Delta\Psi_i = \frac{3}{2} \cdot E \cdot R_{cell} \cos \theta \quad (2.15)$$

La formule de Schwan est la plus utilisée pour déterminer le champ électrique nécessaire pour atteindre le potentiel transmembranaire critique dans le cadre d'applications impliquant l'électroperméabilisation ou l'électrofusion (Lee et al. 1999). Dans d'autres cas, le champ critique est déterminé empiriquement (Tekle et al. 1991, Ozil et al. 1986). La formule de Schwan n'étant valable que pour une cellule sphérique, des versions évoluées de la formule intégrant des facteurs de forme ont aussi été développées afin de tenir compte de la forme des cellules (Gimsa et al. 2001, Sukhorukov et al. 1998). Néanmoins, de par sa simplicité, la formule classique (2.15) reste la plus utilisée. Cependant, cette dernière n'est valable que dans le cas d'une cellule isolée dans un champ électrique uniforme. Or, dans le cas de l'électrofusion après appariement, l'impulsion est appliquée sur une paire (voire plus) de cellules très proches. Les cellules se rapprochant d'un modèle isolant, la proximité d'une autre particule modifie la cartographie du champ électrique. Ainsi, les cellules vont écranter ce dernier diminuant le potentiel induit. Tchaumnat et Washizu ont donc développé un modèle analytique permettant de calculer le potentiel transmembranaire induit sur deux cellules très proches (Washizu et al. 2007). Ils ont ensuite étendu ce modèle au calcul de  $\Delta\Psi_i$  de cellules dans une structure à plots isolants présentée plus haut (Tchaumnat et al. 2007). Ce modèle, très efficace, reste néanmoins compliqué à mettre en œuvre et très rigide. En effet, afin de pouvoir l'utiliser dans le cas d'autres types de structures, il doit être complètement modifié, ce qui peut être difficile (voire impossible) pour certaines structures. Pour cette raison, nous avons favorisé le calcul numérique se basant sur des simulations en éléments finis permettant de tenir compte de l'environnement de la cellule, quelle que soit la forme de ce dernier.

#### b. Calcul numérique (en éléments finis) du potentiel transmembranaire :

En utilisant le module AC/DC de Comsol Multiphysics®, il est possible de calculer le potentiel électrique en tout point de la structure modélisée. En se plaçant en conditions

statiques (durée d'impulsion supérieure au temps de charge de la membrane  $\tau_m$ ) la cellule peut être considérée comme une sphère isolante plongée dans un milieu conducteur, car la membrane chargée isole le cytoplasme du milieu extracellulaire. Ainsi, durant une simulation électrique 3D de la structure, le potentiel en tout point à la surface de cette sphère est connu. D'autre part, en tenant compte de la neutralité de la cellule (charge totale de la cellule  $Q_c = 0$ ), nous pouvons considérer que le potentiel interne ( $V_{IN}$  constant) de cette dernière est égal à la moyenne du potentiel ' $V_i$ ' calculé par éléments finis (FEM) en tout point à sa surface externe 'S' :

$$V_{IN} = \frac{1}{S} \oint_S V_i dS \quad (2.16)$$

Ainsi, le potentiel transmembranaire en tout point de la cellule peut se calculer comme suit:

$$\Delta\Psi_i = V_{IN} - V_i \quad (2.17)$$

En utilisant les formules (2.16) et (2.17) couplées à des simulations numériques nous avons pu extraire le potentiel transmembranaire en tout point de la cellule dans différentes configurations.

### **II.3.2. Evolution du potentiel transmembranaire pour deux cellules très proches :**

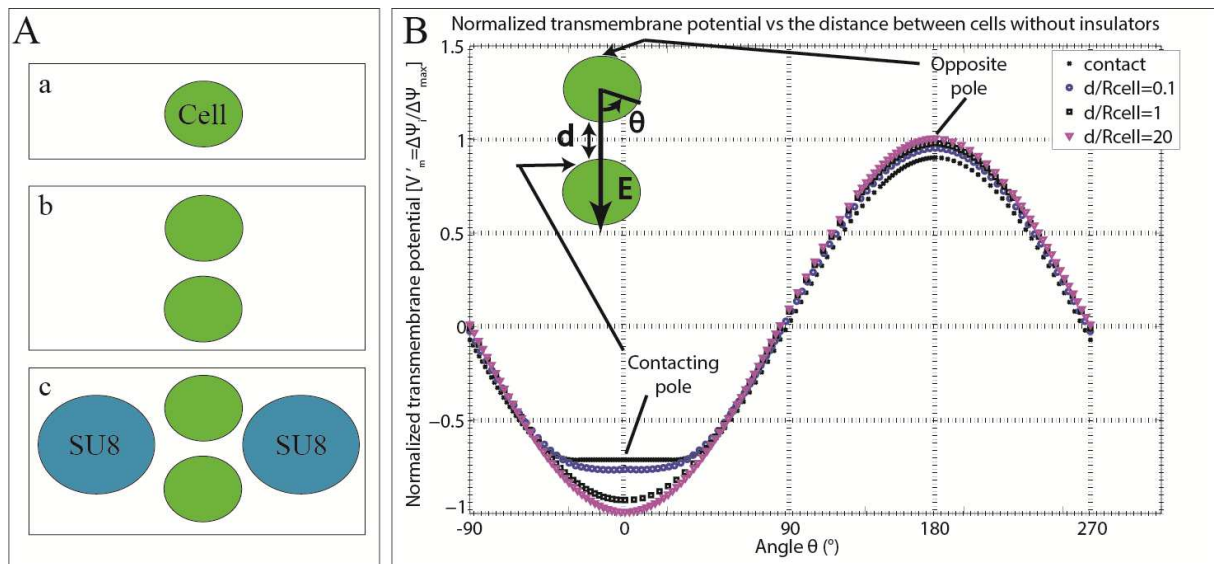
Nous avons tout d'abord voulu mettre en avant l'effet de la proximité d'une autre cellule sur le potentiel transmembranaire. Pour cela, nous avons effectué des simulations numériques de deux cellules immergées dans un milieu faiblement conducteur (0,03 S/m) et soumises à un champ électrique externe  $E$  uniforme (configuration b, figure 2.26.A). D'après la formule de Schwan (2.15), le potentiel transmembranaire maximal (en omettant le potentiel de repos) d'une cellule serait le suivant :

$$\Delta\Psi_{\max} = 1,5 \cdot E \cdot R_{Cell} \quad (2.18)$$

La figure 2.26 représente l'évolution du potentiel transmembranaire normalisé en fonction de l'angle  $\theta$  et ce pour différentes distances 'd' entre les cellules. Le potentiel transmembranaire normalisé ( $V'_m$ ) est calculé comme suit ( $\Delta\Psi_i$  et celui obtenu par la formule 2.17) :

$$V'_m = \frac{\Delta\Psi_i}{\Delta\Psi_{\max}} = \frac{\Delta\Psi_i}{\frac{3}{2} ER_{Cell}} \quad (2.19)$$





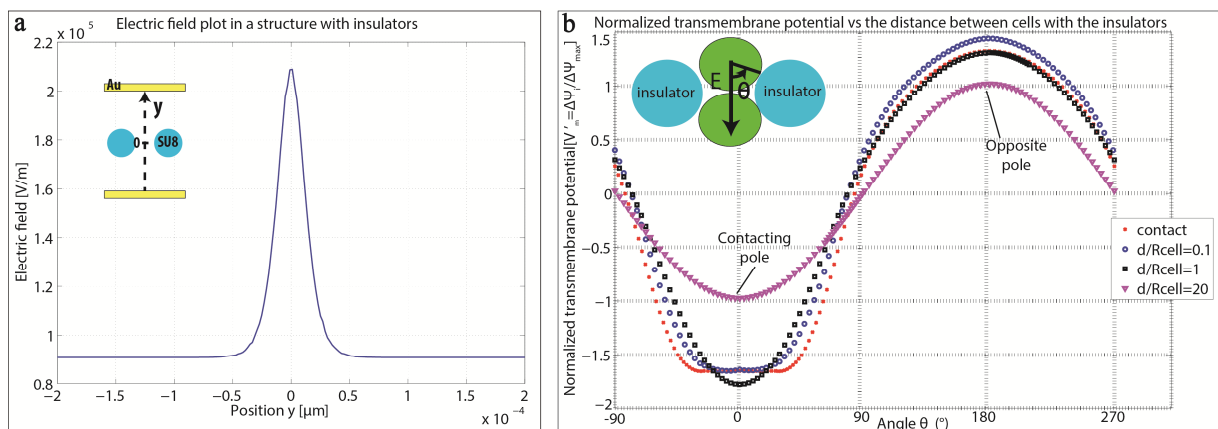
**Figure 2.26 :** A. Représentation des 3 configurations étudiées. B. Evolution du potentiel transmembranaire d'une paire de cellules dans un champ électrique externe uniforme (configuration b), en fonction de la distance 'd' entre les cellules. Le point 'contact' correspond à une distance  $d = 0.4 \mu\text{m}$

La distance  $d = 400 \text{ nm}$  représente le contact entre les deux cellules. Dans ce cas, nous pouvons voir que la proximité de l'autre cellule diminue fortement le potentiel transmembranaire (réduction de 30 % au point de contact et de 10 % au pôle opposé). Ceci est dû au caractère isolant des cellules qui modifie la cartographie du champ électrique écrantant mutuellement celui perçu par la cellule voisine. Par opposition, plus les cellules sont éloignées, plus la forme du potentiel se rapproche de la forme sinusoïdale décrite par Schwan. Ceci confirme que le modèle de Schwan (formule 2.15) n'est pas applicable lors de la proximité d'autres cellules. Or, dans le cadre de l'électrofusion, il est nécessaire que les cellules soient en contact lors de l'application de l'impulsion. La première conséquence de la distribution du potentiel transmembranaire dans le cas de cellules proches est que la première zone perméabilisée est opposée à la zone de contact. La seconde conséquence est que le champ électrique externe nécessaire à la déstabilisation de la membrane au point de contact provoquerait une perméabilisation forte au pôle opposé, pouvant provoquer une lyse cellulaire. Pourtant, cette configuration, peu favorable à la viabilité des cellules, se retrouve dans les cuvettes d'électroporation. Nous allons voir que l'utilisation d'une microstructure intégrant des plots isolants peut pallier ce problème.

### II.3.3. Evolution du potentiel transmembranaire dans la structure à plots isolants :

En utilisant des plots isolants (configuration c, figure 2.26.A), la cartographie du champ électrique peut être modifiée. En plaçant correctement ces plots, il est par exemple possible de doubler (voire plus) localement l'intensité du champ (figure 2.27.a). Ainsi, en plaçant deux cellules dans cette structure de constriction du champ électrique, nous pouvons amplifier le potentiel transmembranaire dans la partie désirée : le point de contact (figure 2.27.b). Dans cette partie, nous allons étudier cet effet en utilisant la modélisation par éléments finis.

Pour cette étude, des plots cylindriques de 30  $\mu\text{m}$  de diamètres, séparés de 20  $\mu\text{m}$  créent le gradient de champ nécessaire à l'application d'une DEP positive pour appairer les cellules dans l'ouverture. La même constriction du champ électrique est ensuite exploitée lors de l'application des impulsions électriques, afin de délivrer un champ maximal au point de contact entre les cellules (figure 2.27).

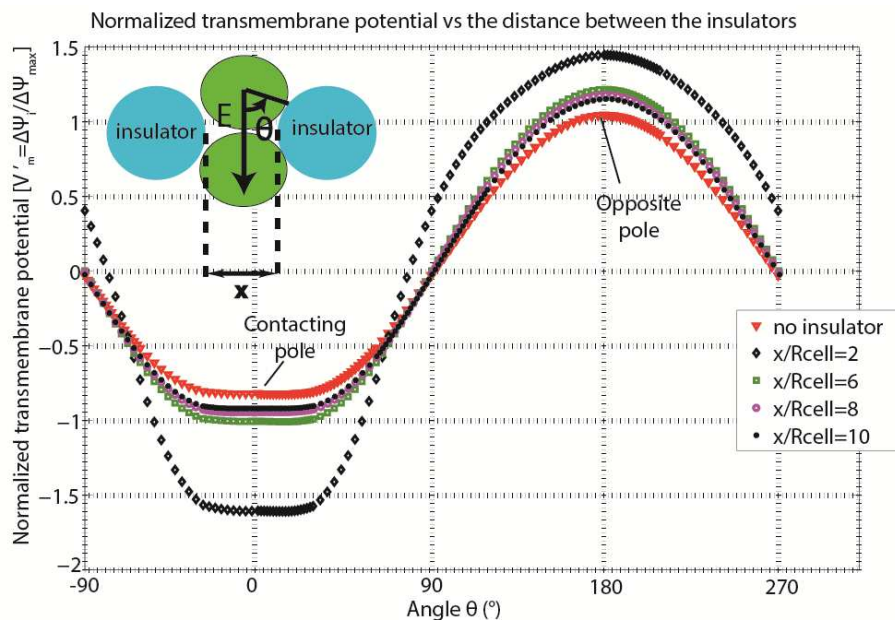


**Figure 2.27 :** Effet de plots isolants sur (a) l'intensité du champ électrique externe et (b) sur l'évolution du potentiel transmembranaire

Lorsque les cellules sont très proches et dans la zone de piégeage ( $d/R_{\text{Cell}}$  diminue), deux effets sont visibles :

- Une forte augmentation du potentiel transmembranaire au point de contact, et une augmentation un peu plus faible au pôle opposé. Lorsque les cellules sont assez éloignées l'une de l'autre, mais assez proches de la zone de piégeage ( $d/R_{\text{Cell}} = 1$ ),  $|\Delta\psi_i|$  dépasse  $\Delta\psi_{\text{max}}$  de 80% au point de contact, et de 30% au pôle opposé.
- Un écrantage de  $E$  dû à la proximité de la seconde cellule apparaît lorsque  $d/R_{\text{Cell}} < 1$  diminuant  $|\Delta\psi_i|$  au point de contact.

Néanmoins, l'équilibre entre l'écrantage dû à la proximité des cellules et l'augmentation due à la concentration de  $E$  dans la zone de piégeage mène à un  $|\Delta\Psi_i|$  supérieur au point de contact (65% supérieur à  $\Delta\Psi_{\max}$  au contact contre 30% à l'opposé). Cette configuration est plus adaptée que la précédente (sans constriction du champ  $E$ ) à l'électrofusion cellulaire. En effet, en augmentant principalement le potentiel transmembranaire au point de contact, il est donc possible de perméabiliser la membrane à cet endroit précis sans endommager le pôle opposé. Plusieurs paramètres peuvent être investigués afin d'optimiser la structure (distance entre les plots, diamètre, forme, ...) sans avoir à modifier le modèle de calcul. Nous avons par exemple étudié l'effet de la distance 'x' entre les plots sur  $\Delta\Psi_i$  de cellules en contact ( $d = 400$  nm) (figure 2.28). Nous pouvons noter que lorsque les plots sont très éloignés ( $x/R_{\text{Cell}} > 8$ ) il n'y avait quasiment aucun effet de leur présence. Cependant, lorsque 'x' diminue, la focalisation du champ électrique apparaît et  $|\Delta\Psi_i|$  augmente principalement au point de contact.



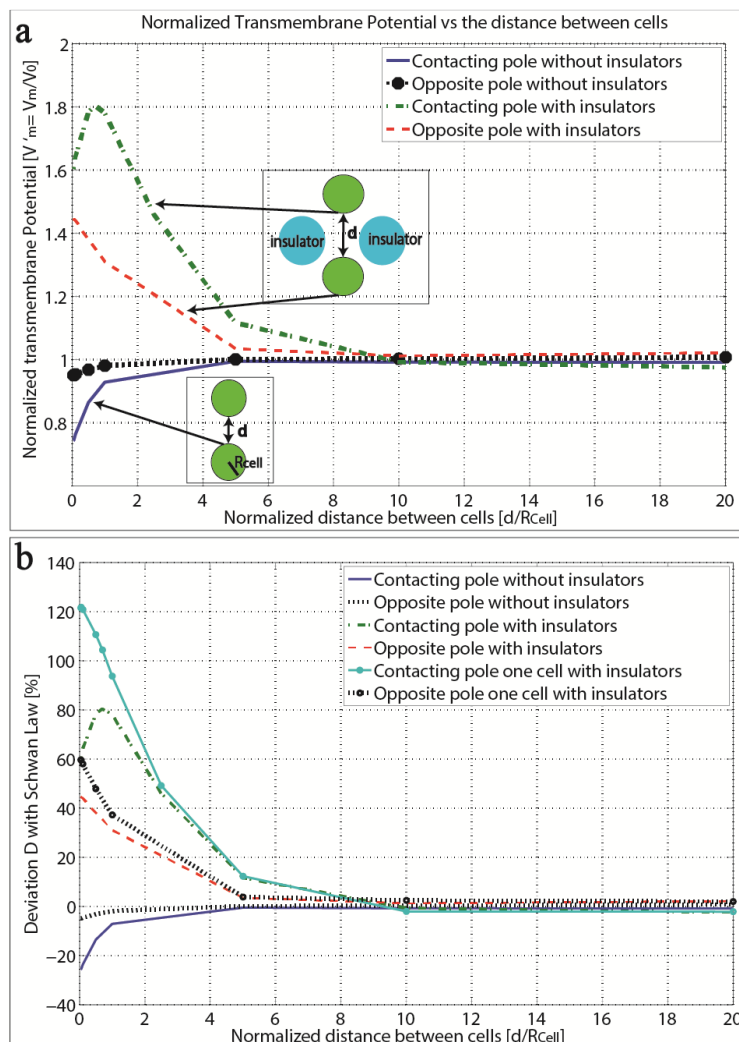
**Figure 2.28 :** Effet de la variation de la distance entre les plots sur l'évolution du potentiel transmembranaire (distance entre les cellules constante,  $d = 0,4 \mu\text{m}$ )

La figure 2.29.a résume les résultats de potentiel transmembranaire aux deux pôles, en fonction de la distance normalisée entre les cellules, avec et sans constriction du champ électrique. Nous pouvons voir que toutes les courbes convergent vers '1' (potentiel transmembranaire égal à celui calculé par Schwan) car les cellules, très éloignées, n'ont plus d'influence l'une sur l'autre. Ainsi, les deux pôles ont autant de chances d'être perméabilisés. Cependant, lorsque les cellules sont proches, le point de contact de celles placées entre les plots isolants a plus de chances d'être perméabilisé (potentiel normalisé à 1,6) quand celui des cellules hors piège a le moins de chances de l'être (potentiel normalisé à 0,7).

Afin d'avoir une idée quantitative de l'amélioration apportée par la présence des plots, nous avons comparé la déviation 'D' apportée au point de contact et au pôle opposé avec et sans plots. D'autre part, nous définissons la déviation par rapport au maximum de potentiel transmembranaire calculé par Schwan ( $\Delta\Psi_{\max}$ ) afin d'avoir une idée de la différence entre le potentiel calculé grâce au modèle numérique et celui obtenu par le modèle analytique de Schwan. La déviation 'D' (représentée en figure 2.29.b) s'exprime comme suit :

$$D = 100 \times \frac{|\Delta\Psi_i| - \Delta\Psi_{\max}}{\Delta\Psi_{\max}} = 100 \times (V'_m - 1) \quad (2.20)$$

A titre d'exemple,  $\Delta\Psi_i$  aux pôles d'une cellule de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, isolée dans un champ électrique uniforme  $E = 1 \text{ kV/cm}$ , est égal à  $\pm 1,5 \text{ V}$ , et donc une déviation  $D = 0\%$  et un potentiel calculé par Schwan exact.



**Figure 2.29 :** Evolution en fonction de la distance normalisée (entre les cellules) du potentiel transmembranaire normalisé (valeur absolue) avec et sans plots aux deux pôles (a) et de la déviation normalisée D définie dans le

texte

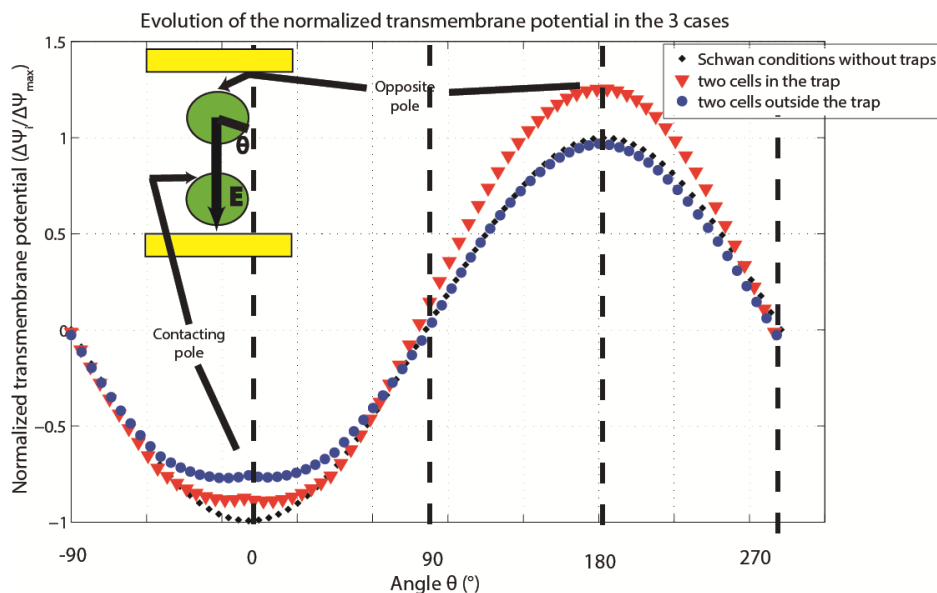
Nous constatons que lorsque les cellules sont éloignées, la déviation tend vers 0 car le modèle de Schwan est exact dans ce cas. Cependant,  $D$  peut être très élevé lorsque les cellules sont proches (60% pour une paire dans le piège).

En l'absence de plots, la déviation atteint respectivement -5% et -25% au pôle opposé et au contact (potentiel sur-estimé par Schwan). Ces résultats sont identiques aux résultats analytiques de Techaumnat et Washizu (Washizu *et al.* 2007). Afin d'obtenir une fusion, le champ électrique doit donc être augmenté au risque de dégrader le pôle opposé de la cellule.

Afin de dé-corréler l'effet de la proximité de l'autre cellule et celui de la concentration du champ électrique, nous avons représenté une cellule seule dans le piège à plots isolants. Dans ce dernier cas, la déviation peut atteindre 120% au pôle faisant face aux plots (équivalent au contact) et 60% à l'opposé. Lorsque l'effet d'une seconde cellule est ajouté, ces valeurs sont respectivement réduites à 60% et 45%. Nous en concluons que pour obtenir une fusion, le champ appliqué doit être 60% inférieur à celui calculé par l'équation 2.15 (Schwan) pour un champ uniforme. D'autre part, ces résultats démontrent qu'avec une microstructure adéquate, il est possible d'avoir un meilleur contrôle sur le potentiel transmembranaire de la cellule.

#### **II.3.4. Potentiel transmembranaire dans la structure de parallélisation à plots conducteurs :**

Nous avons calculé le potentiel transmembranaire de cellules piégées dans la structure à plots conducteurs.



**Figure 2.30 :** Evolution du potentiel transmembranaire d'une cellule isolée en dehors du piège (noir) en tenant compte de la seconde cellule (bleu) et d'une paire de cellules dans le piège non connecté

Dans ce cas (figure 2.30), le potentiel transmembranaire est écranté par la présence de l'autre cellule. Ce potentiel est cependant plus élevé qu'en l'absence de ces plots car, comme vu en section II.2.3, le champ électrique est supérieur dans la zone de piégeage. Ainsi, les cellules piégées ont plus de chance de fusionner que celles qui sont restées hors du piège.

Néanmoins, à cause de la forme plus ou moins homogène de  $E$  dans la structure,  $|\Delta\Psi_i|$  au point de contact est légèrement inférieur au pôle opposé. Nous avons cependant obtenu de très bons résultats de fusions dans cette structure (meilleurs qu'en son absence). Dans cette configuration, le pôle opposé est d'abord perméabilisé puis le potentiel se propage au point de contact, ce qui perméabilise ce pôle, conduisant à une fusion.

## **II.4. Conclusion**

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord traité des différentes forces mises en jeu lors de l'application d'un champ électrique sur des cellules plongées dans un milieu plus ou moins conducteur. Nous avons pu voir que la conductivité de ce milieu était un facteur déterminant concernant l'élévation de température qui pouvait résulter. Le modèle analytique a tout d'abord permis de dresser un bilan des forces et de vérifier que dans le cas de nos expérimentations, la diélectrophorèse était la force dominante. Néanmoins, nous avons montré qu'un modèle numérique, basé sur les mêmes équations, pouvait être appliqué et restait flexible. Un exemple présentant des calculs de température et de forces électrothermiques dans une structure complexe prouve la faisabilité du calcul.

La seconde partie de ce chapitre a permis d'introduire les 3 structures étudiées durant cette thèse. La première structure incluant des plots isolants permet d'élever le champ électrique dans la zone de piégeage et d'électrofusion. La seconde structure, basée sur un mode de piégeage fluide est prometteuse pour la fusion parallélisée. Enfin, la structure à plots conducteurs évitant l'adressage électrique, est tout aussi prometteuse pour de l'électrofusion parallélisée.

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous avons analysé l'impact des différentes structures proposées sur le potentiel transmembranaire de deux cellules appariées dans le cadre de l'électrofusion.



## **Chapitre 3**

# **Microfabrication**

Dans le chapitre précédent, plusieurs structures de piégeage et d'électrofusion de cellules ont été retenues. Le procédé choisi pour leur réalisation est commun.

Ce chapitre présente les différentes étapes de fabrication des biopuces que nous avons développées. Dans la première partie, une attention particulière est portée à la fabrication des électrodes et des canaux fluidiques, tout en présentant les difficultés rencontrées et les limitations dues aux matériaux et modes de fabrication. Quant à la seconde partie, l'attention est plutôt portée sur les différentes stratégies de scellement (ou packaging) des biopuces.



### **III.1. Fabrication de la biopuce :**

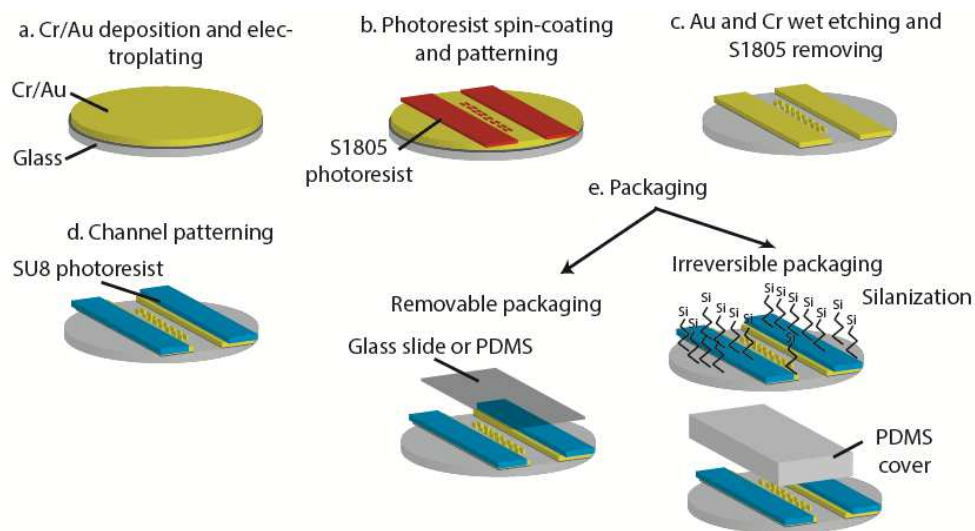
Les simulations numériques, présentées dans le chapitre précédent, ont permis de convenir de structures de piégeage opérationnelles, voire optimisées. Ces dernières ont ensuite été fabriquées en salle blanche. Nous commencerons par présenter un rapide descriptif du procédé global de fabrication, puis, nous nous attacherons à décrire plus précisément quelques points spécifiques.

#### **III.1.1. Résumé du protocole de fabrication :**

Concernant les matériaux utilisés pour la fabrication de la biopuce, ils doivent bien évidemment tous être biocompatibles. Le substrat choisi doit être, dans la mesure du possible, transparent car la majorité des microscopes en laboratoires de biologie sont des microscopes en transmission, la lumière devant alors pouvoir traverser l'échantillon. Le substrat choisi doit donc être de préférence en verre. Les électrodes sont en or car ce métal est largement inerte et biocompatible. Ce matériau noble est très utilisé dans le cadre des applications biomédicales. En plus de son utilisation en chirurgie dentaire, il y a plusieurs applications directes de l'or dans des dispositifs médicaux. Parmi ces applications, nous pouvons citer l'utilisation de fils d'or dans les pacemakers ou d'endoprothèses recouvertes d'or pour le traitement de certaines maladies cardiovasculaires (AZOM 2013). D'autre part, la *chrysothérapie*, ou l'utilisation de composés à base d'or pour le traitement de certaines maladies comme l'arthrite, est un principe reporté depuis 1929 par Jacques Forestier (Forestier 1929). En effet, l'accumulation des « sels d'or » dans l'organisme possède des propriétés anti-inflammatoires. Il existe même des complexes à base d'or ayant des propriétés anti-tumorales (Yong et *al.* 1999). Ce matériau, qui a donc prouvé au fil des années ses propriétés de biocompatibilité, est celui pour lequel nous avons opté pour la fabrication des électrodes des biopuces.

Quant aux canaux, et toute autre partie isolante présente dans la structure, ils sont faits de SU8 (résine époxy transparente, structurable par lithographie et pouvant présenter de hauts facteurs de forme). Enfin, le circuit est recouvert d'un couvercle constitué d'une lamelle de verre ou d'un capot moulé dans un polymère biocompatible (PDMS pour *Poly Di-Méthyl Siloxane*), choisi pour sa facilité de mise en forme. Le PDMS est un polymère présent dans la composition de certains shampoings (comme anti-moussant), des lentilles de contact ou encore d'additifs alimentaires (E900). Depuis le tout début des années 2000, ce polymère connaît un essor dans le domaine de la microfluidique. En effet, tout d'abord introduit par l'équipe de Whitesides en 1996 (Whitesides et *al.* 1996, 1998, 2000) il s'est ensuite

rapidement développé dans d'autres groupes microfluidiques. Le PDMS est apprécié dans ce domaine pour sa simplicité et la rapidité de prototypage qu'il procure pour de très faibles coûts. Par ailleurs, étant transparent aux fréquences optiques, et ayant une auto fluorescence faible, le PDMS facilite l'observation des microcanaux sous microscope. Par ailleurs, sa flexibilité a ouvert la voie à de nombreuses applications (comme les vannes de Quake qui se déforment sous la pression, Quake et *al.* 2000, 2001). De plus, il est perméable au gaz tout en restant étanche, ce qui en fait un matériau de choix en microfluidique appliquée à la biologie (échanges gazeux possibles pour la culture cellulaire). Enfin sa biocompatibilité lui a ouvert la voie dans le domaine de la culture cellulaire.



**Figure 3.1 :** Schéma de principe du protocole de fabrication de la biopuce

Le protocole de fabrication développé peut-être décomposé en 5 principales étapes (figure 3.1) :

a. Une couche d'or de 150 nm est déposée sur un substrat par pulvérisation cathodique. Cependant, ce métal présentant une faible adhérence, une très fine couche de chrome (15 nm) doit être préalablement déposée. Dans le cas où des électrodes plus épaisses sont nécessaires, l'épaissement est réalisé par croissance électrolytique (étape détaillée plus loin).

b. Afin de pouvoir graver les électrodes dans le métal déposé, une étape de photolithographie UV est effectuée à l'aide de S1805 (résine positive) dans ses conditions normales d'utilisation (Jaeger 2002). Les paramètres concernant cette étape sont détaillés dans le tableau 3.1.

c. L'échantillon partiellement protégé lors de l'étape b peut être plongé dans un produit de gravure de l'or : un mélange de KI/I<sub>2</sub>. L'iode (I<sub>2</sub>) réagit avec l'or selon la réaction chimique suivante :



La solubilité de l'iodure d'or (AuI) est améliorée par la présence d'iodure de potassium (KI) (Microchem 2013). Le mélange KI/I<sub>2</sub> n'attaque que l'or, les zones recouvertes de S1805 sont préservées, et l'or gravé seulement dans les zones ne constituant ni électrodes ni contacts électriques. L'échantillon est ensuite rincé deux fois dans de l'eau dé-ionisée (EDI). L'étape suivante consiste à graver la couche restante de chrome dans ces mêmes zones non protégées. Pour cela, l'échantillon est plongé durant 45 secondes dans du « Cr etchant » avant d'être rincé dans de l'EDI.

d. Afin de créer les flancs des canaux fluidiques, et toute autre structure isolante dans la chambre de fusion, une seconde résine photosensible est dispensée sur l'échantillon. Celle-ci est une résine époxy transparente et épaisse : la SU8. Une couche d'environ 25 µm est étalée par centrifugation avant insolation à travers le masque « niveau fluidique » (paramètres détaillés dans le tableau 3.1). Contrairement à la S1805, la SU8 est une résine négative. Ce sont donc les parties insolées qui restent après la phase de révélation. Après cette dernière phase, les canaux sont définis et une étape de recuit à 175 °C durant 30 min est parfois nécessaire pour diminuer les craquèlements et d'assurer la stabilité dans le temps des caractéristiques thermiques de la SU8.

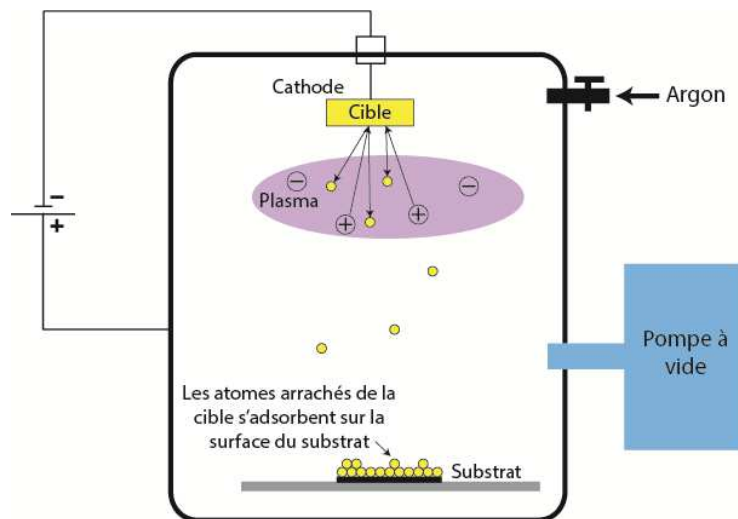
**Tableau 3.1 :** Protocole de lithographie de la S1805 (résine positive) et la SU8 (résine négative) sur quartz

Paramètre	S1805	SU8-2025 ou 3025 sur quartz
Epaisseur obtenue	~ 700 nm	~ 25 µm
Nettoyage avant dépôt	Soufflette N <sub>2</sub>	3 min Acétone, 3 min éthanol, 5 min EDI, N <sub>2</sub> , ~15 min étuve 150°C, 5 min Ozoneur
Dépôt tournette	1000 rpm/1000 rpm.s <sup>-1</sup> /30 sec	Etape 1 : 500 rpm/100 rpm.s <sup>-1</sup> /5 sec Etape 2 : 3000 rpm/500 rpm.s <sup>-1</sup> /30 sec
1 <sup>er</sup> recuit	1 min @ 115°C	3 min @ 65°C, 15 min @95°C, 3 min @ 65°C
Repos	---	~ 30 min
Insolation UV sur MJB3 (365 nm)	64 mJ/cm <sup>2</sup>	Masque Cr : 160 mJ/cm <sup>2</sup> Masque plastique : 240 mJ/cm <sup>2</sup>
2 <sup>nd</sup> recuit	---	3 min @ 65°C, 15 min @95°C, 3 min @ 65°C
Repos	---	Au moins 30 min
Développement	AZ 351 (ratio 1 :5 dans EDI) : 1 min	Développeur SU8 : ~5 min

e. A ce stade, des tests en statique peuvent être effectués sur la biopuce en déposant une goutte de milieu contenant des cellules dans la chambre d'analyse puis en recouvrant celle-ci d'une lamelle de verre. Cependant, afin de mettre en pression les canaux microfluidiques pour des tests en flux, nous avons étudié et développé différentes techniques de scellement détaillées plus loin (section III.2).

### III.1.2. Cas des électrodes fines :

Plusieurs techniques de dépôt de couches métalliques minces existent (Pesty 2013). Les deux principales méthodes de dépôt en phase vapeur physique sont l'évaporation thermique (en chauffant le matériau placé dans un creuset) et la pulvérisation cathodique (figure 3.2).



**Figure 3.2 :** Schéma de principe du dépôt par pulvérisation cathodique

Ne nécessitant pas l'injection d'un gaz pour créer un plasma, l'évaporation thermique est la méthode la plus simple. Elle ne permet cependant pas le dépôt de matériaux fortement réfractaires, et peut produire des couches contaminées par réaction avec le creuset. L'énergie d'incidence des atomes étant de l'ordre de l'énergie thermique ( $10^{-1}$  à  $10^{-2}$  eV), les films sont généralement peu denses et peu adhérents. Quant à la pulvérisation cathodique, étant utilisable pour la majorité des matériaux (même ceux ayant un haut point de fusion) et les couches ainsi formées présentant une bonne adhérence au substrat et un bon recouvrement des marches à haute pression, elle est une méthode très répandue dans l'industrie. C'est cette dernière technique que nous avons aussi choisi d'utiliser.

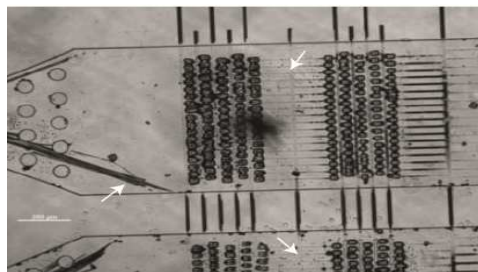
L'utilisation d'électrodes fines facilite le procédé de réalisation, d'autant plus que les fournisseurs de wafers peuvent proposer des substrats pré-déposés.

Nous avons évalué les valeurs de résistances obtenues avec les géométries choisies en utilisant la formule suivante :

$$R_{\text{électrode}} = \frac{L}{\sigma_{\text{métal}} \cdot S} \quad (3.2)$$

avec 'L' la longueur et 'S' la section de l'électrode et enfin ' $\sigma_{\text{métal}}$ ' la conductivité électrique du matériau ( $45 \cdot 10^6$  S/m pour l'or). Dans le cas d'électrodes en or de 1 cm de longueur et 300  $\mu\text{m}$  de largeur, la résistance équivaut à 0.05  $\Omega$  pour une électrode fine (150 nm d'épaisseur) et 0.001  $\Omega$  dans le cas d'une électrode semi-épaisse (5  $\mu\text{m}$ ). Les deux types d'électrodes présentent donc une résistance très faible et n'induisent pas de chute de potentiel significative dans le cadre de ces dimensions.

Nous avons cependant remarqué durant nos expérimentations que les électrodes fines pouvaient être dégradées par l'application répétée de tensions de forte amplitude ou lorsqu'elles sont mises en présence de milieux contenant du sucrose (figure 3.3). Une première dégradation a par exemple été produite à cause d'effets électrochimiques (l'oxydo-réduction des électrodes apparaissant aux fréquences d'alimentation inférieures à 10 kHz). Ces effets sont amplifiés par la conductivité du milieu. Concernant les milieux riches en sucrose, nous pensons qu'il est probable que l'échauffement du milieu durant l'application de fortes tensions puisse provoquer un dépôt sur les électrodes (réaction de Maillard, 1912).



**Figure 3.3 :** Electrodes fines noircies et/ou arrachées (flèches blanches) par l'application répétée de champs électriques de très forte amplitude, dans un milieu contenant du sucrose, et/ou par des pressions fluidiques fortes

Ainsi, il est préférable d'épaissir la couche d'or par croissance électrolytique. Dans ce cas, aucun noircissement ou effet d'arrachement n'a été observé.

### **III.1.3. Cas des électrodes épaisses : dépôt électrolytique d'or**

L'électrodéposition est une technique basée sur l'échange d'électrons entre les ions présents dans la solution électrolytique de dépôt et une surface conductrice. La Centrale Technologique Universitaire d'Orsay (MINERVE) met à disposition un équipement de dépôt électrolytique de cuivre très utilisé pour la fabrication d'électrodes épaisses dans le cadre de

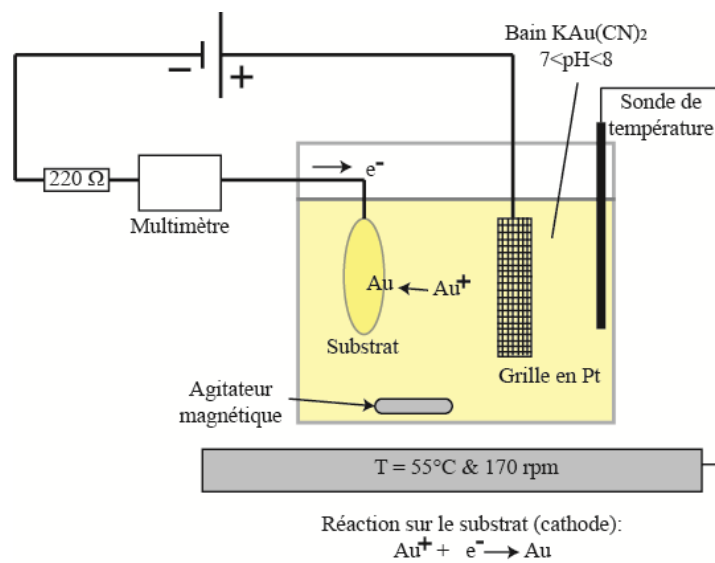
biopuces (Mottet 2009, Villemejeane 2010). Les procédés autour du cuivre ont tout d'abord été développés au sein de l'équipe Micro Nano Bio Microsystèmes (anciennement MINASYS) dans le cadre de la réalisation de micro-bobines (Quemper et al., 2000, Woytasik et al. 2006) puis utilisés pour la fabrication de biopuces (Mottet et al. 2010, Villemejeane 2010). Le processus consiste à d'abord réaliser un moule sur le substrat à l'aide d'une résine photosensible avant d'effectuer une croissance électrolytique. Ainsi, le métal n'est déposé que dans les zones ouvertes de la résine. Le procédé utilisé dans les travaux précités permet de concevoir des électrodes de moins de 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Cependant, la planéité des électrodes ainsi déposées n'est pas assurée à cause d'un effet de bords autour du moule ; ce qui se révèle problématique pour l'étape de scellement de la puce. De plus, l'interface électrode / milieu d'expérimentation est une surface propice aux échanges d'espèces chargées incluant le relargage d'ions métalliques nocifs pour les cellules (Friedrich et al. 1998; Kotnik et al. 2001). D'autre part, certaines études montrent que le cuivre est un matériau à risque dans le cas de l'utilisation *in vivo* ou *in vitro* car dans le cas d'un dégagement de matière, il devient cytotoxique (Gregoire et al. 2009). Il peut donc s'avérer nécessaire d'isoler les électrodes en cuivre grâce à un dépôt de polymère (parylène dans le cas de Villemejeane, 2010). Mais le procédé nécessite des étapes de fabrication supplémentaires (dépôt et gravure du polymère). De plus, la couche de parylène écran le champ électrique. Nous avons donc opté pour l'utilisation d'un matériau plus inerte et plus biocompatible : l'or. En effet, au début de ces travaux de thèse, un équipement de dépôt électrolytique d'or a été mis en place par Claire Dalmay au sein de l'équipe BIOMIS (Dalmay et al. 2011, 2012).

#### a. Dépôt d'or :

Dans le cas de couches minces (<500nm), les techniques précédemment décrites peuvent être utilisées. Dans le cas où l'épaisseur de la couche est importante, les temps de croissance deviennent trop importants par les techniques conventionnelles de la microélectronique. L'or peut alors être déposé par croissance électrolytique sur une surface conductrice (Cr/Au par exemple). Pour cela, nous utilisons un bain à base de cyanure d'or. Il doit donc être utilisé avec précaution. De plus, étant de nature légèrement basique (pH entre 7 et 8), tout produit acide doit être éloigné de la hotte lors du dépôt. L'éthanol doit aussi être éloigné du bain et du matériel de dépôt électrolytique à cause du risque de dégagement de cyanure d'hydrogène (gaz extrêmement toxique) suite à la réaction avec ce solvant.

Une autre conséquence de la nature basique du bain est la difficulté de trouver des résines compatibles. En effet, la majorité des résines de moulage pour dépôts électrolytiques sont

destinées aux bains neutres ou acides (Microchem 2013). Dalmay et *al.* ont pu effectuer des dépôts d'or avec des moules en SU8 (Dalmay et *al.* 2010), mais la SU8 reste une résine difficile à retirer et nécessite le dépôt d'une couche sacrificielle (omnicoat par exemple) pour faciliter son retrait. Nous avons donc décidé de ne pas utiliser le micromoulage mais de réaliser une étape classique de dépôt et gravure, procédé compatible avec les dimensions mises en jeu. Certes le dépôt d'or en pleine plaque induit une perte de matériau précieux, néanmoins, contrairement aux dépôts à l'aide de moules, cette technique assure une bonne planéité de la couche (différence d'épaisseur d'environ 5% entre le bord et le centre de l'échantillon 2 pouces). Le schéma de principe du dépôt électrolytique d'or est présenté en figure 3.4.



**Figure 3.4 :** Schéma de principe du dépôt électrolytique d'or

Durant le dépôt, l'échantillon est connecté à la cathode et plongé dans le bain à base d'aurocyanure de potassium ( $KAu(CN)_2$ ). Une grille en platine immergée est quant à elle reliée à l'anode. Les ions  $Au^+$  présents dans l'électrolyte migrent vers l'échantillon (substrat conducteur grâce au pré-dépôt d'une fine couche d'or) et réagissent à sa surface formant des atomes Au, si le potentiel est supérieur au potentiel de décharge de l'ion. La température du bain, maintenue à  $55^\circ C$ , et une légère mais constante agitation assurent le renouvellement de l'électrolyte à la surface du substrat. La vitesse et la rugosité du dépôt dépendent de la densité de courant injecté. La masse  $m$  d'or déposée peut se calculer selon la loi de Faraday :

$$m = \frac{1}{F} \frac{M}{n_e} \sum_j I_j t_j \quad (3.3)$$

avec  $F$  la constante de Faraday (96.485 C/mole),  $M$  la masse molaire (196,97 g/mole pour l'or),  $n_e$  le nombre d'électrons échangés (1 seul dans notre cas pour le couple Au/Au<sup>+</sup>),  $I$  le courant appliqué et  $t$  la durée du dépôt. La formule (3.4) donne l'épaisseur  $h$  déposée:

$$h = \frac{m}{\rho \cdot S} \quad (3.4)$$

où  $\rho$  est la densité (19.250 kg/m<sup>3</sup> pour l'or) et  $S$  la surface (19,6 cm<sup>2</sup> dans le cas d'un wafer 2 pouces). Nous pouvons calculer la vitesse de dépôt attendue dans le cas où l'efficacité de courant est de 100%, c'est-à-dire que l'ensemble des charges injectées participent à la décharge des ions Au<sup>+</sup>.

Ainsi pour une densité de courant de 1,5 mA/cm<sup>2</sup>, la vitesse de dépôt attendue sur un substrat 2 pouces est de 100 nm/min (donc dépôt de 6 µm en 1 h pour  $I = 30$  mA). A cette densité de courant, la rugosité de surface est faible. Notons que la rugosité la plus faible (~ 13 nm) a été obtenue pour une densité de courant de 0,75 mA/cm<sup>2</sup>. Cependant, la vitesse de dépôt dans ce cas est divisée par deux et peut être problématique pour des dépôts épais (plus de 8 h de dépôt pour obtenir 25 µm d'épaisseur). Nous avons donc opté pour une densité de courant de 0,75 mA/cm<sup>2</sup> dans le cas de dépôts inférieurs à 5 µm, et de 1,5 mA/cm<sup>2</sup> dans le cas contraire.

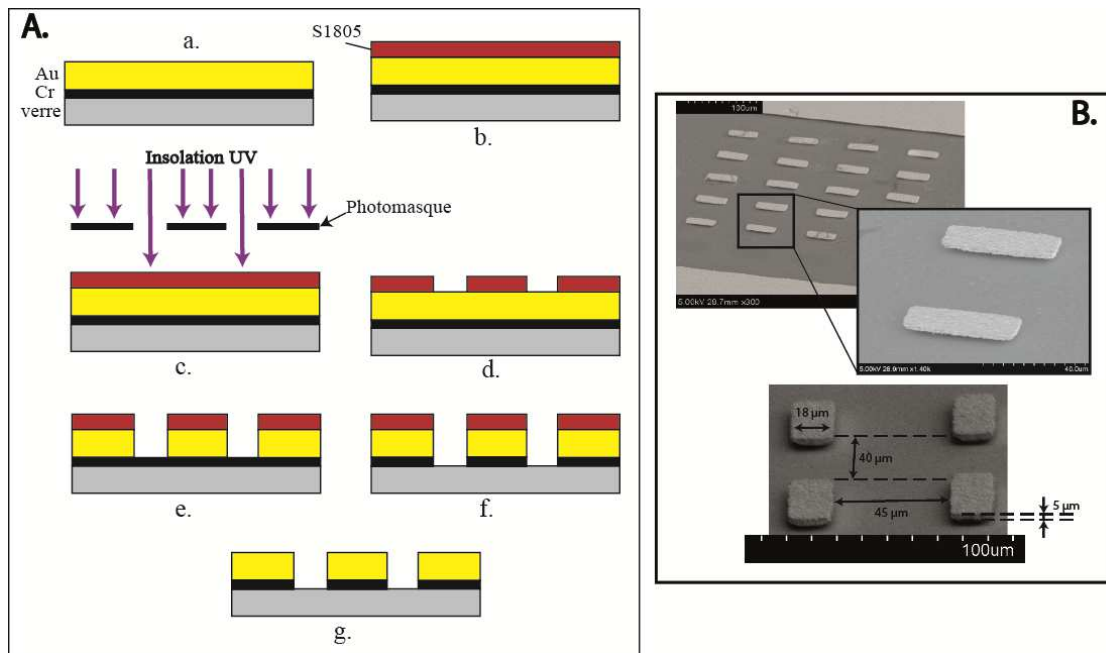
Dès que le bain est à la bonne température, le dépôt peut commencer selon le cycle suivant :

- 3 min à 0,07 mA/cm<sup>2</sup> (nettoyage de la surface)
- 3 min à 0,35 mA/cm<sup>2</sup>
- Aussi longtemps que nécessaire à 15 mA ou 0,75 mA/cm<sup>2</sup> (1 µm déposé toutes les 20 min sur substrat 2 pouces)

Lorsque le dépôt est terminé, l'échantillon est nettoyé sous un filet d'eau durant quelques minutes.

L'étape suivante consiste à définir les électrodes dans le métal déposé. Pour cela une première étape de photolithographie est nécessaire. La figure 3.5 rappelle les étapes de photolithographie et présente des photographies effectuées en Microscopie Electronique à Balayage (MEB)





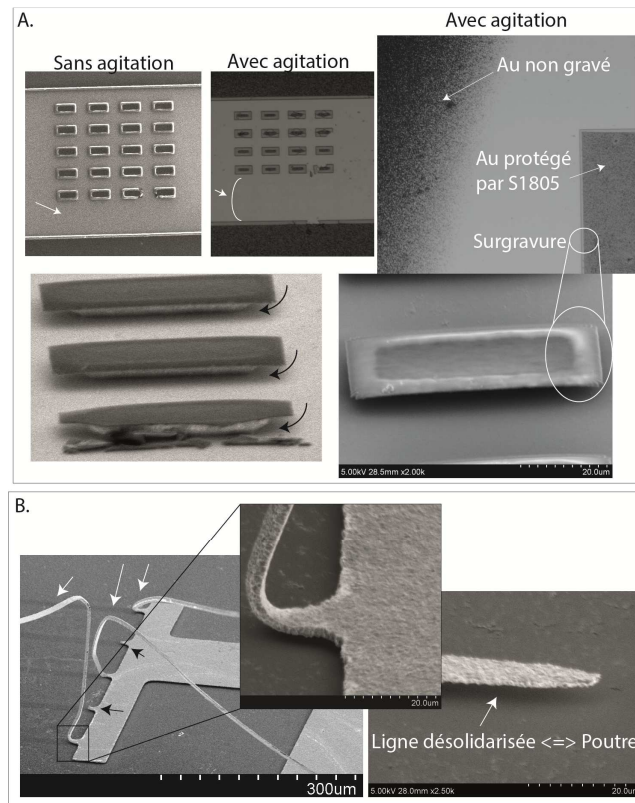
**Figure 3.5 :** A. Photolithographie après dépôt d'or (a. Echantillon après dépôt électrolytique d'or, b. Dépôt et recuit de S1805, c. Insolation UV à travers le masque « électrodes », d. Développement de la résine, e. Gravure  $KI/I_2$  d'or, f. Gravure au 'Cr etchant' du Cr, g. retrait de la résine et nettoyage de l'échantillon). B. Images du résultat au Microscope Electronique à Balayage.

### *b. Gravure d'électrodes épaisses :*

Après l'étape de photolithographie (figure 3.5.d), une fine couche de résine photosensible S1805 protège les électrodes pour la prochaine étape de gravure. Il peut s'avérer nécessaire de retirer un excès de résine au bord de l'échantillon.

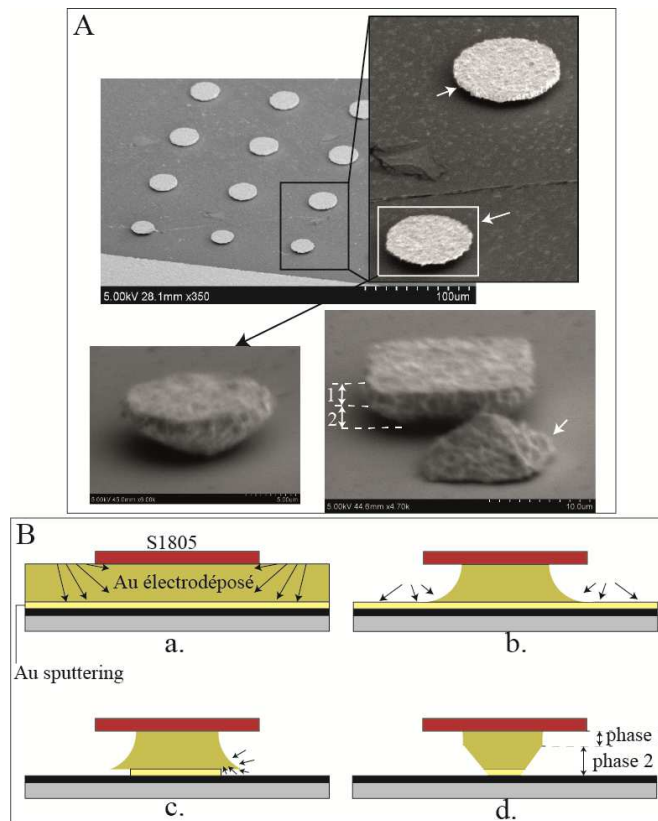
L'étape suivante consiste à plonger l'échantillon dans une solution de  $KI/I_2$  afin de graver, selon la réaction chimique (3.1), l'or non protégé par la résine. Pour accélérer le procédé de gravure dans le cas d'électrodes épaisses, il est possible d'effectuer cette étape dans un bain-marie afin de contrôler la température à 50 °C. Nous savons que l'utilisation d'un procédé chimique induit une gravure de type quasi-isotrope. Celui-ci peut également induire de la surgravure, ce qui est effectivement observé (figure 3.6.A et schéma en figure 3.7.B.b). Il s'est avéré que sans agitation, les zones où la surface de gravure est grande sont très lentement révélées. Ceci est dû à la grande consommation de l'iode qui se voit rapidement diminuer. L'agitation durant le procédé permet de renouveler ces espèces, réduisant le temps de gravure. En contrepartie, les motifs plus petits sont largement sur-gravés (figure 3.6.A. en haut à droite, perte de 2 lignes de plots avec agitation). Nous avons donc préféré effectuer la gravure sans agitation pour limiter l'arrachement des petits motifs (figure 3.6.A, sans agitation, une seule ligne manque) et arrêter le processus dès que les électrodes connectées sont libérées des

courts-circuits. Il est important de noter que malgré ces précautions, les motifs étroits (~10  $\mu\text{m}$ ) et longs (type lignes) sont tellement sur-gravés qu'ils forment des poutres flottantes et sont parfois arrachés de la surface (figure 3.6.B).



**Figure 3.6 :** Effet de la sur-gravure de l'or. A. Photos avant le retrait de la résine. La sur-gravure est plus importante avec une agitation (perte de 2 lignes de motifs au lieu d'une seule sans agitation). Le motif peut se deviner sous la résine et semble plus étroit à la base qu'au sommet. B. Désolidarisation (flèches blanches) et arrachement (flèches noires) des lignes d'or résultant d'une forte sur-gravure

La figure 3.7 met en évidence la sur-gravure de plots ronds et carrés. Nous pouvons voir en figure 3.7.A (en haut à gauche) que, bien que les motifs soient identiques sur le masque, la sur-gravure est plus importante près de la « grande » électrode. En effet, les espèces de gravure n'étant pas consommées par cette grande surface, elles s'attaquent aux motifs les plus proches. De plus, il semblerait que, plus les motifs sont gravés, plus leur bord est fin (flèches blanches). Cet aspect est plus visible de profil (figure 3.7.A. bas). Le plot fortement sur-gravé ne tient plus que sur une pointe et est souvent arraché (plot pyramidal s'étant retourné à droite) alors que pour un plot un peu plus grand, deux phases de gravure apparaissent : en haut du plot et à sa base.



**Figure 3.7 :** Evolution de la sur-gravure de l'or. A. Clichés MEB démontrant une sur-gravure plus importante près d'une frontière de résine (ligne de plots plus petits, bien qu'ils aient tous la même taille sur le masque). B. La gravure s'effectue en 2 phases. Lorsque la couche déposée par pulvérisation cathodique est atteinte (b) elle est plus rapidement gravée et la couche déposée électrolytiquement se retrouve très rapidement attaquée par le dessous (c) provoquant ainsi 2 phases de gravure (d). Si la gravure continue, le profil en pyramide inversée est produit, provoquant le décollement du plot du Cr.

La présence des deux phases est due à la différence entre les vitesses de gravure des deux matériaux « or pulvérisé » et « or électrodéposé ». En utilisant une solution  $KI/I_2$ , la vitesse de gravure de l'or *pulvérisé* est de 1000 nm/min alors qu'elle est d'environ 300 nm/min pour l'or *électrodéposé*. Cette différence peut être expliquée par la nature poreuse des dépôts électrolytiques. Les pores dans ce matériau peuvent retenir l'iodure d'or ( $AuI$ , produit de la réaction de gravure) conduisant à une vitesse plus faible que pour un matériau déposé par pulvérisation. Par ailleurs, il est possible que l'iodure d'or, peu soluble, se redépose formant un masque qui bloque la gravure.

Ne pouvant pas graver tous les motifs, nous avons choisi d'arrêter cette dernière dès que les électrodes sont libérées. Ainsi, deux phases peuvent apparaître dans le cas d'électrodes semi-épaisses (figure 3.7.B). En effet, le temps d'atteindre la sous-couche conductrice, la gravure est isotrope, mais les différences de vitesse induisent une sur-gravure plus importante et un

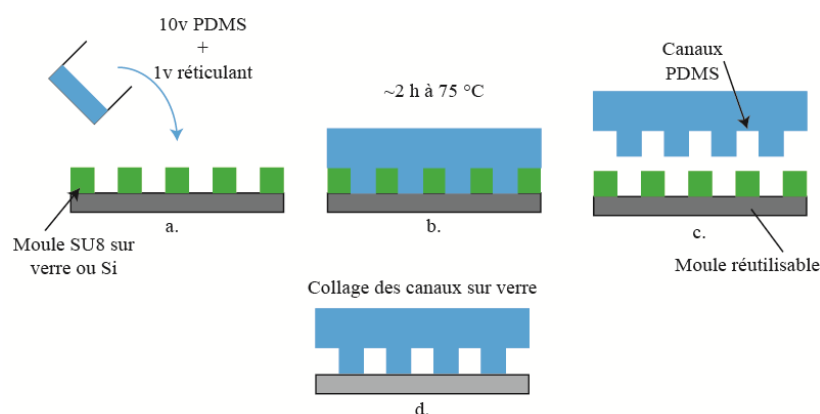
profil inversé. C'est pour cela que, dans le cas où la gravure est effectuée sous agitation, les motifs sont gravés plus vite, les lignes longues désolidarisées formant des poutres, et les petits plots facilement arrachés. Nous pourrions penser qu'il faudrait simplement diminuer le temps de gravure. Dans ce cas, les grandes surfaces de gravure ne seraient pas déconnectées et toutes les électrodes seraient court-circuitées. Ainsi, il devient difficile de libérer les connections dans les grandes zones sans perdre les petits plots des canaux. En effet, ayant des densités de motifs différentes sur une même puce, la vitesse de gravure au sein d'un même échantillon est différente :

- zones sans motifs où l'or doit être entièrement gravé : les espèces de gravure étant consommées, la gravure des couches profondes d'or devient de plus en plus lente,
- zones où la présence de motifs consomme moins d'espèces de gravure et toute la profondeur d'or peut être gravée rapidement.

Une des solutions envisagée pour limiter ces effets, sans avoir à utiliser de moule, est d'ajouter des motifs fantômes (motifs leurres) non connectés, dans les zones non utilisées afin de moins perturber la gravure. Il est aussi recommandé de réduire l'épaisseur des électrodes à moins de 3  $\mu\text{m}$  pour réduire l'écart de cinétique entre les zones et limiter l'effet « pyramide inversée ». Néanmoins, la taille des plots reste le critère essentiel dans le choix de l'épaisseur d'or maximale.

#### III.1.4. Microfabrication des canaux fluidiques :

Très souvent, les canaux microfluidiques sont réalisés en PDMS en suivant le procédé présenté en figure 3.8.



**Figure 3.8 :** Procédé de fabrication de canaux par moulage du PDMS.

Le PDMS, trop visqueux sous sa forme originale, est mélangé à un réticulant en un ratio volumique 1:10 pour obtenir un PDMS réticulé par la suite. Le mélange est tout d'abord

effectué à la main puis aux ultrasons durant 10 min. Enfin, pour enlever un maximum de bulles, ce dernier est placé sous cloche à vide durant 20 à 30 min. Lorsque le mélange est prêt, il est versé sur un moule négatif (figure 3.8.a) ayant été exposé à des vapeurs de HMDS (Héxa Méthyl DiSiloxane) pour faciliter le démoulage. Le moule est en général fait en SU8 (résine à haut facteur de forme) ou en silicium dans le cas de moules à très hauts facteurs de forme. Des résolutions nanométriques sont possibles (Hua et *al.* 2004). Cependant, les moules en silicium sont plus coûteux à fabriquer car, contrairement aux procédés SU8, ils nécessitent l'utilisation d'une machine de gravure ionique profonde (DRIE).

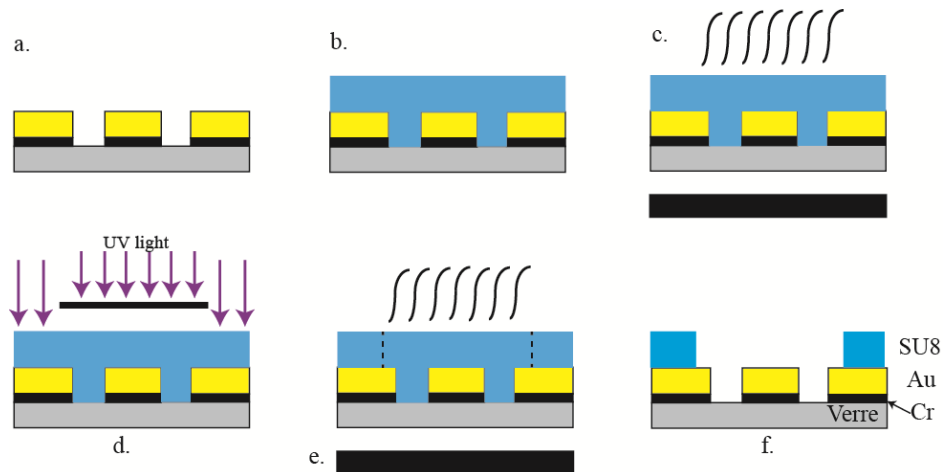
Le PDMS est ensuite placé à 75°C durant 2h pour réticulation (figure 3.8.b) et pelé pour récupérer les canaux ainsi moulés (figure 3.8.c). Le traitement HMDS du moule facilite le décollement du PDMS réticulé et assure un moule propre en fin de procédé. Ce dernier peut donc être répété un grand nombre de fois en utilisant le même moule. Enfin, les canaux souples en PDMS sont collés sur un substrat pour fermer la puce. En général, pour garder une transparence complète, le PDMS est collé sur du verre après traitement au plasma d'oxygène. Ce procédé de fabrication est de nos jours très utilisé en microfluidique pour son faible coût et sa rapidité. Cependant, dans le cas de plusieurs niveaux (électrodes + canaux) il est très difficile d'aligner manuellement les deux substrats car leur contact doit être effectué très rapidement. Nous avons donc choisi un autre procédé, utilisant de la résine SU8, étant donné qu'il ne nécessite pas d'alignement manuel des deux niveaux. Le PDMS sera uniquement utilisé pour le scellement des canaux qui ne sauraient rester ouverts dans le cadre de certaines applications. Le procédé de scellement que nous avons développé ne nécessite pas d'alignement précis. Il est décrit dans la section III.2 de ce chapitre.

En ce qui concerne la fabrication des flancs des canaux, la résine SU8 est intéressante car elle peut être utilisée pour des épaisseurs allant de 2 à 200  $\mu\text{m}$ , et est donc particulièrement bien adaptée à la taille des cellules visées. Cependant, la SU8 présente une faible adhérence au verre (dans notre cas, la résine ne peut supporter une étape de développement). L'adhérence est meilleure sur le silicium dont l'utilisation est malheureusement incompatible avec le type de microscopie utilisée (transmission). Un promoteur d'adhérence améliore ce fait, mais complique le procédé de fabrication. Le quartz nous a semblé être une alternative intéressante car il est transparent et présente une adhérence même meilleure que celle du silicium (tableau 3.2). Dans la mise en œuvre, nous devons cependant prendre quelques précautions de nettoyage avant le dépôt de la SU8 et augmenter les temps de recuits par rapport à ceux obtenus sur silicium, la conductivité thermique du substrat en quartz étant plus faible.

**Tableau 3.2 :** Contrainte de cisaillement de la résine SU8 (série 2000) sur différents matériaux (adapté de Microchem 2013)

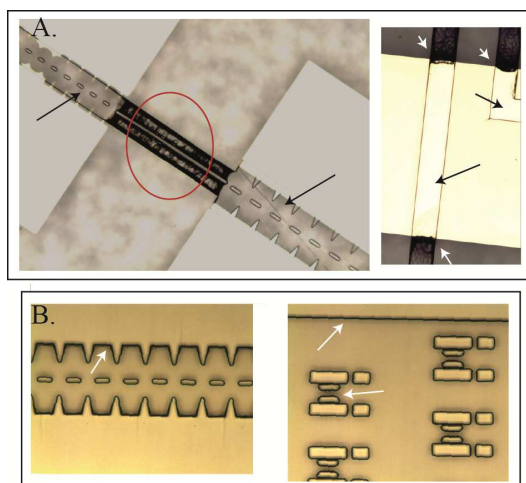
Substrat	Si	Au	Verre	Verre/ HMDS	Verre/promoteur d'adhérence	Quartz
Contrainte (MPa)	53	29	faible	faible	92	61

Le protocole utilisé pour la structuration de la SU8 est résumé dans la figure 3.9. En partant de l'échantillon contenant les électrodes en or, la SU8-2025 (ou 3025) est déposée à hauteur de 25µm à l'aide d'une tournette. La résine étant très visqueuse, un dépôt en 2 temps est effectué. Les paramètres utilisés sont détaillés dans le tableau 3.1. Le bourrelet de résine à la périphérie de l'échantillon est ensuite enlevé afin de permettre le contact intime de la résine avec le masque, limitant ainsi les pertes de résolution.



**Figure 3.9 :** Procédé de fabrication des canaux en SU8. A. Electrodes gravées, b. Enrésinement de SU8-2025, c. *Soft bake*, d. Insolation de la résine, e. *Post-exposure bake*, f. Développement de la SU8.

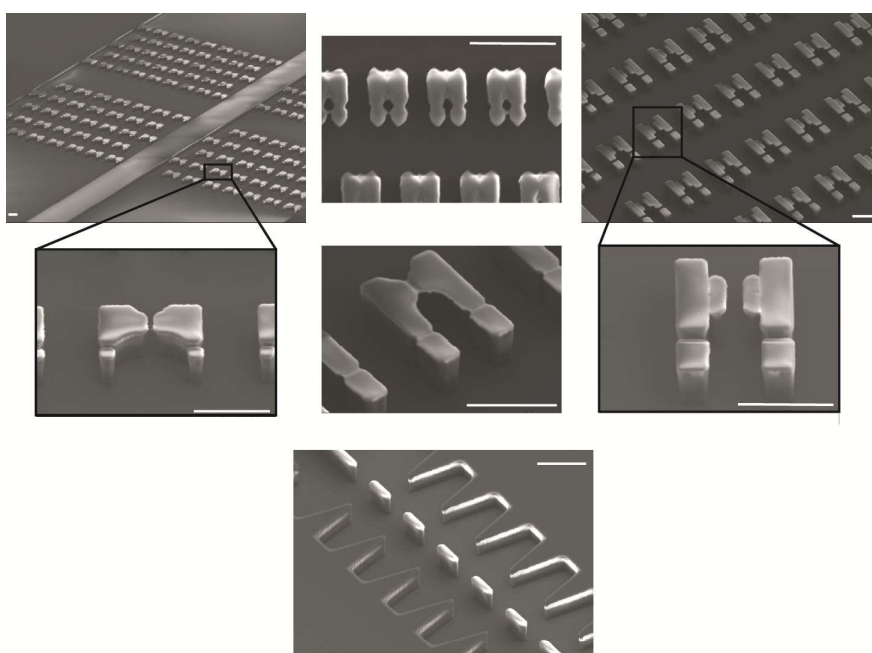
Notons que la réflexion de la lumière par le porte-substrat est également une cause de perte de résolution. La lumière passant à travers le masque pour insoler la résine traverse celle-ci et la réticule. Ces rayons traversent ensuite le substrat transparent et sont réfléchis par le porte-substrat avant d'être diffractés une seconde fois par le quartz. Ainsi, la résine est insolée de différents côtés et même dans le canal. La SU8 étant une résine négative, ce qui est insolé reste après développement. Ainsi, des résidus de SU8 semblent subsister au fond du canal sans pouvoir être développés. Cette résine involontairement insolée n'est pas présente sur l'or ou dans les zones bordées d'électrodes (figure 3.10.A) car le métal absorbe la lumière évitant ainsi la diffraction vers la SU8.



**Figure 3.10 :** Exemples de réalisation de SU8 sur quartz. A. Sur le porte-substrat réfléchissant les UV, la lumière diffractée par le substrat transparent insole la SU8 sur les côtés du masque, provoquant l'insolation du fond du canal (cercle rouge à gauche et flèches blanches à droite). Cette sur-insolation n'est pas visible sur l'or ou à proximité, probablement car ce dernier absorbe les UV (frontière nette). B. En utilisant un filtre absorbant les UV sur le porte-substrat, les motifs sont bien définis même en absence d'or.

Afin de remédier à ce problème, nous avons utilisé un film absorbant 90% des UV directement sur le porte substrat. Grâce à cela, nous avons pu obtenir des motifs en SU8 sur quartz de bonne résolution sur l'ensemble de la biopuce.

Après l'alignement des deux niveaux (électrodes et masque « canaux ») et l'insolation de la SU8, un recuit (*post-exposure bake*) est effectué en 3 étapes. Enfin, les canaux sont révélés dans le solvant approprié (développeur SU8).



**Figure 3.11 :** Résultats de structuration de la SU8, images MEB (barres d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ )

Dans ces conditions, il nous a été possible de réaliser des motifs en SU8 de l'ordre de 2 à 3  $\mu\text{m}$  (figure 3.11) de manière reproductible. Par contre, comme attendu, il est difficile d'obtenir de manière fiable des motifs de plus faibles dimensions.

A ce stade du procédé de fabrication, nous avons obtenu des flancs de canaux munis d'électrodes métalliques. Nous allons maintenant nous intéresser à l'étape permettant l'utilisation de la biopuce sous flux : le capotage, ou encore *packaging* de la puce.

### **III.2. Packaging :**

Lorsque les applications visées concernent la mise en œuvre de cellules biologique, deux types de dispositifs peuvent être utilisés. Si l'on est en régime statique, il suffit souvent de déposer une goutte de liquide dans la chambre de l'échantillon et de capoter celle-ci avec une lame de verre plaquée contre l'ouverture. Dans le cas d'études dynamiques, un capot en PDMS collé chimiquement au substrat support est préféré. Si l'on ne prend pas de précaution particulière, le collage entre les deux pièces est souvent irréversible ce qui ne facilite pas le nettoyage de la puce et peut limiter le dispositif à un usage unique. Un collage réversible permettant un nettoyage facilité peut alors être préféré. Ce sont ces deux configurations que nous allons expliciter ici.

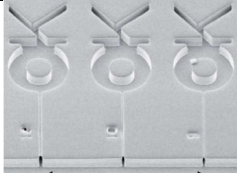

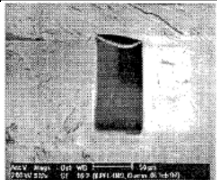
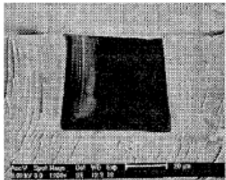
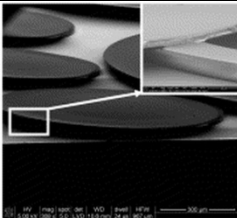
#### **III.2.1. Packaging irréversible PDMS/SU8**

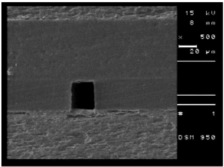
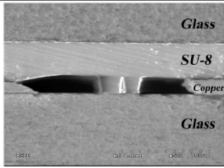
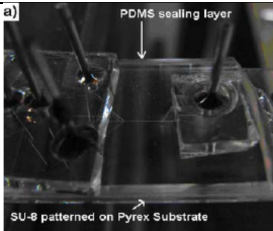
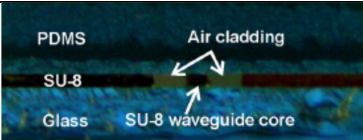
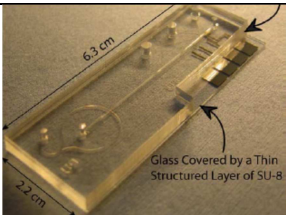
##### **a. Les différentes techniques de packaging SU8 :**

Depuis le développement de la technologie PDMS au début des années 2000 (Whitesides et *al.* 2002), la majorité des puces microfluidiques sont constituées de canaux en PDMS collés sur du verre à l'aide d'un traitement plasma  $\text{O}_2$ . Dans notre cas, les flancs des canaux sont réalisés en SU8. Le tableau 3.3 présente une étude bibliographique des principales méthodes de fabrication de canaux en SU8 « fermés ». Le collage PDMS-SU8 est nettement moins rapporté dans la littérature.



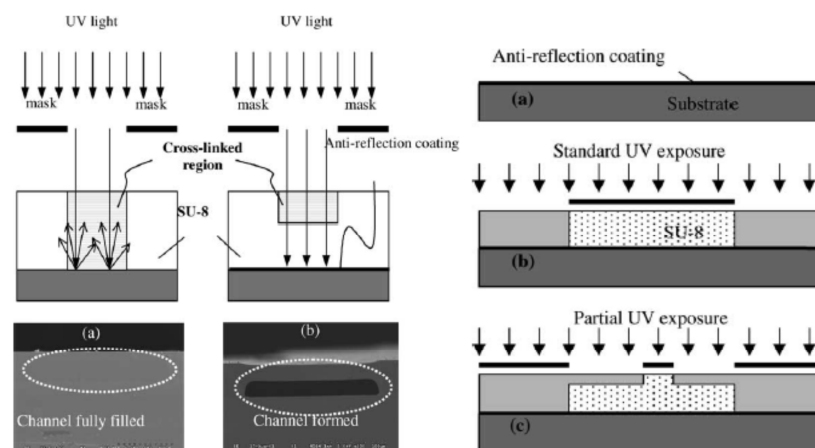
**Tableau 3.3 :** Tableau récapitulatif des différentes techniques de scellement de canaux en SU8

Capot	Methodes	Exemple	Avantages	Inconvénients	Référence
SU8	Photolithographie 3D par lithographie en projection et effet 'diabolo'		+ Transparent + Une seule étape	- Contrôle difficile de la dose d'insolation - Système de lithographie spécifique	Larramendy et al. 2012
SU8	Photolithographies successives de 2 couches de SU8, et utilisation d'une couche anti-reflets.		+ Transparent	- Peu reproductible, particulièrement pour de longs canaux - Difficulté du contrôle de la dose - Difficile à développer	Chuang et al. 2003
SU8	Photolithographies successives de 2 couches de SU8 isolées par une couche métallique.		+ Reproductible	- Non transparent	Alderman 2001 Guerin 1997
SU8	Protection des canaux avec un matériau sacrificiel non photosensible durant le bonding		+ Transparent + Araldite facile à retirer	- Difficulté du retrait de la résine non photosensible particulièrement pour de longs canaux - Rétrécissement de la hauteur de canal - Résine sacrificielle parfois non biocompatible - Peu reproductible	Guérin 1997 Metz 2004 Ling 2007
SU8	Hard bonding avec de la SU8 sur du verre puis retrait de ce dernier		+ Transparent	- Nécessite une très bonne planeité à cause de la rigidité du verre	Murillo 2010 Georgel 2008

Verre	Bonding avec de la SU8 comme adhésif Pression manuelle durant le bonding.		+ Transparent + Simple + Appareil de bonding non nécessaire	- Nécessité de canaux de fuite de la SU8 - Difficulté de contrôle - Nécessite une très bonne planeité à cause de la rigidité du verre	Tuomikoski 2005 Jackman 2001
Verre	SU8 sec comme adhésif (lamination ou hard bonding)		+ Transparent	- Process long et cher - Nécessité d'une haute pression (Hard bonding machine) - Peu reproductible	Mottet 2010 Abgrall 2006 Salomon et al. 2011
PDMS	Silanisation liquide du capot en PDMS		+ Reproductible + Pas de pression + Transparent + Economique	- Déformation possible du PDMS à cause de sa porosité - Impossibilité de hard baking de la SU8	Zhang 2009 Watts 2012
PDMS	Traitement plasma N <sub>2</sub> sur le capot en PDMS		+ Reproductible + Simple + Transparent	- Nécessité d'un machine à plasma N <sub>2</sub> - Impossibilité de hard baking de la SU8	Zhang 2011
PDMS	Silanisation vapeur de la SU8		+ Reproductible + Transparent	- Silanisation longue dans une machine spécifique	Talaei 2009

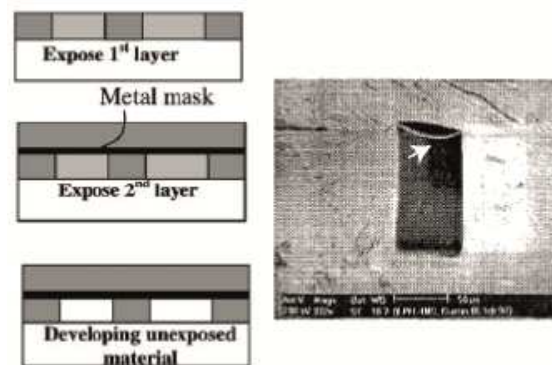
Comme l'indique le tableau 3.3, plusieurs types de capots pour le packaging de structures en SU8 ont été développés durant la dernière décennie. Une première approche consiste à constituer le canal et son capot en une seule étape. Pour cela, l'équipe de Nicu a conçu une méthode basée sur la lithographie en projection où l'image du masque, maintenu à 1 m du substrat, est optiquement projetée sur l'échantillon. En exploitant un effet optique (effet diabolique), il leur est possible de contrôler l'insolation selon la profondeur de SU8. Ainsi, il est possible de fabriquer des canaux en SU8 scellés en une seule étape (Larramendy et *al.* 2012). Néanmoins, cette méthode nécessite un système de lithographie spécifique. De plus, le contrôle de la dose est primordial pour éviter de boucher les entrées/sorties tout en scellant le canal par le dessus.

Une autre option consiste à déposer 2 couches successives de SU8. La première couche est déposée et insolée pour constituer les canaux. Afin d'éviter de remplir ces derniers avec la résine qui constituera le capot, l'équipe de Chuang a décidé de déposer la seconde couche de SU8 avant le développement des canaux (Chuang et *al.* 2003). Cependant, lors de l'insolation de la 2<sup>nd</sup>e couche, il est important de ne pas insoler une seconde fois la couche « canaux ». Or, lors d'une insolation classique, l'exposition des couches profondes de résine est en fait due à la réflexion des photons sur l'interface résine/substrat car la SU8 filtre les UV (figure 3. 12). Ainsi, en appliquant une couche antireflet sur le substrat, les rares photons qui traversent la totalité de la couche de SU8 sont absorbés et seulement la partie supérieure est correctement réticulée. En utilisant ce principe et en adaptant la dose d'UV, Chuang a réussi à créer des canaux de SU8 enterrés sous une couche de SU8 sans boucher le canal. L'échantillon est ensuite développé en entier.



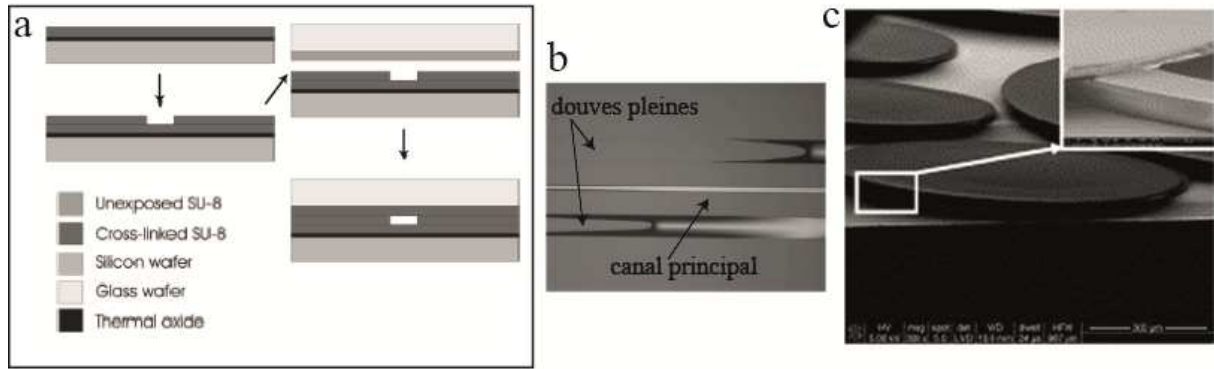
**Figure 3. 12:** Principe de fabrication de canaux enterrés en SU8 grâce au contrôle de la dose d'UV (Chuang et *al.* 2003)

Cette technique permet même de créer des structures 3D totalement transparentes en SU8. Cependant, il est difficile de développer correctement les couches enterrées et de libérer les canaux sur de grandes dimensions. De plus, le contrôle de la dose d'UV et de l'épaisseur insolée reste difficile. Une autre technique, plus simple à mettre en œuvre, se base sur le recouvrement des canaux, pas encore développés, par une seconde couche de SU8 (figure 3. 13). Afin d'éviter une seconde insolation des canaux, une couche métallique est déposée sur les canaux avant le 2<sup>nd</sup> dépôt.



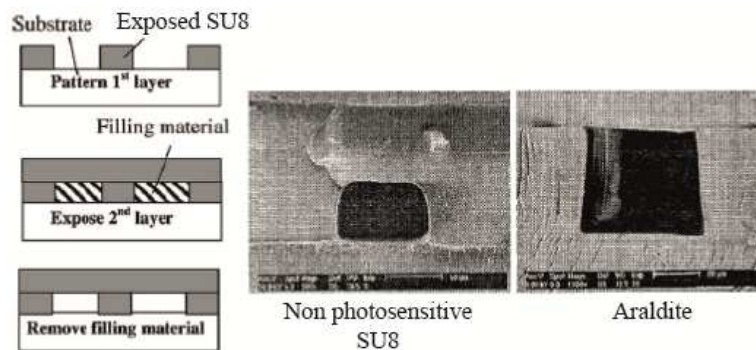
**Figure 3. 13:** Principe de fabrication de canaux enterrés en SU8 grâce à une métallisation intermédiaire (le reste de la métallisation après développement de la résine est indiqué par une flèche blanche) (Alderman et *al.* 2001, Guérin et *al.* 1997).

Cette dernière technique a le mérite d'être reproductible et bien plus simple à mettre en œuvre. Cependant, la présence de la couche métallique rend le dispositif opaque ce qui est problématique pour des observations en microscopie en transmission. De plus, ces dispositifs présentent toujours la difficulté du développement des canaux enterrés. Afin d'éviter ce problème, il est possible de packager des canaux déjà développés (Jackman 2001, Tuomikoski et *al.* 2005, Murillo et *al.* 2010, Georgel et *al.* 2008). Ici, une fine couche de SU8 est déposée sur du verre puis collée sur les canaux en SU8 (figure 3. 14). Une pression peut-être nécessaire durant le collage à cause de la rigidité des deux parties. La couche adhésive de SU8 est ensuite insolée à travers le verre puis recuite afin d'assurer le collage. Le verre peut également être retiré par la suite pour ne laisser que la SU8 recouvrir les canaux (Murillo et *al.* 2010). Cette méthode est intéressante mais peut présenter des problèmes d'étanchéité. En effet, la technique est fortement dépendante de la planéité de la surface de SU8. De plus, la SU8 du dessus pouvant remplir les canaux, il est nécessaire de prévoir des fossés sur les côtés du canal principal pour les débordements de SU8.



**Figure 3. 14:** a. Scellement de canaux en SU8 après développement. b. La SU8 non réticulée est utilisée comme couche d'adhésion, mais des douves de sécurité doivent être prévues sur les côtés du canal principal (Tuomikoski et *al.* 2005). c. Le verre du capot peut être retiré à la fin du process (Murillo et *al.* 2010)

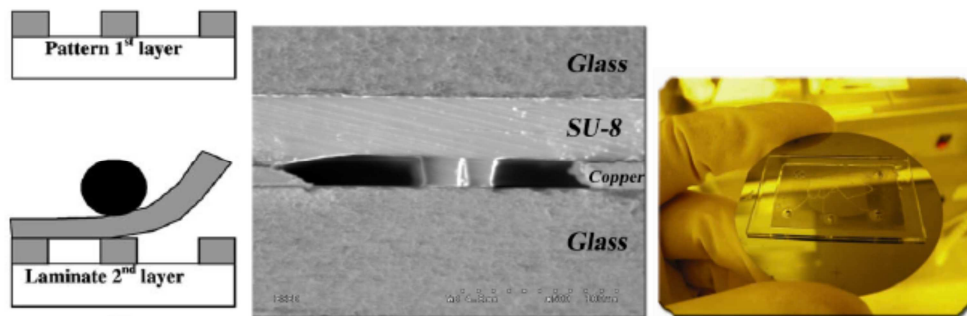
Afin de protéger le canal, il est possible de remplir ce dernier par une couche sacrificielle de matériau non photosensible en attendant la 2<sup>nde</sup> insolation (figure 3.15). Guérin a par exemple rempli le canal d'une résine SU8 devenue insensible aux photons ou encore rempli d'Araldite (Guérin et *al.* 1997). Dans le 1<sup>er</sup> cas, il s'est avéré qu'une diffusion de molécules photosensibles s'opérait entre le capot en SU8 et la cavité, provoquant un rétrécissement de la hauteur du canal car la couche supérieure du remplissage se trouvait réticulée lors de la seconde insolation. De son côté, l'Araldite se met assez facilement en œuvre, mais n'est pas certifiée biocompatible. Metz et *al.* ont quant à eux rempli le canal de PPC (Poly(Propylene) Carbonate) ou de PEC (Poly(Ethylene) Carbonate) (Metz et *al.* 2004). Cependant, le retrait d'un produit de remplissage d'un canal enterré n'est pas chose aisée.



**Figure 3. 15:** Méthode de scellement des canaux SU8 par une autre couche de SU8 et protection des canaux par remplissage sacrificiel (Guérin et *al.* 1997)

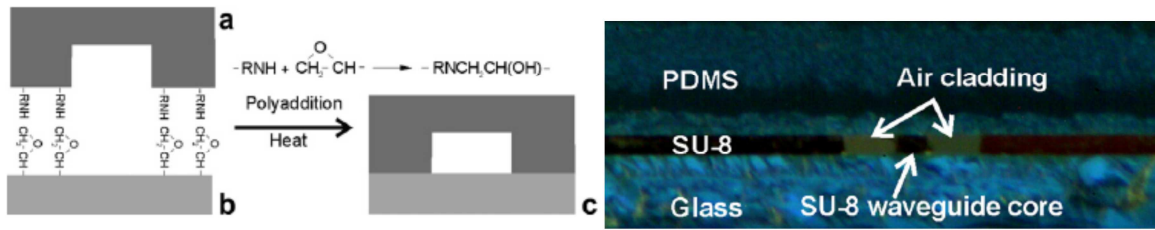
Enfin, une dernière technique s'affranchissant du problème de vidange des canaux ou de leur pollution par un produit externe lors du procédé, est l'utilisation d'un film sec de SU8 (figure 3.16). La méthode consiste à appliquer par lamination ce film sec sur les canaux déjà développés (Abgrall et *al.* 2006, Mottet et *al.* 2010, Salomon et *al.* 2011). Un capot de verre

est ensuite collé sur les canaux en utilisant le film de SU8 comme adhésif. A cause de la rigidité des deux parties, l'utilisation d'une machine de pression à haute température est nécessaire pour le collage.



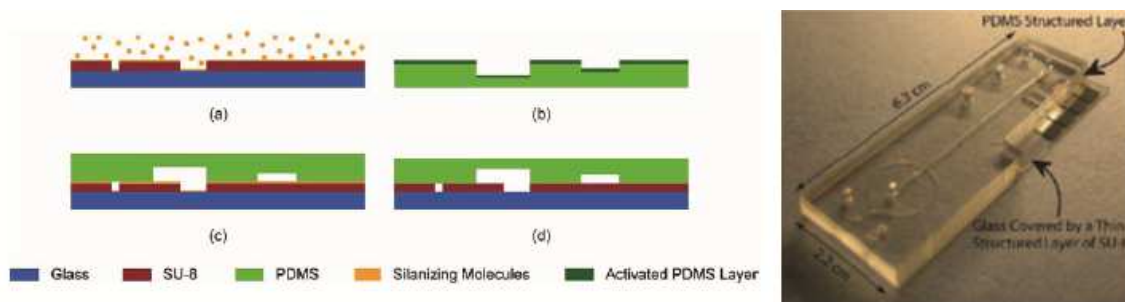
**Figure 3. 16:** Scellement de canaux SU8 par lamination d'un film mince de SU8 sec (Abgrall et *al.* 2006, Mottet et *al.* 2010)

Afin de s'affranchir des inconvénients que procurent les capots rigides (utilisation d'une pression sous vide dans une machine spécifique), l'utilisation de capots souples comme le PDMS a commencé à être explorée depuis peu. En effet, le PDMS étant mou, une légère pression sur ce dernier permet d'épouser les irrégularités d'une surface sans remplir les canaux d'un quelconque matériau. Le PDMS est connu pour son adhésion forte avec le verre grâce au traitement plasma d'oxygène. Malheureusement, bien que Jeon et *al.* (Jeon et *al.* 2004) aient reporté un packaging SU8/PDMS simplement en utilisant un traitement plasma sur les deux surfaces, nous n'avons pas pu reproduire au laboratoire le collage décrit. Il semblerait que cette méthode de collage soit fortement dépendante du vieillissement de la SU8 et du PDMS et donc peu reproductible. Par contre, un traitement chimique du PDMS permet un collage efficace et simple avec de la SU8. L'équipe Zhang a obtenu une adhérence de bonne qualité en exploitant la réaction amine-époxyde entre les groupements époxy à la surface de la SU8 et des groupements NH- greffés à la surface du PDMS. Cependant, le nombre de groupements époxy diminue lors du recuit de la SU8. Ainsi, pour que le procédé soit efficace, la SU8 ne doit pas être recuite au-dessus de 95°C afin de garder environ 40% des groupements fonctionnels. Ainsi, le *hard bake* de la SU8 (175°C) parfois nécessaire pour réduire les craquements de la résine, est à exclure. Quant au greffage de NH- sur le PDMS, il peut être effectué par silanisation liquide grâce à l'APTMS (3-aminopropyltriméthoxysilane) contenant des terminaisons NH<sub>2</sub> (Zhang et *al.* 2009, Watts et *al.* 2012) ou à l'aide d'un traitement plasma N<sub>2</sub>. Cette technique est particulièrement efficace car elle procure un collage important entre les surfaces ainsi qu'un packaging étanche (figure 3. 17).



**Figure 3. 17:** Packaging PDMS/SU8 grâce à la réaction amine-époxyde (Zhang *et al.* 2011, Watts *et al.* 2012)

L'utilisation d'un plasma  $\text{N}_2$  est intéressante. Cependant, elle nécessite un bâti de plasma intégrant ce gaz. En contrepartie, la silanisation liquide est très économique et facile à mettre en place mais peut provoquer un gonflement du PDMS poreux. Talaei *et al.* ont quant à eux préféré silaniser la SU8 et non le PDMS (figure 3. 18).

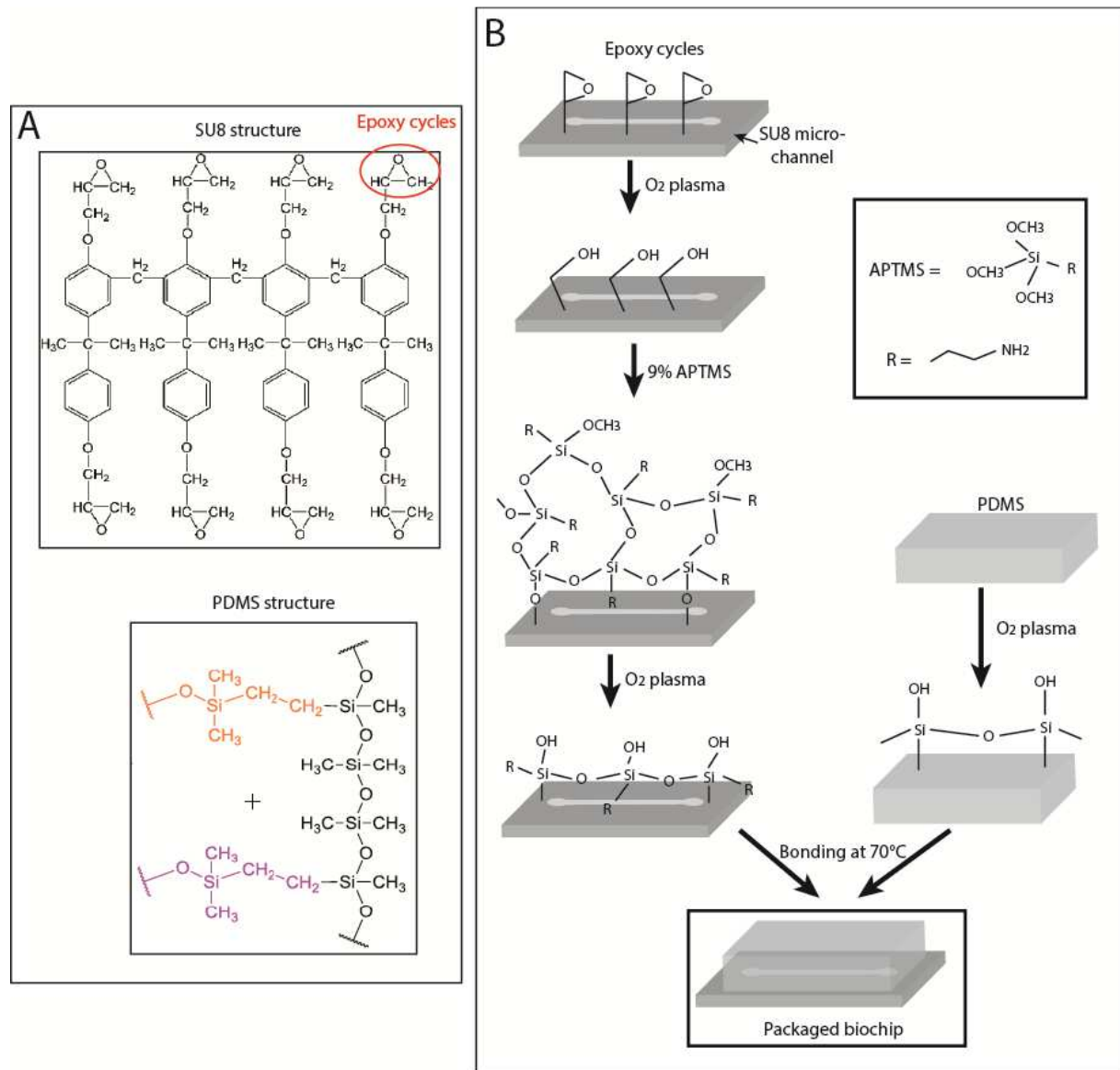


**Figure 3. 18:** Packaging irréversible SU8/PDMS par silanisation vapeur des canaux SU8 (Talaei *et al.* 2009).

Cette méthode ne fonctionne pas selon le même principe que la précédente. En effet, ce n'est pas la réaction amine-époxyde qui est exploitée ici mais bien le collage grâce à la formation de groupements silanols ( $\text{Si-O-Si}$ ) entre les silanes greffés sur la SU8 et ceux du PDMS oxydé sous un plasma  $\text{O}_2$  (comme pour un collage PDMS/verre). Cette méthode, reproductible sur des canaux longs et complexes, nous semble la plus prometteuse pour notre application car elle préserve l'état des canaux. Cependant, Talaei *et al.* utilisent pour leur procédé un greffage en phase vapeur durant 2h dans un bâti spécifique (Talaei *et al.* 2009). Ne disposant pas d'un tel équipement, nous avons opté pour une silanisation liquide de la SU8. Cette dernière n'étant pas poreuse, il n'y a aucun risque de gonflement. La partie suivante de ce chapitre détaille le procédé développé pour la silanisation de la SU8 et sa caractérisation ainsi que le packaging obtenu grâce à cette technique.

**b. Protocole développé :**

Le protocole de packaging PDMS/SU8 que nous avons développé est basé sur la silanisation préalable de la surface de SU8. La figure 3.19 résume le protocole utilisé.



**Figure 3.19 :** A. Structure des surfaces de PDMS et de SU8. B. Schéma explicatif du protocole de packaging irréversible par silanisation liquide de la SU8

Les couches auto-assemblées (ou SAMs pour *Self Assembled Monolayers*) sont couramment utilisées pour la modification des propriétés physiques ou chimiques d'une surface (Ulman 1996, Glass et al. 2011). Elles peuvent notamment modifier l'hydrophobicité d'une surface ou encore permettre l'immobilisation/détection de protéines ou de biomolécules (Ammar et al. 2013). Ainsi, les SAMs sont largement appliquées dans les systèmes microfluidiques comme les biocapteurs (Chaki et al. 2002), les laboratoires sur puces (Lab-On-Chip) (Zhang Y. et al. 2009) ou encore pour la formation de gouttes (Ducloux et al.



2010). Les organosilanes en particulier sont très appréciés car ils peuvent former des SAMs sur une large gamme de matériaux en réagissant avec les hydroxyles libres de la surface. Nous avons choisi d'utiliser des organosilanes en phase liquide type APTMS (3-AminoPropyl TriMéthoxiSilane) ou APTES (3-AminoPropyl TriEthoxiSilane) car cette famille se prête particulièrement aux applications biomédicales. En effet, l'APTES est utilisé pour rendre biocompatible des surfaces qui ne le sont pas à leur état brut (Landoulsi et *al.* 2011).

Dans le cas de la SU8, l'APTES a précédemment été utilisé pour l'immobilisation de brins d'ADN (Cao et *al.* 2011) ou d'anticorps (Joshi et *al.* 2007), le greffage de nanoparticules (Prabhakar et *al.* 2010) ou encore l'augmentation de l'hydrophobie des canaux pour un meilleur remplissage (Schumacher et *al.* 2008). Nous nous sommes tout d'abord basés sur un procédé développé par Nadime Karaduman du laboratoire de chimie de l'ENS Cachan (PPSM pour *Laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires*) pour le greffage d'APTMS sur du verre. Ainsi, nous avons pu adapter le protocole à la silanisation de la SU8. Pour un greffage efficace de ces silanes, la présence de groupements -OH doit être maximisée sur la surface réceptrice. Pour cela, dans le cas de la SU8, les époxy doivent être ouverts. Dans la littérature, cette opération est en général effectuée grâce à une oxydation liquide utilisant des acides. Or cette méthode, très corrosive, peut fortement abimer les canaux. Nous avons donc opté pour une oxydation physique de la surface de SU8 en utilisant un plasma O<sub>2</sub> (Walther et *al.* 2009).

La première étape consiste donc à ouvrir les ponts époxy de la surface de SU8 constituant les canaux à l'aide d'un traitement plasma O<sub>2</sub>. La puce est ensuite plongée durant 30 min dans un bain d'APTMS dilué à un ratio volumique 1:10 dans du méthanol (donc 9.09 % d'APTMS). Une fine couche d'APTMS se forme donc sur la surface de SU8 laissant des groupements NH<sub>2</sub> et des Si-O-CH<sub>3</sub> libres. Après un rapide rinçage au méthanol et à l'eau, la surface est rapidement séchée à la soufflette d'azote puis durant 3 h à 110°C dans une étuve. Par la suite, un traitement plasma O<sub>2</sub> est appliqué en même temps sur les canaux de SU8 silanisée et le capot de PDMS non moulé mais préalablement percé pour former les entrées/sorties. Ainsi, les groupements Si-OH sont ouverts sur les deux surfaces. Les premiers tests d'alignement ont montré qu'en mettant les surfaces en contact directement à la sortie du bâti d'oxydation, il n'était plus possible de les déplacer entre elles sans les dégrader. Du méthanol est donc utilisé comme lubrifiant à cette étape pour avoir le temps d'aligner les deux parties avant qu'il y ait un réel contact. Cette opération doit être effectuée rapidement (en moins de 5 min) car le méthanol s'évapore très rapidement à travers le canal et les accès fluidiques. De plus, il est connu qu'un traitement plasma sur le PDMS perd rapidement de son

efficacité. Lorsque les accès fluidiques du capot sont alignés sur les parties correspondantes de la SU8, le tout est placé 20 min à 70°C. Le tableau 3.4 détaille toutes les conditions du protocole développé. Le PDMS étant souple, nous n'avons pas eu besoin d'appliquer une quelconque pression lors de la dernière étape de collage pour obtenir un packaging étanche. Ce protocole est très peu couteux et ne nécessite pas de hautes températures ni de pression extérieure. La seule contrainte est l'utilisation d'un bâti de plasma O<sub>2</sub> à faible puissance (29 W), qui est un équipement disponible dans de nombreux laboratoires du domaine. Nous avons cherché à réduire la durée de silanisation (environ 4h15) tout en gardant un packaging efficace. Le tableau 3.4 compare le protocole optimisé au 1<sup>er</sup> développé.

**Tableau 3.4 :** Comparaison du protocole initial et du protocole raccourci de silanisation de la SU8

Etape	Protocole initial	Protocole amélioré
Oxydation 1	20 s, 29 W, 300 mTorr	20 s, 29 W, 300 mTorr
Bain APTMS 9%	30 min	5 min
Rinçage méthanol	2 min	2 min
Rinçage eau	1 min	non
Séchage soufflette N <sub>2</sub>	oui	oui
Séchage 110 °C	3 h	30 min
Oxydation 2	20 s, 29 W, 300 mTorr	20 s, 29 W, 300 mTorr

Nous avons tout d'abord réduit la durée de contact entre la SU8 et l'APTMS à 5 min. Ensuite, nous plongeons l'échantillon 2 min dans un bain de méthanol sans rinçage à l'eau. Ceci nous permet de réduire considérablement la durée de séchage. En effet, le méthanol s'évaporant rapidement, un recuit en étuve durant 30 min s'est montré amplement suffisant. Enfin, nous avons pu constater que la dernière étape d'oxydation était nécessaire sur les deux surfaces. Ainsi, la durée du protocole a pu être réduite de 4h15 à 1h15. Nous avons donc développé une nouvelle technique basse température, rapide, peu coûteuse et facilement reproductible pour un packaging efficace de canaux en SU8 par un capot en PDMS. Le procédé s'est aussi avéré efficace en utilisant de l'APTES (dilué dans de l'éthanol). Nous verrons par la suite qu'en modifiant légèrement le protocole, il est aussi possible de coller du PDMS sur des surfaces en polystyrène (comme les boîtes de Pétri très fréquemment utilisées en culture cellulaire) ou encore sur du COC, un plastique qui commence à être très utilisé en microfluidique. Mais avant de caractériser le packaging, nous avons tout d'abord caractérisé la surface de SU8 à chaque étape de la silanisation.

### c. Caractérisation de la silanisation

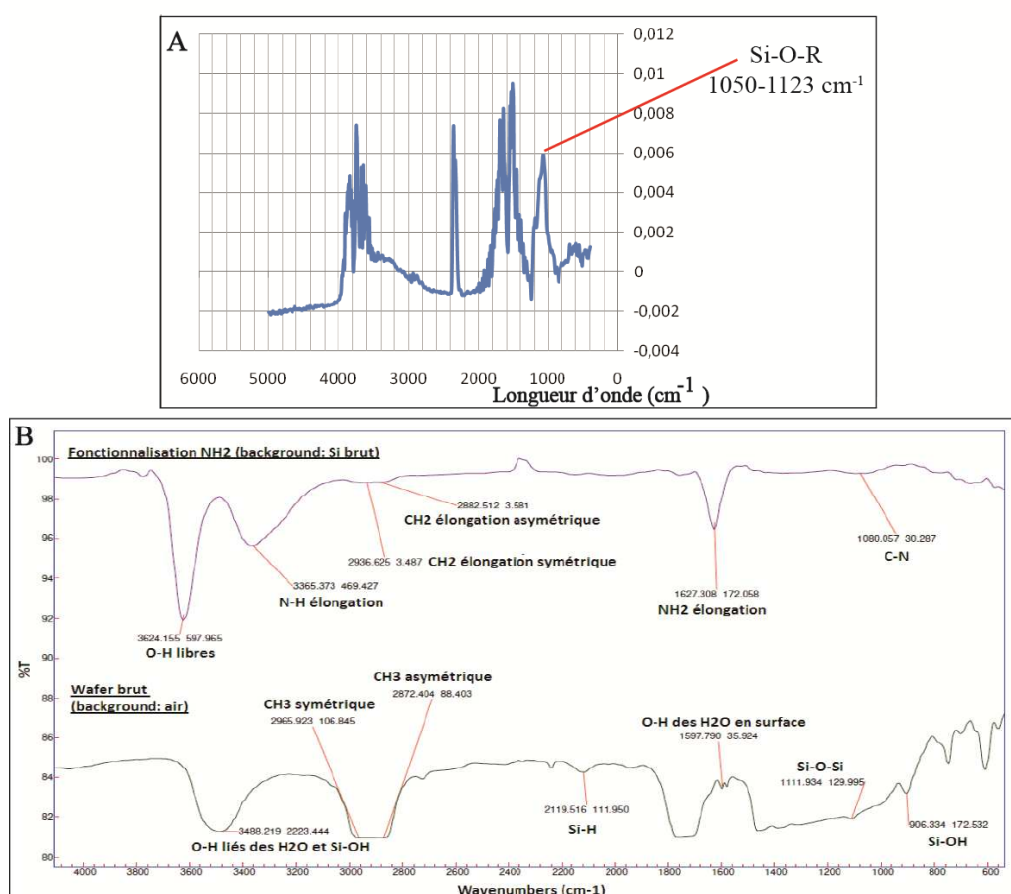
- **Etude par spectroscopie FT-IR (Fourier Transform Infra-Red)**

Une des méthodes les plus répandues de caractérisation chimique d'une surface est la spectroscopie FT-IR (pour *Fourier Transform Infra-Red*). Cette technique exploite les différences entre les énergies de vibration propres à chaque liaison chimique. Un faisceau infrarouge est tout d'abord envoyé sur une surface. Lorsque l'énergie du faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule irradiée, cette dernière absorbe une partie du rayonnement, diminuant ainsi l'intensité réfléchi ou transmise (selon le mode de fonctionnement choisi). De ce fait, en étudiant les pics de transmission ou de réflexion, il est possible d'identifier la formule chimique d'un matériau. Il existe 4 modes d'analyse FT-IR :

- Transmission : analyse du faisceau transmis par l'échantillon lorsqu'une irradiation le traverse,
- Réflexion : analyse du faisceau réfléchi par l'échantillon lorsqu'une irradiation le traverse,
- ATR (pour *Attenuated Total Reflectance*) : l'échantillon est irradié à travers un cristal fortement réfléchissant, et le faisceau, réfléchi par le matériau à analyser puis par le cristal, est étudié,
- Angle rasant : l'échantillon est irradié suivant un certain angle, le faisceau réfléchi est ensuite analysé.

Dans le cas d'une fonctionnalisation de surface, l'épaisseur de la couche à analyser est très fine (quelques nanomètres) comparativement à l'épaisseur du matériau sondé. Ainsi, le signal recherché est souvent noyé dans le signal du matériau massif. Pour repérer les pics d'intérêt, il s'avère souvent nécessaire de faire une analyse du matériau seul et de soustraire ce bruit de fond (background) par la suite. Ainsi, tous les modes ne sont pas adaptés à l'analyse de couches minces. Le mode en réflexion par exemple est adapté à l'analyse de matériaux épais. Durant une première série de mesures sur le protocole de silanisation non optimisé (silanisation durant 30 min dans de l'APTMS 9%), nous avons testé les modes ATR et en angle rasant sur le FT-IR Varian 670 IR de l'IEF. Ces premières mesures ont montré que pour ce type de surface, une mesure ATR en soustrayant le signal de la SU8 (background SU8 native) est la plus adaptée puisque nous avons pu repérer le pic de vibration Si-O-R résultant du greffage de silanes sur la SU8 (figure 3.20.A). Il est important de noter que le signal détecté est très faible à cause de l'épaisseur de la couche de silane (< 5 nm). Après optimisation du procédé (réduction du bain APTMS à 5 min), nous avons voulu caractériser cette surface. De la même manière, nous avons effectué plusieurs séries de mesure sur le FT-

IR mis à disposition par l'ENS de Cachan. Les mesures en mode ATR et en transmission sur de la SU8 silanisée selon notre protocole amélioré n'ont malheureusement pas été très fructueuses. Bien que plusieurs background aient été testés (air, verre, silicium, SU8 déposée sur du verre) et des mesures sur des surfaces différentes (SU8 déposée sur du verre, film mince de SU8 sans support), et des scans très longs pour augmenter l'amplitude du signal (1000 scans, soit 20 min par série) les pics spécifiques du silane n'étaient malheureusement pas discernables. Pauline Chaumont, encadrée par Mehdi Ammar, a développé sur l'équipement FT-IR Varian de l'IEF, une méthode de mesure pour des couches minces de silanes APTES. En analysant en transmission des échantillons de silicium silanisés par voie liquide durant 8 h et en soustrayant le signal du substrat seul, le tout dans une atmosphère contrôlée en CO<sub>2</sub>, ils réussirent à repérer les pics spécifiques de l'APTES, et notamment ceux du NH<sub>2</sub> (figure 3.20.B).

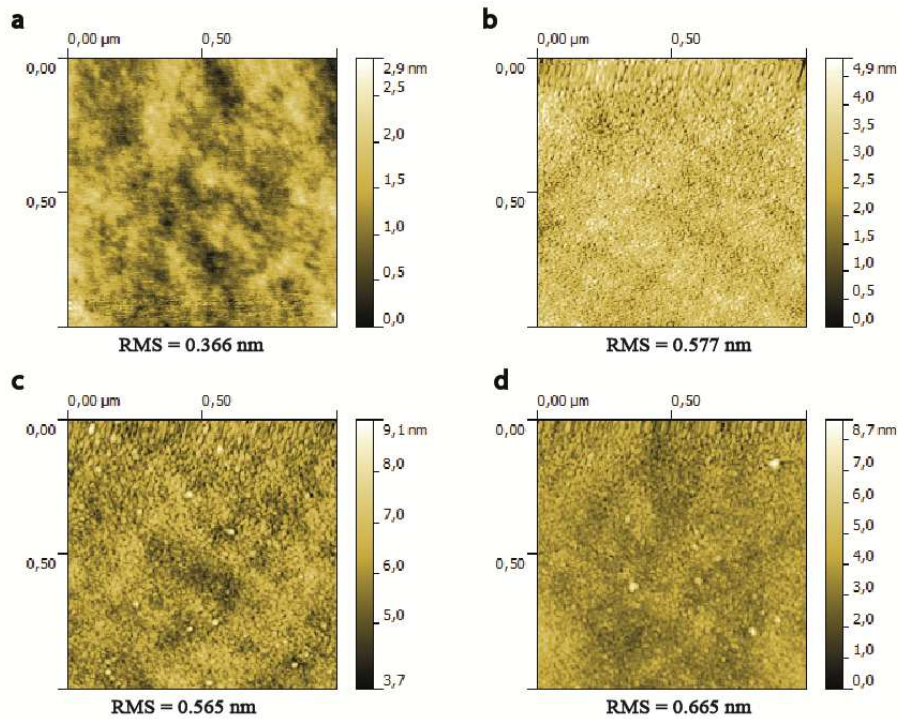


**Figure 3.20 :** Spectre FT-IR d'une surface silanisée. A. Spectre d'absorption en mode ATR sur une surface SU8 silanisée (9% APTMS, protocole non optimisé), back SU8. B. Spectre en mode transmission d'une surface de Si silanisée par 2% APTES dans de l'acétone durant 8h. La soustraction du signal du silicium (background Si brut) permet de voir le signal de la couche auto-assemblée caractérisée par les NH<sub>2</sub> (Chaumont 2013).

Voulant caractériser le protocole optimisé en utilisant l'APTMS, nous avons dû effectuer la silanisation des échantillons à l'ENS Cachan car l'utilisation de méthanol est interdite au sein de l'IEF. Les échantillons ont été conservés à l'air durant le transport car des mesures préalables concernant l'APTES ont montré que c'était le meilleur mode de conservation de la couche silanisée (Chaumont 2013). Les surfaces ont ensuite été analysées à l'IEF. Malheureusement, les pics sont de trop faible intensité pour être interprétés. Ceci est probablement dû à l'épaisseur extrêmement fine du silane formé. En effet, dans le protocole amélioré, la surface n'est plongée que durant 5 min dans l'APTMS. De plus, les précédentes mesures sur l'APTES ont montré une chute brutale du signal de  $\text{NH}_2$  mesuré par FT-IR après 2 h de stockage. En outre, le temps d'attente d'environ 2 h entre la fonctionnalisation à Cachan et la mesure à Orsay pourrait avoir dégradé la couche silanisée. Nous avons donc dû caractériser la surface de SU8 silanisée par d'autres techniques.

- **Etude par microscopie AFM (Atomic Force Microscopy)**

En étudiant la littérature sur la silanisation de la SU8, il nous est apparu que l'AFM (pour *Atomic Force Microscope*) pourrait nous aider à contrôler les différentes étapes de la silanisation. Cette technique permet d'analyser la topographie de surface d'un échantillon et ainsi de mesurer sa rugosité de surface. Elle se base sur la mesure des différentes forces d'interaction entre une pointe très fine fixée sur un bras de levier (cantilever) et les atomes de surface du matériau à analyser. Un faisceau laser sur le cantilever permet de suivre la déflexion de ce dernier en fonction des forces d'interaction. La combinaison de photo détecteurs et d'éléments piézoélectriques permet de remonter au déplacement micrométrique (x,y) ou nanométrique (hauteur) de la pointe. En observant à l'AFM des surfaces de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  de SU8, nous avons pu comparer la rugosité moyenne et l'aspect de la surface à différentes étapes de la silanisation (figure 3.21).



**Figure 3.21 :** Images AFM et rugosité moyenne de surface (RMS) de la SU8 native (a), après le 1<sup>er</sup> plasma 20 s à 29 W (b), juste après la silanisation (c) et après le 2<sup>nd</sup> traitement plasma 20 s à 29 W (d)

La rugosité RMS (pour *Root Mean Square*) est le paramètre le plus couramment utilisé pour comparer les rugosités de surface car il est plus sensible à la hauteur  $Z$  des pics que l'écart moyen arithmétique  $R_a$  :

$$R_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L Z^2(x) \cdot dx} \quad (3.5)$$

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |Z(x)| \cdot dx \quad (3.6)$$

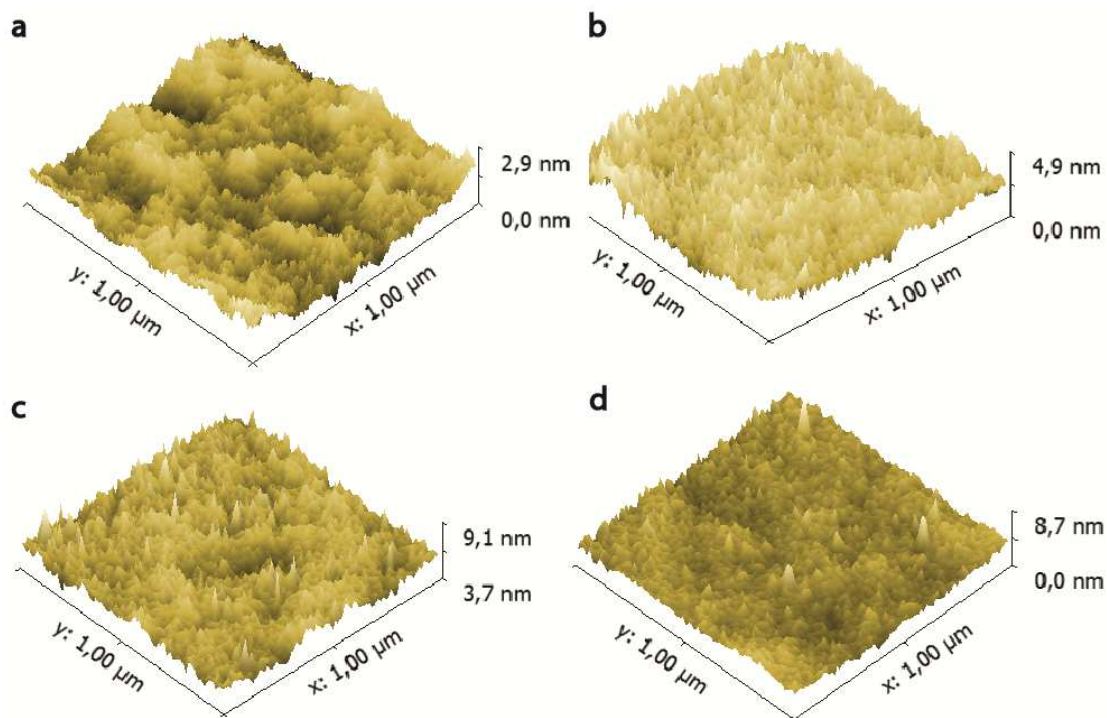
**Tableau 3.5 :** Résultats des mesures AFM sur une surface de SU8 aux différentes étapes de silanisation

Paramètre (nm)	SU8	SU8 + plasma O <sub>2</sub>	SU8 silanisée	SU8 silanisée + plasma O <sub>2</sub>
Hauteur moyenne	1,261	2,875	5,973	3,576
Hauteur maximale	2,927	4,86	9,059	8,693
Mediane	1,254	2,892	5,975	3,571
Rugosité Ra	0,292	0,458	0,443	0,516
Rugosité RMS	0,366	0,577	0,565	0,665

A l'aide de la figure 3.21 et le tableau 3.5, nous pouvons observer une très légère variation de la valeur RMS après chaque traitement plasma. Cependant, cette variation (entre 0,1 et 0,2 nm) est trop faible pour être significative. Walther et *al.* (2010) ont pu observer une rugosité

similaire (0,4 nm) après un traitement plasma de 25 W durant 30 s. Par contre, en appliquant 50 W durant 8 min, la rugosité atteint  $4,75 \pm 1,65$  nm. Dans une autre étude, Joshi et *al.* (Joshi et *al.* 2007) ont observé des rugosités plus importantes (2,245 nm) peut-être à cause de l'attaque acide utilisée durant le procédé utilisé pour l'ouverture des époxyes. Il n'est donc pas surprenant que, dans notre cas, en appliquant des plasmas de faible puissance (29 W) durant une courte période (20 s), la rugosité de la SU8 ne soit que très peu impactée.

D'un autre côté, l'aspect de la surface semble modifié après chaque étape (présence d'agrégats). Ceci est encore plus visible sur la visualisation 3D des images AFM (figure 3.22). Nous pouvons aussi remarquer que la hauteur maximale augmente à chaque étape. La première augmentation rencontrée est due à l'attaque de la surface par les espèces du plasma. La seconde revient au greffage des couches de silane. Enfin, la dernière modification d'aspect est due au second traitement plasma ouvrant les liaisons Si-OH.

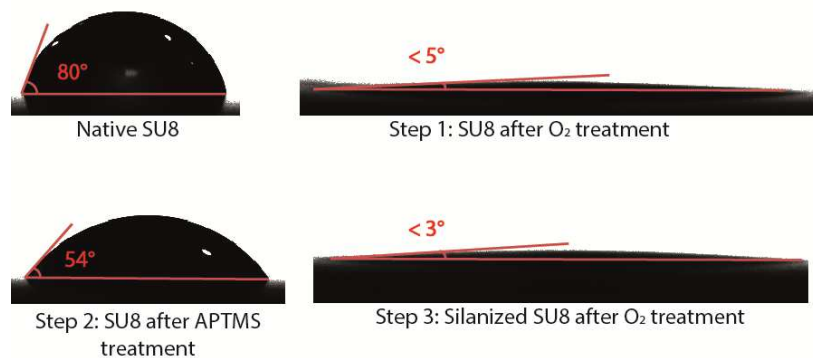


**Figure 3.22 :** Images AFM présentant l'évolution de la topographie de surface de la SU8 native (a), après le 1<sup>er</sup> plasma 20 s à 29 W (b), juste après la silanisation (c) et après le 2<sup>nd</sup> traitement plasma 20 s à 29 W (d)

- **Etude de mouillabilité et de stabilité dans le temps du greffage**

Le second paramètre souvent utilisé pour renseigner l'état d'une surface est sa mouillabilité. Cette dernière est la capacité d'étalement d'un liquide sur une surface. Elle renseigne également sur l'adhésion, les surfaces les plus hydrophiles étant souvent les surfaces entraînant une adhérence importante. Selon la théorie de Sharpe et Schonhorn

(Sharpe 1963), l'adhésion est due aux liaisons de Van Der Waals entre deux surfaces. Or, un étroit contact entre les deux surfaces, nécessaire à l'établissement des liaisons intermoléculaires, est favorisé par la mouillabilité. En pratique, c'est en mesurant l'angle que fait une goutte de liquide (en général de l'eau) en s'étalant sur une surface, que nous pouvons caractériser la mouillabilité (figure 3.23). Nous avons ainsi mesuré l'angle formé par une goutte d'1  $\mu\text{l}$  d'eau, 100  $\mu\text{s}$  après son dépôt sur une surface de SU8, à chaque étape de la silanisation (plasma  $\text{O}_2$  + traitement par APTMS) puis à l'activation du greffage (second plasma  $\text{O}_2$ ). Notons que chaque point sur les courbes suivantes représente la moyenne d'au moins 3 points de mesure.



**Figure 3.23 :** Images d'angle de contact à l'eau de la surface de SU8 aux différentes étapes du protocole (silanisation = step 1 + step 2)

Afin de caractériser le procédé de silanisation, une étude de mouillabilité a été effectuée sur 3 types de substrats : PDMS, verre et SU8.

- *PDMS ayant subi un traitement plasma  $\text{O}_2$ :*

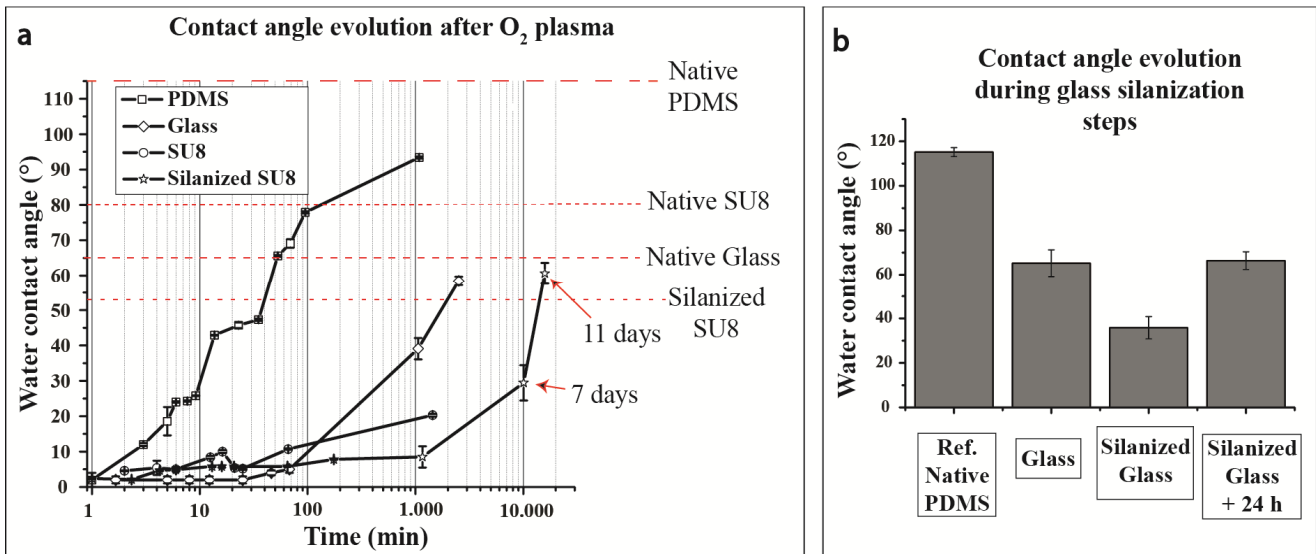
La mouillabilité du PDMS étant bien connue, nous avons pris ce substrat comme référence. Le PDMS natif présente un fort caractère hydrophobe ( $112^\circ \pm 1^\circ$ ). Un traitement plasma  $\text{O}_2$  fait fortement chuter l'angle de contact ( $2^\circ$ , surface très hydrophile). La mouillabilité après ce traitement évolue rapidement (figure 3.24.a) ; en moins d'une heure, la surface retrouve son caractère hydrophobe. Cette variation très rapide est une caractéristique connue de l'hydrophilisation du PDMS, diminuant donc rapidement sa force d'adhésion (Jo et al. 2000, Jokinen et al. 2012, Couty 2012).



- Verre ayant subi une silanisation :

Le verre, de nature relativement hydrophobe ( $65^\circ \pm 6^\circ$ ) voit également son angle de contact fortement réduit après un traitement plasma  $O_2$  ( $2^\circ$ ). Cet état évolue plus lentement que dans le cas du PDMS (retour à un état hydrophobe en environ 2 jours, figure 3.24.a).

Après un traitement plasma  $O_2$ , le verre est plongé dans de l'APTMS. Ce greffage augmente à nouveau l'angle de contact ( $35^\circ \pm 5^\circ$ , figure 3.24.b) et atteint  $65^\circ$  (égal à l'angle du verre non traité) au bout de 24 h.



**Figure 3.24 :** a. Evolution dans le temps de l'angle de contact à l'eau après traitement plasma  $O_2$  (20 s, 29W et 300 mTorr) du PDMS, verre, SU8 et SU8 silanisée. b. Angle de contact du verre aux différentes étapes de silanisation (le PDMS est pris comme référence).

- SU8 ayant subi une silanisation :

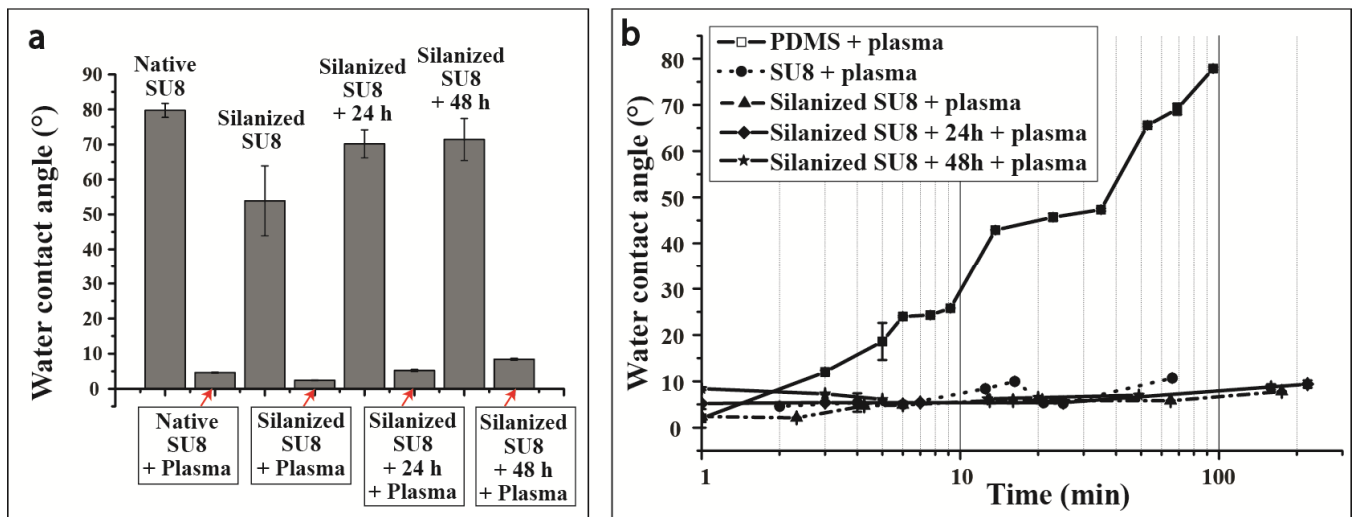
La SU8 native présente un caractère hydrophobe ( $79^\circ \pm 1^\circ$ ). Tout comme les surfaces précédemment analysées, le traitement plasma  $O_2$  hydrophilise la SU8 (angle  $< 5^\circ$ ). L'angle remonte lentement à  $20^\circ$  au bout de 24 h (figure 3.24.a). Le traitement des couches de SU8 peut être encore plus stable (durant plus de 5 jours) avec un plasma plus agressif (50 W durant 8 min pour Walther et *al.* 2010 ou encore 500 W durant 10 min dans le cas de Jokinen et *al.* 2012).

Néanmoins, nous avons pu voir que le traitement plasma de la SU8 seul ne permettait pas d'obtenir une surface adhérente. Il est nécessaire de silaniser cette dernière. Après un greffage par APTMS, l'angle produit est d'environ  $55^\circ$ . C'est après le plasma d'activation des surfaces greffées qu'une diminution drastique de l'angle est notée ( $2,4^\circ \pm 0,1^\circ$ ). Cet état fortement hydrophile dure au moins 24 h après l'activation du greffage (figure 3.24.a). L'angle augmente ensuite lentement jusqu'à atteindre  $60^\circ$  au bout de 11 jours. Notons que la

SU8 silanisée et activée garde son caractère hydrophile plus longtemps que tous les autres substrats étudiés.

Pour des raisons pratiques, nous avons voulu savoir s'il était possible d'effectuer le greffage et son activation dans deux laboratoires différents. A ces fins, nous avons observé l'évolution de l'angle de contact après le greffage par APTMS de la résine.

Plusieurs substrats de SU8 ont été silanisés. Une partie des échantillons a subi un traitement plasma  $O_2$  immédiatement après le greffage, et les autres échantillons, conservés à l'air, n'ont été traités que plusieurs heures plus tard. Nous avons toujours constaté une diminution drastique de l'angle après activation du greffage (figure 3.25.a). Dans tous les cas, l'activation est efficace durant au moins 3 h (figure 3.25.b). Ces résultats confirment que les étapes de greffage et d'activation peuvent être espacées de 48 h (voire plus).



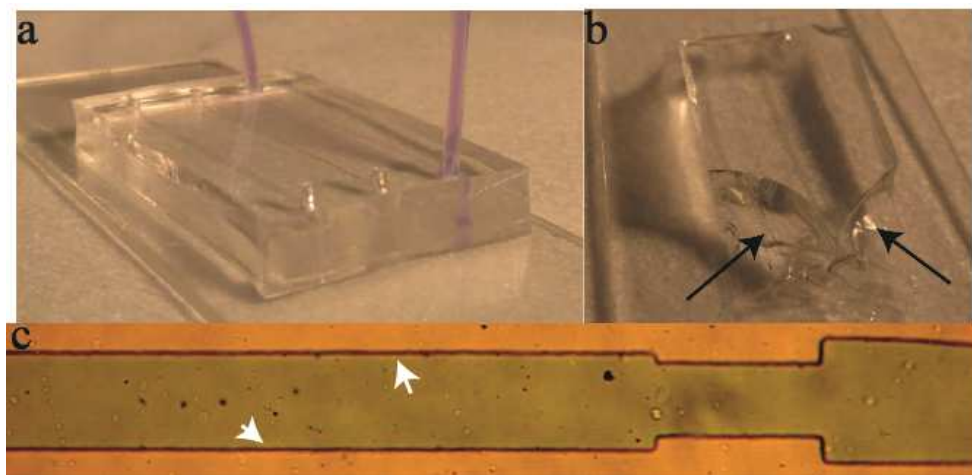
**Figure 3.25 :** Effet du vieillissement. a. Angle de contact de la SU8 silanisée, activée par plasma  $O_2$  (20 s, 29W et 300 mTorr) à différents moments. b. Evolution dans le temps de l'angle de contact après activation par plasma  $O_2$  des différentes surfaces de SU8 silanisées, le PDMS et la SU8 (sans silanisation) sont pris comme référence.

Ces résultats sont intéressants car ils portent à croire que l'étape de collage peut ne pas être effectuée immédiatement après la silanisation. Nous avons pu vérifier qu'un collage, plus de 4 h après la silanisation, restait efficace et étanche. Dans la partie suivante, nous présentons la caractérisation du collage irréversible SU8 silanisée/PDMS.

d. Caractérisation du collage PDMS-SU8 par silanisation :

- **Mesure de flux limite**

Un premier test de qualité pour le procédé de collage est de connaître le flux limite avant observation de fuites sur les bords des canaux. Pour cela, un support de SU8-2025 est réalisé puis silanisé. Un capot en PDMS est alors collé à cette surface après traitement plasma O<sub>2</sub>. De l'eau colorée au bleu de coomassie est alors injectée sous pression à l'aide d'une seringue (figure 3.26.a). Nous n'avons jamais observé de fuite, même pour le débit maximal imposé par le dispositif (143 cc/hr), et ce durant plus d'1 h de mesures fluidiques ininterrompues. Il est à noter que les tests précédents ont été effectués juste après le collage et réitérés 7 jours plus tard avec le même résultat.



**Figure 3.26 :** Caractérisation du packaging SU8/PDMS par silanisation. (a) Canaux durant les tests fluidiques au bleu de coomassie, (b) Test d'arrachement du capot de PDMS, ce dernier reste accroché à la surface silanisée de SU8, le PDMS casse aux endroits où la pression est exercée. (c) Observation sous microscope lors d'un test fluidique à l'eau colorée, aucune fuite n'est observée, les frontières sont visibles (flèches blanches)

Afin d'estimer la pression exercée sur le canal, nous avons calculé la différence de pression entre l'entrée et la sortie. A l'échelle microfluidique, le débit  $Q$  est régi par la loi de Hagen-Poiseuille (Oh et *al.* 2012) :

$$Q = \frac{\Delta P}{R_H} \quad (3.7)$$

avec  $\Delta P$  la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal et  $R_H$  la résistance hydraulique [ $\text{Pa}\cdot\text{s}^3\cdot\text{m}^{-1}$ ] définie comme suit dans le cas d'un canal rectangulaire à faible facteur de forme ( $h/w \ll 1$ ,  $h$  étant la hauteur et  $w$  la largeur du canal) :

$$R_H = \frac{12 \cdot \eta \cdot L}{w \cdot h^3} \quad (3.8)$$

L représentant la longueur du canal et  $\eta$  la viscosité du fluide utilisé ( $\eta = 10^{-3}$  Pa.s dans le cas de l'eau). Dans le cas des tests fluidiques effectués nous avons :  $w = 400 \mu\text{m}$  et  $h = 25 \mu\text{m}$ .

D'après l'équation (3.7), la différence de pression entre l'entrée et la sortie est donc la suivante :

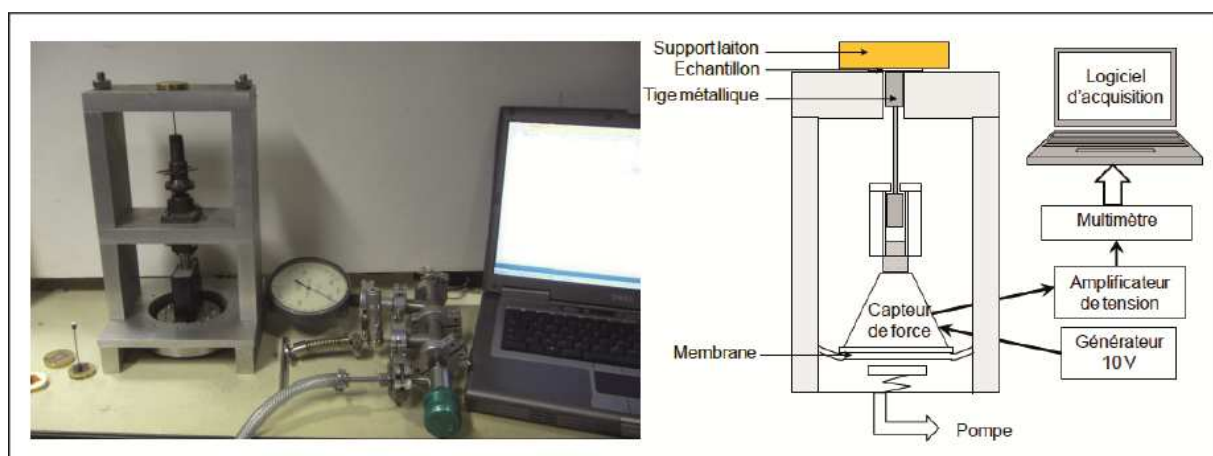
$$\Delta P = \frac{12\eta}{w \cdot h^3} L \cdot Q \quad (3.9)$$

Soit  $\Delta P = 1,2 \text{ MPa}$  avec :  $L = 1,5 \text{ cm}$  et  $Q = 143 \text{ cc/h}$  ( $\text{cm}^3/\text{h}$ ). La pression limite est donc supérieure à cette valeur. Il est cependant important de noter que le maximum de pression est exercé à l'entrée du canal.

Après ces tests fluidiques, nous avons tenté de décoller le capot à la main. A chaque fois, le PDMS cassait dans sa masse (figure 3.26.b), sans décollement à l'interface. Afin de quantifier la force d'adhésion entre les deux matériaux, nous avons mis en œuvre une dernière technique de caractérisation : le *pull-test* ou test en traction.

- **Mesure en traction (pull-test) :**

Ce test consiste à appliquer une contrainte normale à l'échantillon afin de séparer les deux surfaces collées et ainsi déterminer le point de rupture de l'interface PDMS/SU8. Pour cela, l'échantillon à caractériser est collé d'une part sur un support en laiton et d'autre part à une tige métallique. Le tout est ensuite fixé mécaniquement dans la structure de mesure (figure 3.27) et la force de traction est appliquée par pompage sur une membrane. Cette force est détectée par un capteur étalonné, dont la grandeur de sortie est une tension. Il est alors possible de calculer la force d'arrachement au point de rupture.

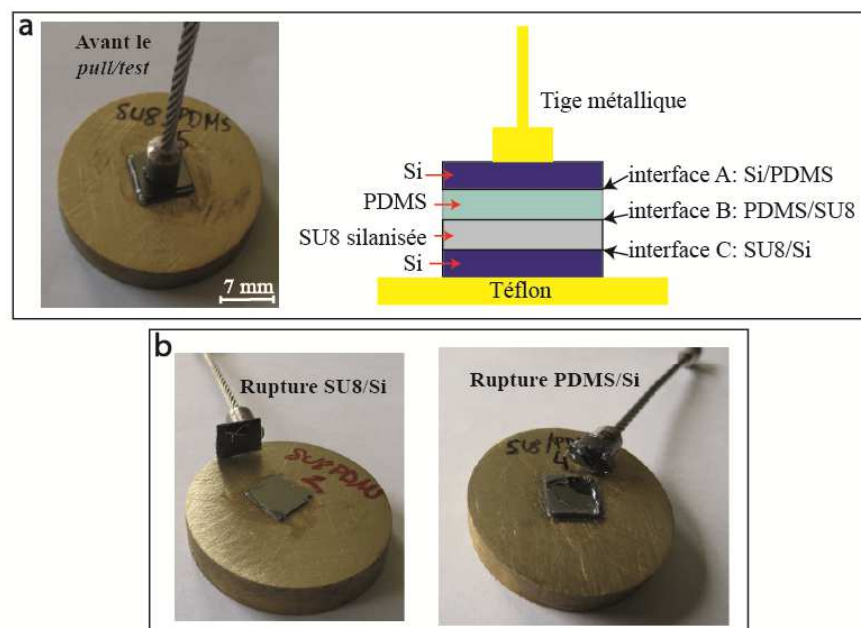


**Figure 3.27 :** Photographie et schéma du système pull-test utilisé (Couty 2012). Banc expérimental développé à l'IEF.

Concernant la préparation des échantillons, leur taille et leur épaisseur sont conditionnées par le dispositif de mesure utilisé : elles doivent être respectivement inférieures

à 1 cm<sup>2</sup> et 1 mm. Compte tenu de la contrainte en épaisseur, une fine couche de 60 µm de PDMS déposée sur un substrat de silicium a été utilisée plutôt que les blocs épais habituels. Notons que ce substrat de silicium doit être poli en face arrière pour permettre le bon collage de la tige métallique avec l'Araldite. L'autre partie de l'échantillon se constitue d'une couche de 25 µm de SU8, sur le même type de substrat, insolée puis soumise à l'étape de silanisation. Les collages pour ces tests ont été effectués sans adjonction de méthanol à l'interface qui, rappelons-le, est indispensable dans le procédé « réel » de scellement afin de permettre le glissement des deux substrats l'un sur l'autre pour l'alignement des canaux. Ici, aucun des deux substrats n'est structuré, et nous avons voulu éviter une mauvaise évaporation du solvant à l'interface. Au cours du recuit final, les empilements Si/SU8/PDMS/Si ont été placés entre deux plaques de métal vissées pour assurer une faible pression. En effet, lors du collage de ces deux surfaces rigides et de même taille, le contact est moins bon que dans le cas classique (PDMS épais et déformable sur une plus grande surface de SU8).

Les échantillons ainsi préparés ont ensuite été collés sur les différents supports (figure 3.28.a). D'abord la face arrière du substrat support de la SU8 silanisée est collée sur le support en laiton. Puis, la tige métallique, avec un plot de diamètre 4 mm à chaque extrémité, est collée perpendiculairement au centre de la face arrière du substrat support du PDMS. Le séchage de la colle Araldite a lieu à température ambiante durant une nuit, et l'échantillon positionné dans le dispositif de pull-test (figure 3.27). Les mesures en traction ont été réalisées sur plusieurs échantillons par Magdalèna Couty, au sein de l'IEF.



**Figure 3.28 :** Caractérisation de la pression d'arrachement du PDMS et de la SU8 silanisée par test en traction ou pull test.(a) Aspect de l'échantillon avant la mesure, (b) cassure de l'interface SU8/Si ou Si/PDMS

A partir de la tension de rupture mesurée, la courbe d'étalonnage nous donne la force d'arrachement. La contrainte maximale (N/mm<sup>2</sup> ou MPa) est ensuite déterminée en divisant la force par la surface d'arrachement estimée.

Selon les échantillons, différents types de rupture adhésive ont été observés, et parfois même des ruptures cohésives du substrat support en silicium sans doute fragilisé par le clivage (figure 3.28.b). Pour des contraintes de l'ordre de  $1,5 \pm 1$  MPa, la rupture a lieu aux interfaces A ou C (figure 3.28), sans décollement apparent à l'interface B. Pour une contrainte d'environ 2 MPa, le PDMS s'est complètement arraché du support de silicium (interface A) qui s'est brisé, et une bulle d'air s'est formée à l'interface B (collage par silanisation). Ceci indique que la contrainte limite à l'interface PDMS/SU8 (B) est comprise entre 1,5 et 2 MPa.

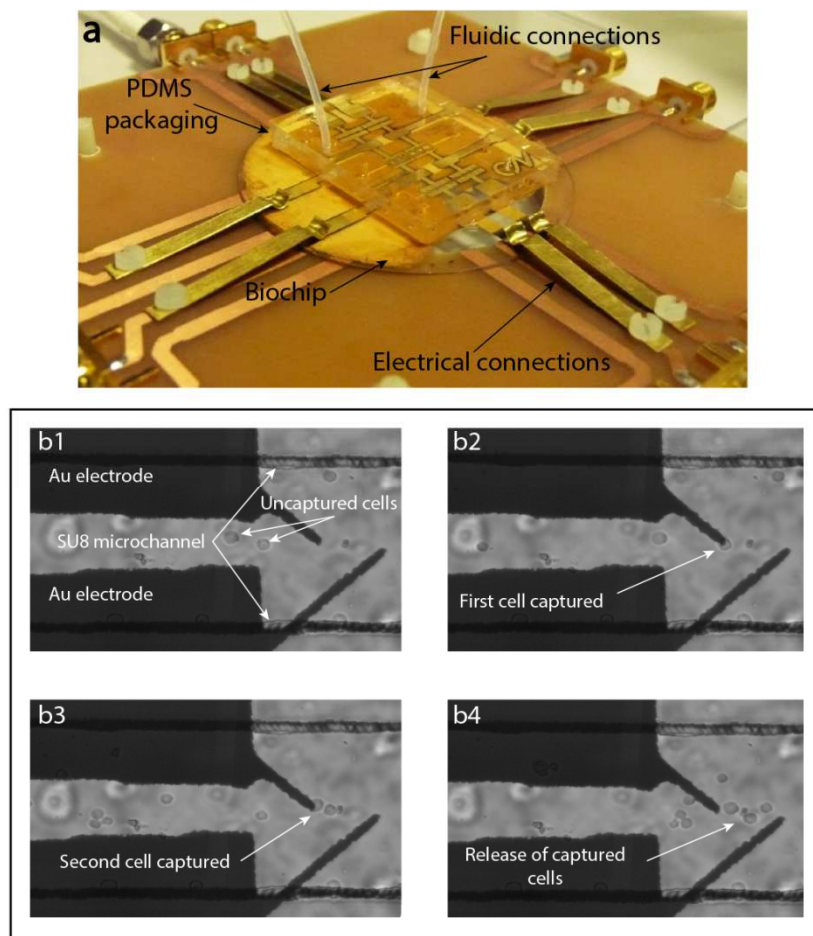
Afin de compléter ces résultats, il serait souhaitable d'effectuer les mêmes tests pour caractériser l'adhérence de la SU8 et du PDMS sur du silicium poli. Cependant, dans le cas du PDMS, matériau extrêmement mou, la mesure directe par pull test est difficile à mettre en œuvre. De plus, il n'a pas été possible de coller les tiges directement sur la surface de PDMS, même en utilisant du PDMS non recuit comme adhésif. Il ne nous est donc pas actuellement possible d'effectuer ces tests complémentaires. Néanmoins, nous pouvons dire que la force d'adhésion obtenue à l'interface B (PDMS/SU8), au moins égale à 1,5 MPa, est très élevée. En effet, il a été rapporté que la force d'adhésion du PDMS/PDMS ou PDMS/verre, en utilisant différents types de traitements plasma, est de l'ordre de quelques centaines de kPa (Bhattacharya *et al.* 2005). Ceci confirme que le collage PDMS/SU8 par silanisation que nous avons développé est très efficace. Le tableau ci-dessous présente une synthèse des résultats obtenus en ce qui concerne l'adhérence du capot de PDMS sur la SU8 en utilisant le procédé de silanisation :

**Tableau 3.6 :** Tableau récapitulatif de l'effet de la silanisation sur les caractéristiques physicochimiques de la SU8 et caractérisation du bonding PDMS/SU8 obtenu par le procédé développé

Paramètre	Technique	SU8 silanisée	Remarque	SU8 native
Rugosité RMS	AFM	0,665 nm	Très peu rugueuse	0,366 nm
Hauteur max	AFM	8,7 nm	Plus haute à cause du greffage	2,93 nm
Mouillabilité	Angle de contact	< 3°	Très hydrophile, vieillissement lent	80°
Canal contraint en cisaillement	Test fluïdique	> 1,2 MPa	Très étanche	----
Canal contraint en traction	Pull-test	> 1,54 MPa < 2 MPa	Collage très fort avec le PDMS	----

e. Application au packaging de dispositifs fonctionnels et au scellement d'autres matériaux :

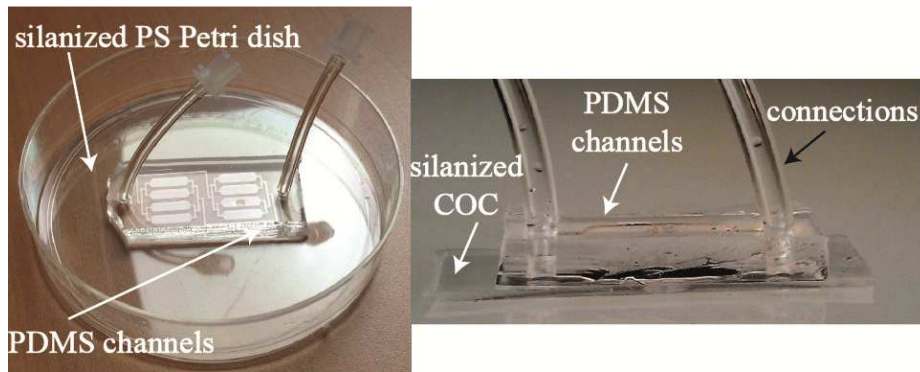
En appliquant le protocole de collage par silanisation à l'APTMS, nous avons pu obtenir des biopuces complètes intégrant électrodes et canaux, pour des tests fluidiques et électriques en utilisant un support PCB (pour *Printed Board Circuit*) fabriqué à cet effet (figure 3.29.a). Des cellules sont injectées dans les canaux à l'aide d'une seringue et le flux contrôlé à l'aide du moniteur MCFS-4C (de chez Fluigent). En appliquant une tension entre les électrodes connectées, nous créons une force de diélectrophorèse (chapitre 2) permettant la capture en flux des cellules (figure 3.29.b). Le packaging développé est donc bien fonctionnel.



**Figure 3.29 :** Exemple d'application du packaging irréversible sur un dispositif entier. (a) Photographie du dispositif (électrodes or + canaux SU8 + capot PDMS) connecté électriquement et fluidiquement. (b) Piégeage de cellules en flux par diélectrophorèse positive.

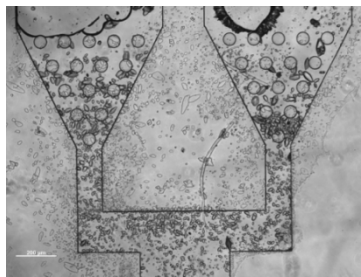
Nous avons également testé le protocole de silanisation développé pour le collage du PDMS sur des surfaces de polystyrène (PS) ou de COC (pour *Cyclic Olefin Copolymer*). En effet, ces thermoplastiques, après traitement plasma d'oxygène, présenteraient des sites d'encrage pour le silane, de la même manière que la SU8 activée (Sunkara et al. 2011). Nous

avons cependant dû adapter la durée du traitement plasma (1 min à présent car ces matériaux sont plus durs que la SU8) et la température de séchage du polystyrène silanisé (ramenée à 90°C car la température de transition vitreuse de ce dernier est de 95°C). Le collage a été effectué en présence d'une charge (< 1 Kg). La figure 3.30 présente le résultat du collage de structures en PDMS au fond d'une boîte de Pétri en Polystyrène (gauche) et sur du COC micromoulé (à droite). Ces deux dispositifs, dédiés à l'étude de la prolifération de cellules sous des contraintes de cisaillement, ont été testés sous flux et montrent une bonne étanchéité.



**Figure 3.30 :** Exemples de packaging irréversible de canaux en PDMS par silanisation d'une boîte de Pétri en polystyrène (PS) à gauche et de COC moulé à droite. Application pour des dispositifs d'étude de la culture cellulaire sous une contrainte de cisaillement.

Les cellules étant friandes des  $\text{NH}_2$ , si certains groupements sont laissés libres après la phase de silanisation, ces derniers pourraient induire une adhésion indésirable des cellules sur les parois du canal au cours du temps. Aussi, Yeh et *al.* préconisent un traitement au PolyEthylen Glycol (PEG) afin de rendre ces liaisons inertes (Yeh et Zhang 2012), pas forcément simple à mettre en œuvre. Ainsi, dans le cas de structures complexes intégrant des pièges fluidiques, le nettoyage et la réutilisation des biopuces pouvaient s'avérer difficiles (figure 3.31). Le nettoyage est beaucoup plus aisé en absence de couvercle pour trempages répétés dans l'eau. Aussi, nous avons également étudié le procédé de scellement permettant un collage réversible du couvercle de la biopuce.



**Figure 3.31 :** Photographie d'une biopuce, dédiée au piégeage cellulaire haute densité, après plusieurs utilisations et tentatives répétées de nettoyage. Des cellules mortes bouchent totalement les accès. La biopuce a été irréversiblement packagée en utilisant le protocole de silanisation développé.



### **III.2.2. Procédés de packaging réversible en cours de développement :**

Le packaging recherché doit permettre des expériences fluidiques en environnement étanche et la possibilité d'enlever le capot pour un nettoyage efficace des surfaces et une réutilisation optimale du dispositif. Ce type de scellement est possible par *clamping* d'une plaque de verre sur les structures, mais cette solution ne permet pas une réelle intégration du dispositif. Le capot peut également être maintenu mécaniquement grâce à un canal secondaire mis en dépression permettant de plaquer le capot sur le substrat (Chen et *al.* 2011). Toutefois, cette méthode nécessite l'utilisation d'une pompe lors des manipulations, incompatible avec un encombrement minimum. Nous avons donc souhaité développer un procédé de scellement physico-chimique du capot. Avec l'aide de Nhung-Dinh Hong et Hong-Ha Cao de l'IEF, nous avons exploré deux stratégies: un collage direct PDMS/PDMS et un autre utilisant un produit dérivé du PDMS : le DMPMS (Dimethyl MethylPhenylMethoxy Siloxane).

#### **a. Collage PDMS/PDMS :**

Différentes stratégies concernant le collage PDMS/PDMS ont été explorées durant ces dernières années : comme le plasma oxygène en décharge corona (Yang et *al.* 2009) ou encore le trempage dans une solution piranha (Koh et *al.* 2012). Nous pouvons aussi citer l'utilisation de couches intermédiaires d'adhérence comme de la résine ou du PDMS partiellement recuit ou réticulé (Eddings et *al.* 2008). Lee et *al.* ont également démontré qu'il était possible de coller deux surfaces de PDMS par fonctionnalisation en utilisant 2 silanes différents (Lee et *al.* 2009). Toutes ces techniques sont efficaces pour un collage irréversible. Cependant, très peu de techniques sont rapportées dans la littérature en ce qui concerne un packaging réversible mais étanche.

Notre premier essai a été d'utiliser une résine photosensible positive comme couche adhésive, combinée à un traitement en température (appareil de bonding EVG 501), mais sans succès. A cause de la tension de surface du PDMS, la résine adhère mal à ce dernier, se craquelant facilement.

Ichraf Ayed a réussi, durant ses travaux de thèse à l'IEF, à effectuer des collages réversibles PDMS/PDMS (Ayed 2012) en modifiant les paramètres d'activation par plasma O<sub>2</sub> sur l'appareil PICO disponible en salle blanche (Diener Electronic GmbH). Nous avons donc tenté de reprendre ses conditions (tableau 3.7, ligne 1), en tentant de coller un canal en PDMS sur une fine couche de PDMS déposée et recuite sur verre. Cependant, le collage obtenu dans

ce cas est pour nous irréversible. Nous avons alors effectué plusieurs tests en modifiant la puissance appliquée ainsi que les durées de traitement et de recuit post collage. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau 3.7.

**Tableau 3.7 :** Conditions de packaging réversible PDMS/PDMS rapportées dans (Ayed 2012) et variation des conditions appliquées en CTU (délaqueur PICO)

Paramètre	Puissance	Pression (mbar)	Durée (secondes)	Recuit	Résultat de collage	Retrait
Valeur	160 W	0,7	12	1 h à 75°C	Bon	Impossible
	< 50 W	0,7	---	10 min à 75°C	Non collé	----
	50 W	0,7	6	10 min à 75°C	Non collé	----
	50 W	0,7	12 et 18	10 min à 75°C	Bon	Impossible
	50 W	0,7	12	Ethanol + 60 min à 75°C	Collé	Instable
	50 W	0,7	12	Ethanol + 60 min à 60°C	Collé (32-64 kPa)	Ok, sur 1 cycle

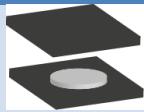

La plupart des conditions testées ont généré soit un collage irréversible, soit un collage inefficace (pas d'adhésion des deux surfaces et donc fuite dans les canaux). Cependant, il a été possible de décoller le capot en PDMS sur les échantillons ayant subi un plasma d'oxygène de 50 W durant 12 s, à condition qu'un lubrifiant (éthanol dans ce cas) soit utilisé au moment du collage puis évaporé par un recuit. Nous pensons que l'utilisation d'un solvant (éthanol ou méthanol) permet de retarder l'établissement des liaisons entre les deux surfaces. Le temps de latence conduisant à une diminution de l'activation du PDMS, et ainsi une diminution de la force d'adhésion, permettant de décoller les surfaces pour un prochain cycle.

Il est important de souligner qu'un recuit d'1 h à 60°C a permis de stabiliser le résultat. En effet, à 75°C, les résultats de décollement n'étaient pas très reproductibles alors qu'à 60°C, la majorité des échantillons ont pu être désolidarisés une fois. Le collage a été caractérisé et des fuites sont apparues à l'entrée du canal à des débits allant de 20 à 40 cc/h pour un recuit à 60°C (ce qui, pour les dimensions du système correspond à une contrainte de cisaillement de 32 à 64 kPa). Dans ces cas-là, il n'a été possible de décoller le capot qu'une seule fois (même traitement effectué deux fois sur la même surface nettoyée à l'éthanol). Ainsi, ces conditions sont utilisables dans le cas où il n'est pas nécessaire de décoller le capot une seconde fois (ex : cas des canaux fluidiques servant à la synthèse de molécules en canal, puis la nécessité de retirer le capot pour effectuer une caractérisation (Ayed 2012)).

Dans l'objectif de l'utilisation répétée d'une même puce, nous avons continué les investigations en changeant de bâti de plasma (Plasma cleaner PDC-002 disponible en

plateforme microfluidique de l'ENS Cachan, très utilisé pour le traitement de surfaces pour le collage PDMS/verre). Les configurations des différents équipements de plasma O<sub>2</sub> utilisés dans cette étude sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 3.8 :** Différences entre le délaqueur PICO (CTU Orsay) et le plasma cleaner PDC-002 (Cachan)

Paramètre	Fréquence	Puissance max	Géométrie des électrodes
Délaqueur PICO (Diener Electronic GmbH), CTU Orsay	40 kHz	200 W	Planaire 
Plasma Cleaner PDC-002 (Harrick Plasma), Cachan	12,5 MHz	29,6 W	Cylindrique 

Dans un premier temps, nous utiliserons le PDC-002 à sa puissance maximale. En appliquant les conditions présentées dans le tableau 3.9, nous avons réussi à coller puis décoller deux mêmes surfaces de PDMS 3 fois (ou 3 cycles sous flux). Notons qu'à chaque étape de décollement, une trace est observée sur les surfaces. Au 4<sup>ème</sup> cycle, le collage n'est plus efficace et les surfaces deviennent opaques. Précisons que les tests ont été effectués sur plusieurs échantillons. Si l'épaisseur de PDMS 'support' est inférieure à 100 µm, les résultats deviennent peu reproductibles.

**Tableau 3.9 :** Conditions expérimentales efficaces, sur le plasma PDC-002

Paramètre	Puissance	Pression	Durée	Recuit	Collage	Retrait
Valeur	29,6 W	0,7 mbar	30 s à 5 min	30 min à 75°C	Bon > 47 kPa	Ok, sur 3 cycles

Dans des bâtis de plasma à géométrie cylindrique (ex : PDC-002), l'énergie des particules est très faible, limitant l'effet du bombardement physique de la surface traitée. Ce type d'équipement favorise les effets chimiques. C'est probablement ce traitement plus « doux » de la surface qui permet un collage réversible sur plusieurs cycles. En comparaison, l'énergie d'impact dans les délaqueurs à électrodes planaires (ex : PICO) est élevée, et le bombardement physique toujours présent. Ceci pourrait expliquer la force des collages obtenus dans les tests sur ce dernier. Toutefois, précisons que de légères variations dans la composition du PDMS réticulé peuvent aussi avoir impacté les résultats.

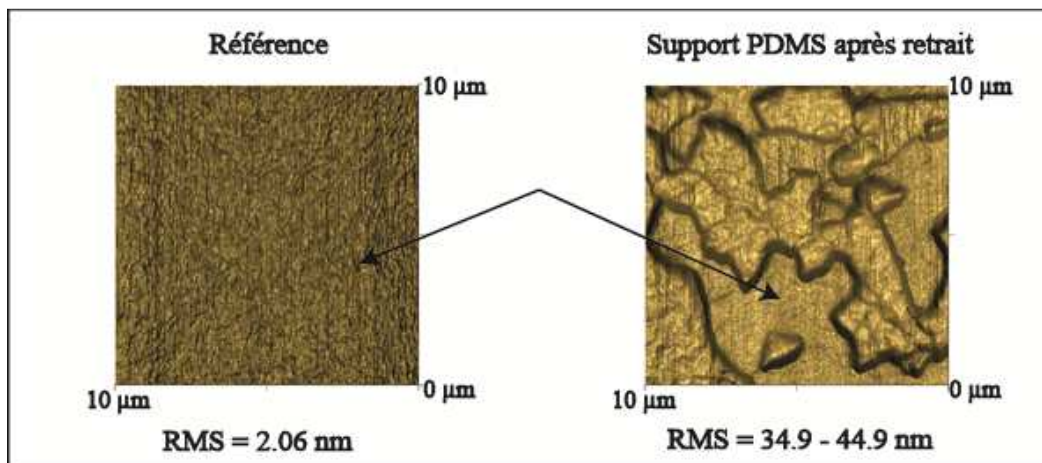
- **Caractérisation du collage réversible PDMS/PDMS avec le PDC-002**

La mesure par pull-test n'a pas été possible pour caractériser le collage, le PDMS étant trop mou et peu adhérent à la tige de mesure. Le seul test que nous avons pu effectuer est une tenue à la mise sous flux. Les premières mesures indiquent que le collage réversible PDMS/PDMS (conditions du tableau 3.9) résiste à plus de 30 cc/h sur les 3 cycles de collage (ce qui, rapporté aux dimensions du canal testé, correspond à 47 kPa). Cette valeur est loin des 143 cc/h (collage par silanisation), mais ce flux est suffisant pour la majorité des applications microfluidiques.

Il serait intéressant de déterminer l'évolution du flux limite (observation de fuites) en fonction des cycles de collage. Par manque de temps, nous n'avons pas pu effectuer ces mesures complémentaires.

Sur le bâti de plasma PDC-002, 3 valeurs de puissance sont possibles : 7 W, 10 W et 29,6 W. Nous avons testé les 3 puissances sans observer de différences au niveau des collages. Nous avons mesuré l'angle de contact des surfaces de PDMS après un 1<sup>er</sup> cycle de collage/retrait et la mouillabilité est de 113° dans les trois cas. Cette valeur étant la même que celle du PDMS natif (n'ayant subi aucun traitement), cela indique que les surfaces sont similaires.

La trace observée sur le PDMS après retrait, indique une rugosité plus élevée de la surface de contact. La caractérisation des échantillons par profilométrie mécanique n'a pas été possible de par le caractère très mou du matériau. Les mesures AFM (effectuées par Mehdi Ammar) ont alors permis d'obtenir le résultat suivant (figure 3.33) :



**Figure 3.32** : Mesures AFM d'un support de PDMS (référence à gauche) et une surface après un seul cycle de collage/retrait à 29,6 W avec du méthanol comme lubrifiant (à droite)

Le cliché à droite montre la surface fracturée du PDMS après un arrachement. Les mesures AFM confirment que la rugosité moyenne de l'échantillon est fortement impactée par un

cycle de collage/retrait. Cette dernière passe en effet de 2 à plus de 10 fois plus après un seul retrait. Ces clichés montrent que même après un seul cycle, une partie du PDMS est transféré d'une surface à l'autre.

Une élévation de la rugosité s'accompagne généralement d'une amélioration de l'adhérence car la surface active devient plus grande. Ceci est vrai jusqu'à un certain point où l'on assiste à une dégradation de l'adhérence, les surfaces en regard n'arrivant plus à s'ancrer chimiquement mais mécaniquement. En effet, nous avons pu observer qu'au-delà du 3<sup>ème</sup> cycle, le collage n'était plus efficace, probablement car au fil des retrait, plus de PDMS était transféré d'une surface à l'autre, augmentant fortement la rugosité jusqu'au seuil d'adhérence. Il serait intéressant de poursuivre les caractérisations fluidiques (flux limite) et de rugosité afin de déterminer ce seuil.

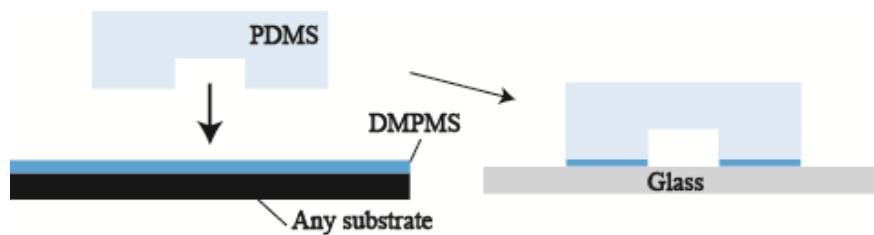
#### b. Collage PDMS/DMPMS :

Utilisé depuis le début des années 2000, le PDMS est devenu un silicone très populaire en microfluidique. Des versions dérivées modifiant ses propriétés chimiques commencent à être exploitées. Du PDMS photosensible (Jothimuthu et *al.* 2009) et du PDMS conducteur (Deman et *al.* 2011) sont utilisés par plusieurs équipes. Le DMPMS (Dimethyl MethylPhenylmethoxy Siloxane), commercialisé par Dow Corning pour des applications en microélectronique, a récemment été utilisé pour effectuer du collage réversible de puces microfluidiques (Vézy et *al.* 2011). Pour cela, une fine couche de DMPMS, dilué à l'heptane (diminuant sa viscosité), a été déposée sur du verre, de l'or, du silicium ou encore du COC, avant de coller réversiblement du PDMS à l'aide d'un traitement par plasma O<sub>2</sub> de 3 min à 50 W. Après le retrait du capot de PDMS, le substrat a été nettoyé à l'éthanol pour enlever les résidus de DMPMS et a pu être réutilisé. Le nombre de réutilisations n'a pas été précisé dans l'étude précitée.

Nous avons voulu reproduire ces conditions de collage au laboratoire. Comme il est difficile d'obtenir l'autorisation d'utiliser l'heptane en salle blanche, nous avons dû utiliser le DMPMS non dilué. Il a été déposé sur un wafer de verre 2 pouces à une vitesse de 5000 rpm, une accélération de 500 rpm/s durant 90 s avant d'être recuit durant 2 min à 70°C. En utilisant les conditions de plasma O<sub>2</sub> décrits par Vézy (3 min, 50 W, 0.26 mbar), nous ne sommes jamais arrivés à retirer le capot. Ceci n'a été possible qu'en diminuant le temps de traitement à 1 min (sur le délaqueur PICO de l'IEF). Ainsi, au moins 3 cycles de collage/retrait ont pu être effectués sur le même substrat, avec des capots différents. Dans le cas où un lubrifiant

(éthanol) a été utilisé lors de la mise en contact, le dispositif a dû être séché durant 60 min à 60 °C pour évaporer le solvant. Ce procédé a ainsi pu démontrer son efficacité.

Voulant l'utiliser sur des substrats sans avoir à recouvrir toute la surface de DMPMS à cause de la présence éventuelles d'électrodes, nous avons essayé de reproduire ce collage réversible, non plus en spincoatant le DMPMS sur le substrat, mais en imprimant une fine couche sur le capot (*stamping*, Salomon et al. 2012). Pour cela, une fine couche de DMPMS est préalablement déposée sur un premier wafer, puis le capot en PDMS est posé dessus afin de transférer environ 12 µm de DMPMS (figure 3.33).



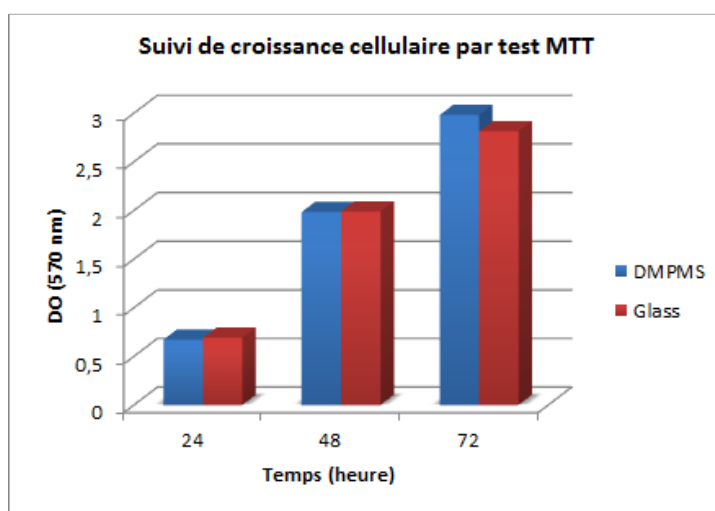
**Figure 3.33 :** Procédure de dépôt de DMPMS par stamping.

Le traitement plasma d'oxygène des deux faces (30 s à 1 min, 50 W, 0,26 mbar) produit un collage irréversible des surfaces. En revanche, un simple recuit à 70°C durant 1 à 5 heures, a permis d'effectuer plusieurs cycles de collage sur un même substrat. Les caractérisations fluidiques montrent néanmoins que le procédé est encore à optimiser, notamment en ce qui concerne sa reproductibilité. Ceci est probablement dû au fait que la procédure de transfert est manuelle, et donc variable selon l'opérateur.

- **Biocompatibilité du DMPMS**

La voie envisagée pour l'utilisation du DMPMS est extrêmement encourageante mais le procédé développé étant principalement destiné au packaging de puces microfluidiques pour des applications biomédicales, la biocompatibilité du DMPMS est indispensable. Or, cette dernière n'a pas encore été avérée. Nous avons donc entrepris des premiers tests de culture de cellules adhérentes B16F10 (cellules murines dérivées de mélanomes) sur des substrats recouverts de DMPMS. Le premier constat était que les cellules n'adhéraient pas sur ce produit, probablement à cause de son hydrophobie (80 °C d'angle de contact à l'eau). Nous avons donc décidé d'utiliser des cellules en suspension CEM (dérivées de lymphoblasts humains) qui, contrairement aux précédentes, ne nécessitent pas l'adhésion à une surface durant la prolifération.

Dans un premier temps, malgré une stérilisation à l'éthanol 70%, des contaminations bactériennes similaires à l'E-Coli apparaissaient très vite dans les cultures faussant ainsi les tests de toxicité. Les substrats ont donc été stérilisés aux UV durant 1 h de chaque côté (le DMPMS et le contrôle, qui est un substrat de verre). Cette stérilisation a été efficace car aucune contamination n'a été observée par la suite. Dans ces conditions, un test MTT a pu être effectué pour déterminer la toxicité du DMPMS. Dans ce type de test, du sel de tetrazolium est ajouté à la suspension cellulaire. Ce dernier est réduit en formazan seulement dans les mitochondries des cellules actives, produisant un précipité violet. Les cellules sont ensuite lysées et une mesure de densité optique permet de connaître l'intensité de violet, renseignant sur la quantité de cellules actives. Ces valeurs sont toujours comparées à un contrôle (ici une prolifération sur du verre). L'évolution de la quantité de cellules actives permet ainsi d'évaluer la toxicité du produit en question. Les résultats de ce test sur 72 h sont présentés en figure 3.34.

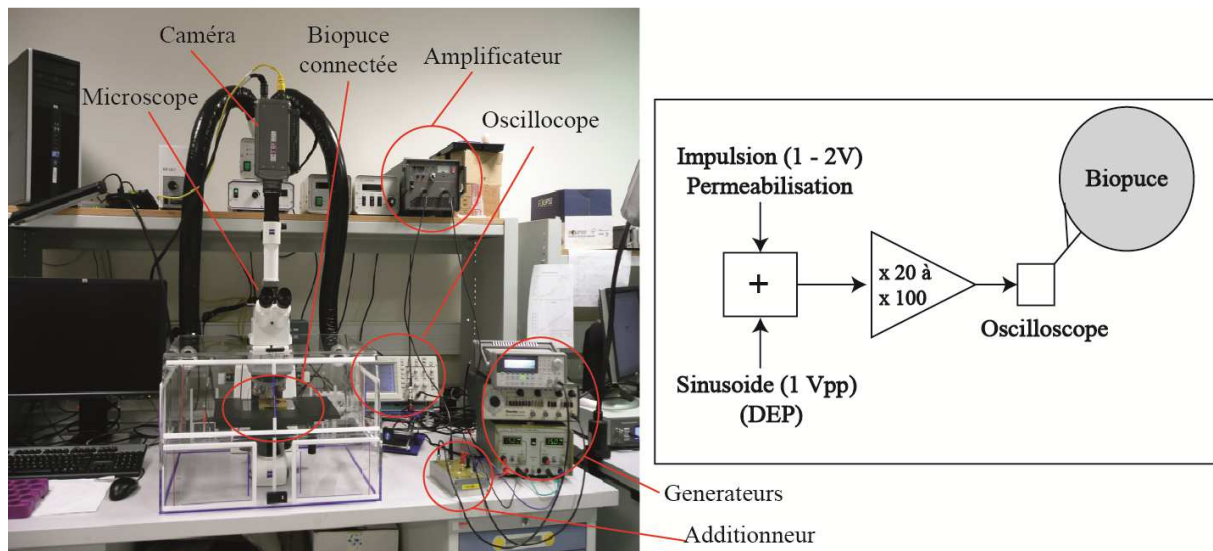


**Figure 3.34 :** Test de toxicité MTT de cellules CEM sur DMPMS traité à la lampe UV durant 1 h de chaque côté.

La figure précédente montre que la quantité de cellules actives est sensiblement la même que ce soit sur le DMPMS ou sur le verre. De plus, cette quantité augmente au fil des jours, prouvant que les cellules prolifèrent correctement. En conclusion, la toxicité du DMPMS n'a pas été démontrée, ce qui est un point très positif pour nous. Notons toutefois que celui-ci doit être traité à la lampe UV durant 1 h de chaque côté afin de garantir sa stérilisation.

### III.3. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons pu décrire l'ensemble des étapes de fabrication de la biopuce, en soulevant parfois les difficultés rencontrées. Grâce aux optimisations apportées, des dispositifs transparents sur quartz intégrant des électrodes en or plus ou moins épaisses entourées de canaux/pièges en SU8 ont pu être fabriqués, en intégrant un packaging fonctionnel compatible avec une réutilisation de la puce. Ainsi, le procédé de packaging SU8/PDMS très efficace, reproductible et facile à mettre en œuvre en utilisant une fonctionnalisation de surface a été développé et caractérisé. Des biochips complets ont alors pu être utilisés pour le piégeage, l'électroporation et l'électrofusion de cellules. Durant ces expériences, les dispositifs sont connectés selon le schéma de la figure 3.36 afin de délivrer en toute sécurité des impulsions de forte amplitude en même temps qu'un piégeage électrique ou fluïdique.



**Figure 3.35 :** Set-up complet pour les tests sur cellules (gauche) et schéma électrique équivalent (droite)

Bien que le packaging par silanisation soit efficace et nous ait permis d'effectuer la majorité des expériences biologiques en flux qui seront détaillées dans le chapitre suivant, nous avons commencé à développer deux autres types de packaging réversible pour faciliter l'étape de rinçage et d'utilisation optimale des dispositifs. Ces méthodes de collage sont prometteuses mais nécessitent encore quelques ajustements afin d'être appliquées sur des dispositifs complets.





## **Chapitre 4**

# **Résultats des expérimentations biologiques**

Ce chapitre présente les résultats d'électroperméabilisation et d'électrofusion sur cellules biologiques obtenus dans le cadre des différentes structures développées. En premier lieu, ce chapitre aborde l'effet du milieu de fusion et de ses différentes caractéristiques sur l'électroperméabilisation, la fusion, la déformation et la viabilité des cellules lors de l'application de la diélectrophorèse ou des impulsions électriques. Utilisant le milieu de fusion optimal, la dynamique d'électrofusion est étudiée dans la structure à plots isolants. Les résultats de piégeage de cellules dans les deux structures de parallélisation sont ensuite présentés et comparés. Enfin, les résultats d'électrofusion sur la structure de parallélisation par plots conducteurs sont détaillés.

## **IV.1. Milieux de fusion**

Dans le cadre de l'électrofusion cellulaire, plusieurs contraintes sont à prendre en considération pour la détermination du milieu optimal à utiliser lors des expériences de fusion. Les deux principales caractéristiques du milieu sur lesquelles nous pouvons agir sont la conductivité électrique et l'osmolarité. Il s'agit alors de voir leur influence sur les caractéristiques géométriques et électriques des cellules ainsi que leur viabilité.

### **IV.1.1. Conductivité et électroperméabilisation :**

Le premier critère à prendre en compte dans l'élaboration du milieu de fusion est sa conductivité. En effet, dans la majorité des structures que nous avons développées, la force de diélectrophorèse positive est l'outil de placement et d'appariement des cellules. Dans le but d'appliquer cette force, le facteur  $K_{CM}$  doit être positif (voir chapitre 2). Pour cela, le milieu extracellulaire doit être plus faiblement conducteur que le milieu cytoplasmique (ce dernier valant en général  $\sim 0,4$  S/m).

L'autre conséquence bénéfique de l'utilisation d'une faible conductivité est de limiter l'échauffement du milieu. En effet, l'application d'un champ électrique durant une longue période sur un milieu chargé en ions provoque, par effet Joule, un échauffement du milieu (chapitre 2). Les cellules biologiques étant très sensibles aux changements de température, il est important de limiter cet effet.

Cependant, il est également important de connaître l'effet de la conductivité du milieu sur le phénomène d'électroperméabilisation.

L'électroperméabilisation des cellules suite à l'application d'impulsions électriques de quelques dizaines de microsecondes est due à l'augmentation du potentiel transmembranaire jusqu'au seuil critique. Cette augmentation résulte de l'accumulation d'ions de part et d'autre de la membrane lipidique. Ainsi, la perméabilisation de la cellule est liée au déplacement des charges présentes dans les milieux intra et extra cellulaires vers la membrane. L'influence de la conductivité externe sur l'efficacité de l'électroperméabilisation a été étudiée par plusieurs groupes (Neumann 1992, Sukhorukov et *al.* 1998, Pucihar et *al.* 2001, Ferreira et *al.* 2008, Silve 2011). Il apparaît que dans le cas d'impulsions de 10 à 100  $\mu$ s de durée (micropulses), l'efficacité de perméabilisation décroît légèrement pour les faibles valeurs de conductivité (inférieures à 0,01 S/m). Cette dépendance conductivité extracellulaire/ efficacité d'électroperméabilisation a aussi été modélisée par Ivorra et *al.* (2010). La dépendance de la

constante de temps de charge de la membrane cellulaire en fonction de la conductivité extracellulaire pourrait expliquer ce phénomène.

La constante de temps de la membrane est calculée d'après l'équation 4.1 :

$$\tau_{me} = \frac{1}{2} \frac{R_{cell} \epsilon_{me} \epsilon_0}{e} \frac{\sigma_{cy} + 2\sigma_m}{\sigma_{cy} \sigma_m} \quad (4.1)$$

avec  $R_{cell}$  le rayon de la cellule,  $\sigma_{cy}$  et  $\sigma_m$  les conductivités du cytoplasme et du milieu,  $\epsilon_{me}$  et 'e' étant respectivement la permittivité relative et l'épaisseur de la membrane et enfin  $\epsilon_0$  la permittivité du vide. Le tableau 4.1 présente les ordres de grandeur de la constante de charge de la membrane pour différentes valeurs de conductivités de milieu en considérant une conductivité cytoplasmique de 0,4 S/m (Whitesides 1983, Gascoyne et al. 1997, Laforêt 2010).

**Tableau 4.1 :** Constante de temps de charge de la membrane cytoplasmique en fonction de la conductivité

externe pour :  $R_{cell} = 10 \mu\text{m}$ ,  $e = 5 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{me} = 5$ ,  $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ s}^4 \text{ A}^2 \text{ m}^{-3} \text{ kg}^{-1}$  et  $\sigma_{cy} = 0,4 \text{ S m}^{-1}$

Conductivité du milieu $\sigma_m$ /(S/m)	1,5	1	0,1	0,03
Constante de temps de la membrane $\tau_{me}$	250 ns	265 ns	663 ns	1,7 $\mu\text{s}$

Il apparaît que le temps de charge de la membrane est inversement proportionnel à la conductivité du milieu extracellulaire. Cependant,  $\tau_{me}$  est de l'ordre que quelques centaines de nanosecondes pour des conductivités proches de celle des milieux physiologiques (1,5 S/m), du milieu de culture (1 S/m) ou des conductivités un peu plus faibles. La conductivité du milieu de fusion utilisé lors de nos travaux est de l'ordre de 0,03 S/m. Dans ce cas, la membrane se charge en moins de 2  $\mu\text{s}$  ce qui, pour des impulsions classiques (centaine de microsecondes, ou de l'ordre de la milliseconde) correspond à un temps assez court. Ainsi, le potentiel transmembranaire atteint rapidement sa valeur d'équilibre, et de ce fait l'initiation et l'efficacité de la perméabilisation restent indépendantes de la conductivité du milieu. Cependant, dans le cas d'impulsions ultra courtes (nanopulses), la conductivité du milieu reste un paramètre déterminant pour l'efficacité de perméabilisation (Silve 2011, Silve et al. 2011)

#### IV.1.2. Effet de l'osmolarité :

Le second paramètre à prendre en considération lors de l'élaboration du milieu de fusion, pour assurer la viabilité des cellules et l'efficacité de fusion, est l'osmolarité. En effet, la réduction de la concentration en ions dans le but de diminuer la conductivité a aussi pour effet de rendre le milieu hypotonique. Effectivement, le cytoplasme devient plus concentré en

ions que le milieu extracellulaire (en général 0,6 mM d'ions pour ce dernier, qui correspondent à 2 mOsm ou mOsmol/L). Les milieux exerçant sur la membrane une pression proportionnelle à leur concentration ionique, un flux d'eau du milieu hypotonique vers le milieu hypertonique se produit à travers la membrane afin de rétablir l'équilibre hydrique. Ce flux a pour conséquence de gonfler la cellule si cette dernière est plongée dans un milieu hypotonique et à se rétracter dans le cas contraire. La cellule garde sa taille normale dans un milieu isotonique (concentration identique entre les deux milieux, soit une osmolarité extracellulaire à 300 mOsm).

Le risque étant la mort cellulaire dans les cas extrêmes (comme l'eau très salée pour l'hypertonique et l'eau distillée pour l'hypotonique), il est nécessaire de contrôler l'osmolarité du milieu. Afin d'augmenter cette dernière sans trop élever la conductivité, il faut utiliser une molécule soluble dans l'eau, non conductrice et non toxique. Le choix se porte souvent sur le sucre, le tréhalose ou le sorbitol.

D'autre part, il a été démontré qu'il pouvait être avantageux, pour l'électrofusion, que les cellules aient un volume plus élevé qu'en leur état normal. En effet, le rendement de fusion est considérablement augmenté pour une osmolarité avoisinant 75 ou 100 mOsm (milieu hypotonique) (Sukhorukov et al. 2006, Usaj et al. 2010, Usaj et al. 2012). Il est vrai qu'en augmentant le rayon de la cellule, le potentiel transmembranaire, pour un même champ électrique appliqué, sera plus élevé (chapitre 2). Le champ électrique critique de perméabilisation  $E_c$  est donc plus bas pour des cellules dans un milieu hypotonique (confirmé également expérimentalement par Barrau et al. 2004, Rols et Teissie 1990, Wang et Lu 2006). Cependant, en comparant les seuils critiques de potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_{max}$ ), il apparaît que l'osmolarité n'a pas d'impact sur l'efficacité de perméabilisation pour un  $\Delta\Psi_{max}$  donné. L'augmentation de volume en tant que telle n'a donc pas d'impact sur le mécanisme de perméabilisation (Golzio et al. 1998, Usaj et al. 2012). Pourtant, l'efficacité d'électrofusion reste fortement impactée par l'osmolarité (Tableau 4.2).

**Tableau 4.2 :** Pourcentage d'électrofusion de B16F1 dans des milieux de tonicité différentes en fonction du potentiel transmembranaire max calculé (adaptation de Usaj et al. 2012)

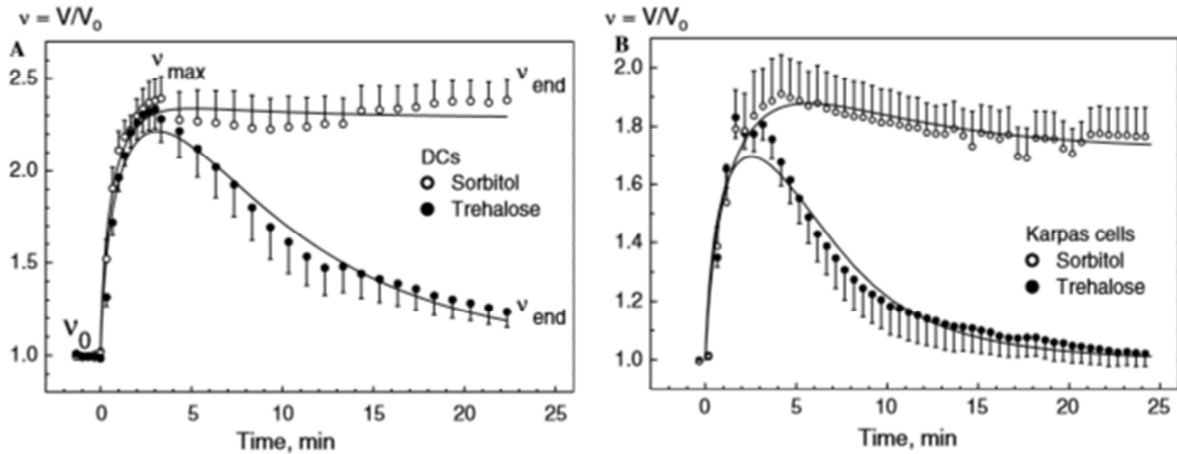
Potentiel transmembranaire max (V)	Isotonique	Hypotonique
1,12	<5%	20%
1,68	15%	32%
2,23	32%	41%

L'augmentation du rendement de fusion dans un milieu hypotonique n'est donc pas due à une baisse du seuil critique  $\Delta\Psi_{\max}$  simplement suite à une augmentation du rayon mais peut-être à l'état de la cellule (ou plutôt de sa membrane) suite à cette augmentation. Une des raisons possibles serait l'état physique de la membrane suite au gonflement de la cellule. En effet, la tension exercée sur la membrane suite à l'augmentation du volume cellulaire diminuerait les ondulations naturelles à la surface de la membrane ce qui maximiserait la surface de contact entre les deux membranes voisines (Sukhorukov et *al.* 2006, Usaj et *al.* 2012). Il est aussi important de noter que les phospholipides constituant la membrane sont probablement plus « lâches » et moins resserrés quand la membrane est tendue ce qui pourrait aussi favoriser l'électrofusion. Nous pouvons aussi ajouter à cela l'augmentation de la surface de contact simplement due à l'augmentation de la taille de la cellule. Enfin, il est possible que des paramètres biologiques encore peu connus favorisent l'électrofusion dans un milieu hypotonique.

Tous ces changements de caractéristiques découlent de la variation de volume de la cellule ; seule caractéristique directement observable par une méthode optique.

#### a. Variation du volume cellulaire due au choc osmotique:

Le choc osmotique décrit précédemment est en général induit en utilisant du sucrose (342 Da) ou du tréhalose (378 Da) (Usaj et *al.* 2013, Golzio et *al.* 1998). Cependant, les cellules retrouvent rapidement leur taille normale dans ces milieux (au bout de 10 min) grâce à l'activation de leurs canaux membranaires contrebalançant ainsi l'augmentation de volume. Ceci peut être contraignant si la procédure de chargement des cellules dans la biopuce, puis la procédure de fusion, durent plus de 10 min en tout. Une autre solution est d'introduire une molécule plus petite comme le sorbitol (182 Da) qui va pouvoir passer plus facilement à travers les canaux membranaires, et ainsi compenser le flux généré (Sukhorukov et *al.* 2006). La figure 4.1 représente ces différents phénomènes. Il apparaît clairement que les cellules suspendues dans les deux milieux hypotoniques atteignent leur volume maximal au bout de 3 min. Néanmoins, en présence de sorbitol, les cellules gardent leur état « gonflé » alors qu'elles reviennent rapidement à leur volume normal en présence de tréhalose.



**Figure 4.1 :** Comparaison de l'évolution dans le temps du volume relatif de cellules dans des milieux hypotoniques de sorbitol (petite molécule) ou de tréhalose (grande molécule) pour (A) des cellules dendritiques et (B) des cellules cancéreuses Karpas (Sukhorukov et al. 2006)

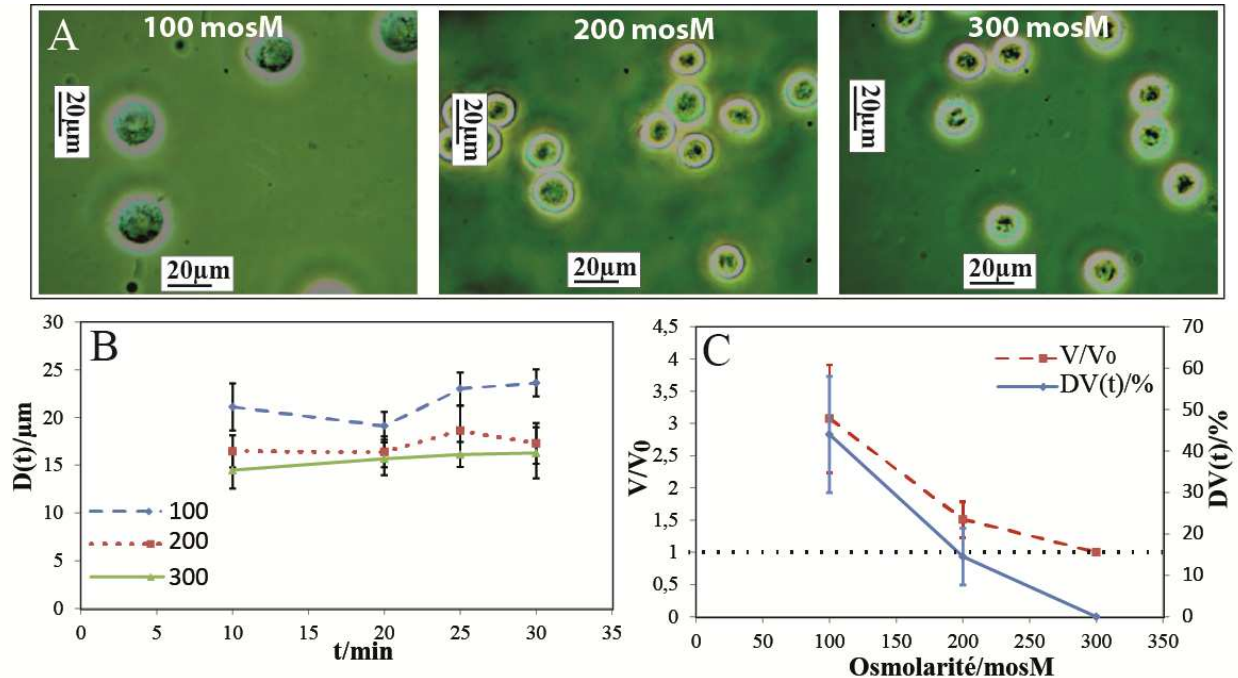
Nous avons comparé l'effet de trois milieux d'osmolarités différentes (contenant du sorbitol) sur des cellules cancéreuses B16F10 : un milieu isotonique (300 mOsm), un milieu que nous appellerons « semi-hypotonique » (200 mOsm) et un milieu hypotonique (100 mOsm). La composition des différents milieux est détaillée dans le tableau suivant.

**Tableau 4.3 :** Composition des différents milieux

Ingredient	Isotonique	Semi-hypotonique	Hypotonique
[Sorbitol] (mM)	300	200	100
[Tris] (mM)	1	1	1
[MgCl <sub>2</sub> ] (mM)	0,7	0,7	0,7
[Ca(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ] (mM)	0,1	0,1	0,1
[BSA] (mg/mL)	1	1	1
Osmolarité (mosM)	300	200	100
pH	7,5	7,5	7,5
$\sigma_m$ (S/m)	0,03	0,04	0,03

La figure 4.2 présente la comparaison et l'évolution du diamètre de cellules plongées dans ces différents milieux. Il apparaît que la taille des cellules reste à peu près constante durant 30 min et qu'elle est plus élevée en milieu hypotonique. Par ailleurs, l'évolution diamètre/osmolarité n'est pas tout à fait linéaire. En effet, l'augmentation du diamètre est d'en moyenne 45% dans le milieu à 100 mOsm alors qu'elle est de 14% dans le milieu à 200 mOsm (en considérant un diamètre de référence à 300 mOsm :  $D_0 = 15 \mu\text{m}$  (Figure 4.2.C)). Cette non linéarité a également été démontrée par Poignard et al. 2010 dans le cas de milieux contenant du NaCl ou du KCl.

Notons que dans le milieu hypotonique (100 mOsm), utilisé par la suite comme milieu de fusion, le volume est doublé voire quadruplé, ce qui concorde avec la littérature (2,4 pour Sukhorukov et *al.* (2006) à 75 mOsm dans le cas de cellules dendritiques).



**Figure 4.2 :** Variation du volume de B16F10 dans des milieux d'osmolarités différentes contenant du sorbitol. (A) Comparaison de l'aspect cellulaire (B) Evolution dans le temps du diamètre (C) pourcentage d'augmentation du diamètre et variation de volume  $V/V_0$  (barres d'erreur :  $\pm$  déviation standard SD).

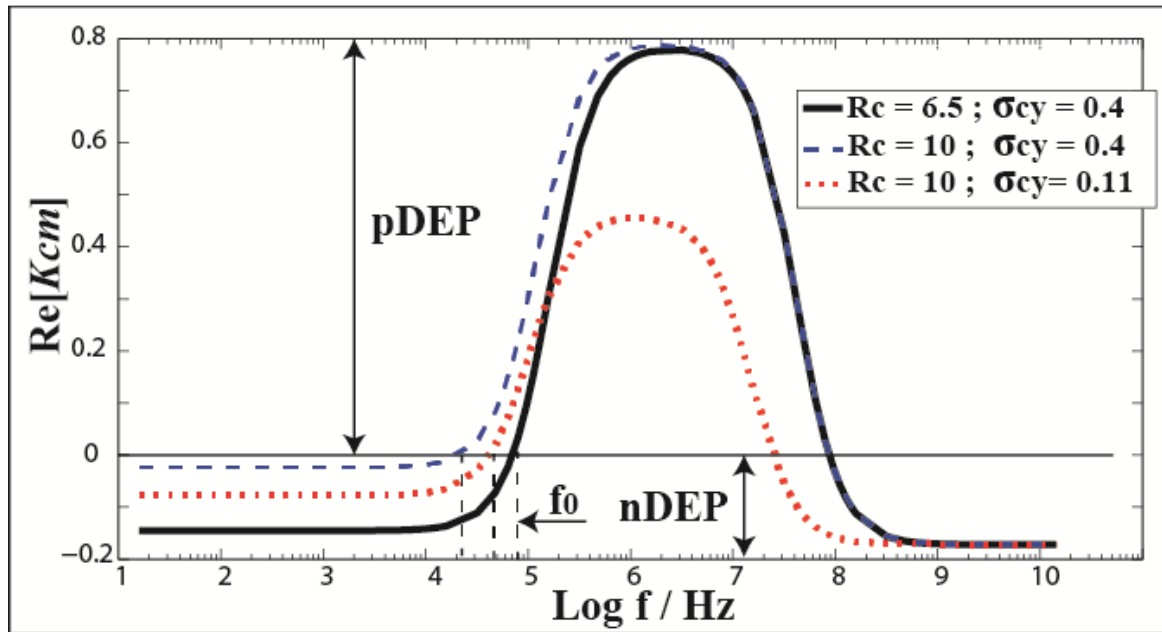
Cette augmentation de volume a un impact de taille sur l'électrofusion de cellules dans des microsystemes. En effet, les pièges doivent être conçus (chapitre 2, partie II.2) connaissant le nouveau rayon des cellules dans le cas du placement fluïdique, et pour le calcul de la diélectrophorèse dans le cas du placement électrique.

***b. Effet du choc osmotique sur la DEP:***

Comme vu précédemment, les cellules gonflent dans un milieu hypotonique. Connaissant la dépendance de la DEP avec le rayon de la cellule (formule (2.10) dans la section II.1.2.a du chapitre 2), cette variation entraîne le changement du comportement diélectrophorétique de la cellule. En effet, le simple fait d'augmenter le rayon de la cellule, tout en gardant ses caractéristiques internes, décale la première fréquence de coupure vers les valeurs plus basses (figure 4.3). De plus, la force de DEP négative devient plus faible en basses fréquences. Cependant, il n'y a pas que le rayon de la cellule qui varie dans un milieu



hypotonique. En considérant que seules des molécules d'eau pénètrent dans la cellule (Poignard et *al.* 2010, Landahl 1948) l'augmentation du volume (de 3,6 dans notre exemple) entraîne une dilution de la concentration ionique du milieu interne et donc une division de la conductivité cellulaire (par 3,6) :  $\sigma'_{cy} = \sigma_{cy} / (V/V_0)$ . En partant d'une cellule de 14  $\mu\text{m}$  de diamètre avec un  $\sigma_{cy}$  initial = 0,4 S/m, nous passons à une cellule de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre avec un  $\sigma'_{cy} = 0,11$  S/m. Cette dilution peut diminuer de moitié la force de DEP positive et décale fortement les deux fréquences de coupure.



**Figure 4.3 :** Partie réelle du coefficient  $K_{CM}$  illustrant le comportement diélectrophorétique en fréquence d'une cellule normale (trait plein), gonflée en ne considérant que l'augmentation de rayon (traits) et en prenant compte de la dilution du milieu interne (pointillés).  $R_c$  représente le rayon en microns et  $\sigma_{cy}$  la conductivité du cytoplasme en S/m. Le milieu extérieur est de conductivité 0,03 S/m.

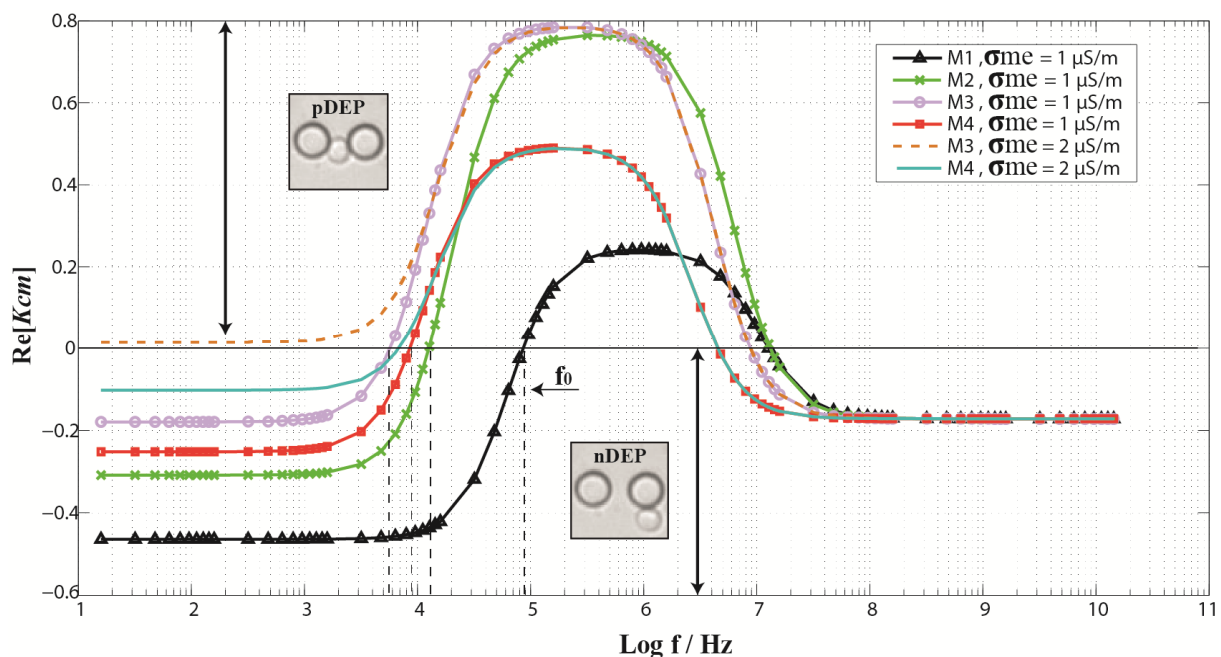
Afin d'étudier expérimentalement l'effet du choc osmotique sur le comportement diélectrophorétique, nous avons utilisé des cellules cancéreuses adhérentes Hela de conductivité interne 0,06 S/m (d'après Wang et *al.* 2009). Les cellules sont tout d'abord décollées à l'aide de trypsine. Après centrifugation, le culot cellulaire est rincé deux fois avec le milieu à étudier avant la mise en suspension. Le comportement diélectrophorétique est ensuite observé dans la structure à plots isolants présentée dans le chapitre 2. Les résultats des observations ainsi que les caractéristiques de chaque milieu sont reportés dans le tableau 4.4.

**Tableau 4.3 :** Résultats de diélectrophorèse sur des cellules Hela dans différents milieux (P : positive, N :

Négative, D : difficile à déterminer, X : non mesurée) le signe + traduit l'intensité de la force

# Milieu	1	2	3	4
Osmolarité/(mOsm)	300	300	200	100
$\sigma_m$ /(mS/m)	30	5	3	5
$R_C/\mu\text{m}$	7,5	7,5	8,5	11
$V/V_0$	1	1	1,45	3,15
$\sigma_{cy}$ /(S/m)	0,06	0,06	0,04	0,02
10 kHz	N++	N+	D	D
500-700 kHz	P+	P++	P++	P+
1 MHe	P	P++	P++	P+
10 MHz	X	P+	X	X

Quant à la figure 4.4, elle représente les résultats de simulations Matlab de la partie réelle du coefficient de Clausius-Mossotti, image de la DEP, d'une cellule Hela dans les différents milieux du tableau 4.3 en prenant en considération la variation de volume ainsi que la dilution du milieu interne.



**Figure 4.4 :** Tracé du spectre diélectrophorétique pour des cellules Hela des milieux du tableau 4.3 en prenant en compte l'augmentation de volume cellulaire et le changement de conductivité en résultant

Un premier constat à propos de la conductivité du milieu peut être fait à partir de la courbe 4.4 : les milieux de très faible conductivité permettent d'exacerber la DEP positive, cependant, la première fréquence de coupure dans ce type de milieux est très basse (autour voire inférieure à 10 kHz). A ces fréquences, il y a un risque d'oxydo-réduction et d'électrolyse (dissociation électrochimique se produisant à l'interface électrodes/liquide). L'électrolyse se traduit par l'apparition de bulles. L'oxydo-réduction dégrade les électrodes et

peut entraîner la lyse cellulaire. Certaines équipes passivent les électrodes afin d'éviter cet effet (Cabodevila et al. 2002) mais réduisent du même coup l'intensité du champ électrique. Nous préférons donc tout simplement éviter d'utiliser des fréquences inférieures à 10 kHz.

La figure 4.4 permet d'autre part de confirmer les variations de DEP dues à l'osmolarité du milieu pour une même conductivité externe (environ 5 mS/m). En effet, grâce aux résultats du tableau 4.4 nous pouvons voir que la première fréquence de coupure dans le cas des milieux 3 et 4 est autour de 10 kHz alors qu'elle est de plusieurs centaines de kHz pour le milieu 1. Il est aussi possible d'observer des variations significatives dans la force de DEP.

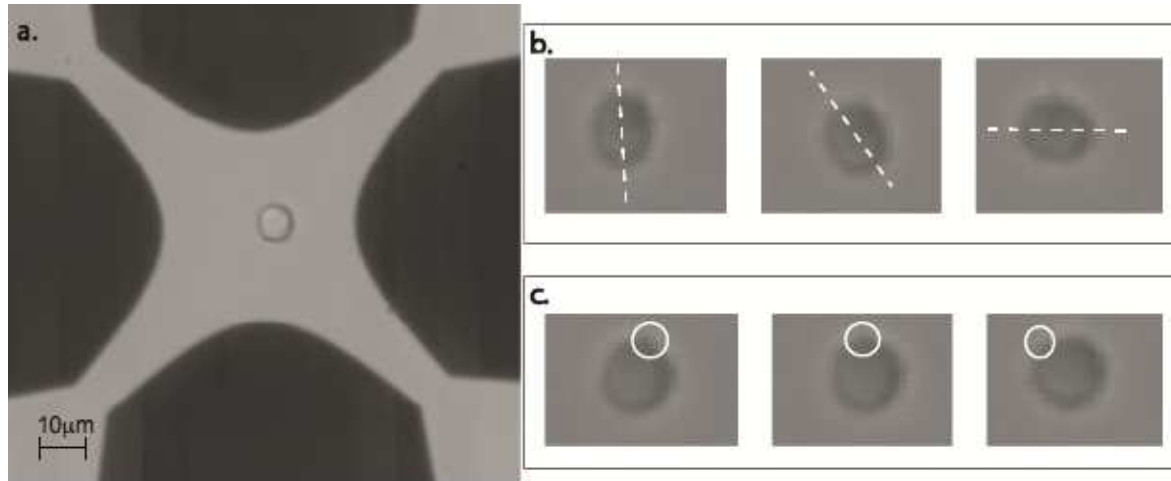
Enfin, il est intéressant de noter que dans le cas des milieux 3 et 4 (semi-hypotonique et hypotonique), nous avons constaté qu'il fallait probablement aussi prendre en considération la variation de conductivité de la membrane. A cause du gonflement et l'étirement de la membrane, il est possible que sa conductivité augmente. Ceci a un fort effet en basses fréquences (diminution voire annihilation de la force de DEP). Cependant, à partir de 10 kHz, les courbes à  $\sigma_{\text{membrane}} = 1 \mu\text{S/m}$  et  $2 \mu\text{S/m}$  se rejoignent. Malheureusement, nous n'avons pas pu confirmer le comportement en DEP des cellules en dessous de 10 kHz à cause du risque d'électrolyse pour vérifier la variation de conductivité liée à la membrane.

Nous venons de voir que l'osmolarité du milieu impacte fortement le comportement diélectrophorétique d'une cellule. Il peut donc s'avérer très utile de connaître les caractéristiques de la cellule dans un milieu donné afin de prévoir son comportement. Cependant, la méthode que nous avons utilisée dans cette partie ne permet que l'observation de la DEP dans une certaine gamme de fréquence et non la détermination des caractéristiques de la cellule. Selon les conditions des milieux intra et extracellulaires la fréquence de coupure basse peut être trop faible pour être mesurable (limitation due au risque d'électrolyse) et la fréquence de coupure supérieure trop élevée (limitation des générateurs en haute fréquence). Afin de remonter aux caractéristiques de la cellule, nous avons dû avoir recours à une autre méthode : l'électrorotation.

### c. Détermination des caractéristiques cellulaires par électrorotation (ROT) :

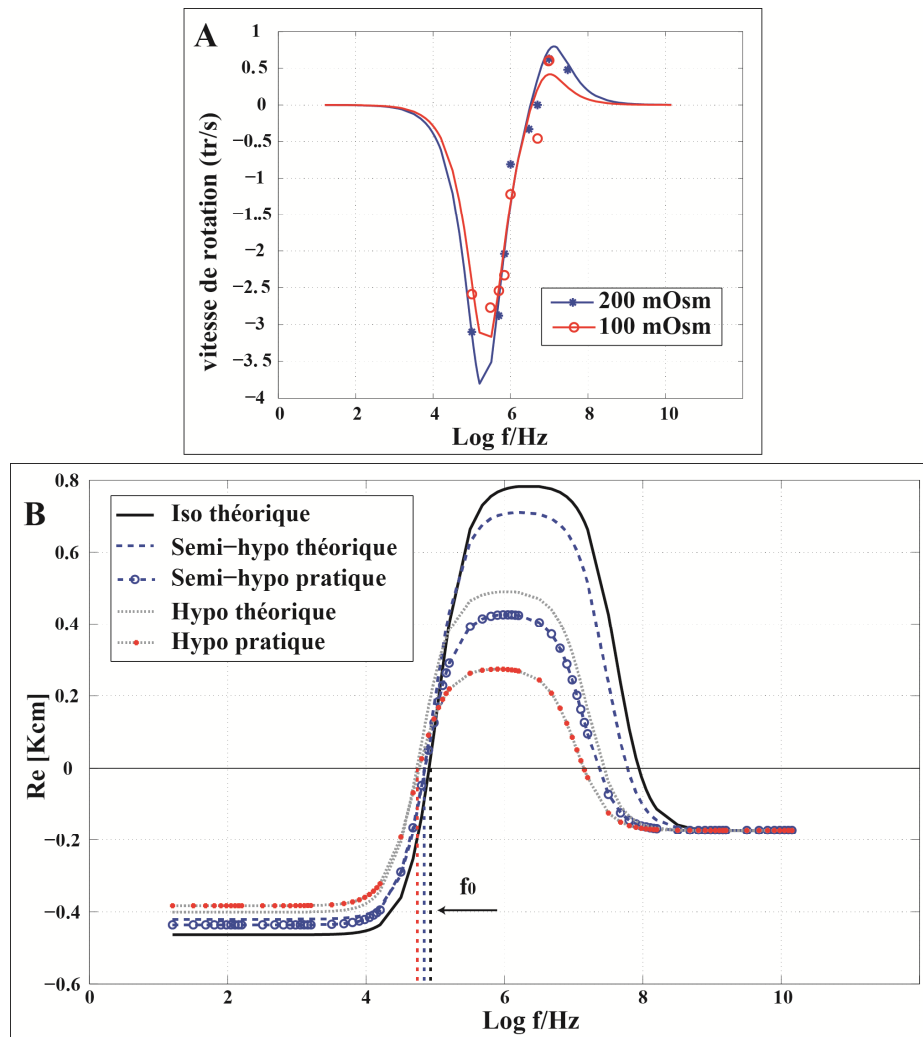
Comme décrite dans le chapitre 2, l'électrorotation (ROT) est une technique utilisant un champ tournant sur 4 électrodes. Contrairement à la DEP où la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti intervient dans l'expression de la force, c'est la partie imaginaire qui apparaît pour la ROT (voir section II.1.1.b du chapitre 2). En utilisant cette dernière, et en traçant le spectre en vitesse de rotation d'une cellule en fonction de la fréquence, il est possible de remonter à ses caractéristiques électriques (permittivité et conductivité). La figure

4.5 montre un exemple de rotation de cellules dans une structure ROT. Notons que dans le cas de cellules parfaitement rondes (en majorité dans notre cas) il peut être difficile de trouver un repère visuel sur la cellule et de le garder durant la procédure de relevé de la vitesse de rotation.



**Figure 4.5 :** Electrorotation (a) une cellule dans la structure d'électrorotation et détermination de sa vitesse de rotation grâce à (b) son axe pour une cellule légèrement déformée et (c) grâce à un repère visuel pour une cellule ronde (rotation antihoraire dans les cas b et c)

La figure 4.6.A présente le résultat des spectres en vitesse de rotation de cellules B16F10 dans les milieux hypotonique et semi-hypotonique. A l'aide de ces courbes de vitesse, de l'équation (2.9) (chapitre 2) et d'un ajustement de courbe sous Matlab©, il est possible d'extraire les caractéristiques des cellules. Les valeurs expérimentales de la conductivité du cytoplasme dans ces deux cas sont présentées dans le tableau 4.5. Nous avons ensuite implémenté ces valeurs afin de comparer les courbes théoriques et pratiques de la partie réelle du coefficient de Clausius-Mossotti (figure 4.6.B).



**Figure 4.6 :** Résultats d'électrorotation. A. Spectres de vitesse de rotation de cellules B16F10 en milieux hypotonique et semi-hypotonique. B. Comparaison de l'évolution de la partie réelle du coefficient  $K_{CM}$  en utilisant les caractéristiques théoriques et les mesures de ROT. Cellules B16F10 ( $\sigma_{cy}$  initial = 0,4 S/m)

**Tableau 4.5 :** Conditions de simulation de la figure 4.6 sur des cellules B16F10

Milieu	Osmolarité mOsm	$\sigma_m$ (S/m)	RC/ $\mu$ m	V/V <sub>0</sub>	$\sigma_{me}$ (S/m) simu	$\sigma_{me}$ (S/m) mesuré	$\sigma_{cy}$ (S/m) simu	$\sigma_{cy}$ (S/m) mesuré
Isotonique	300	0,03	7,5	1	1 e-6	---	0,4	---
Semi-hypo	200	0,03	8,5	1,45	2 e-6	1,6 e-6	0,27	0,1
Hypotonique	100	0,03	11	3,15	2 e-6	2,5 e-6	0,12	0,065

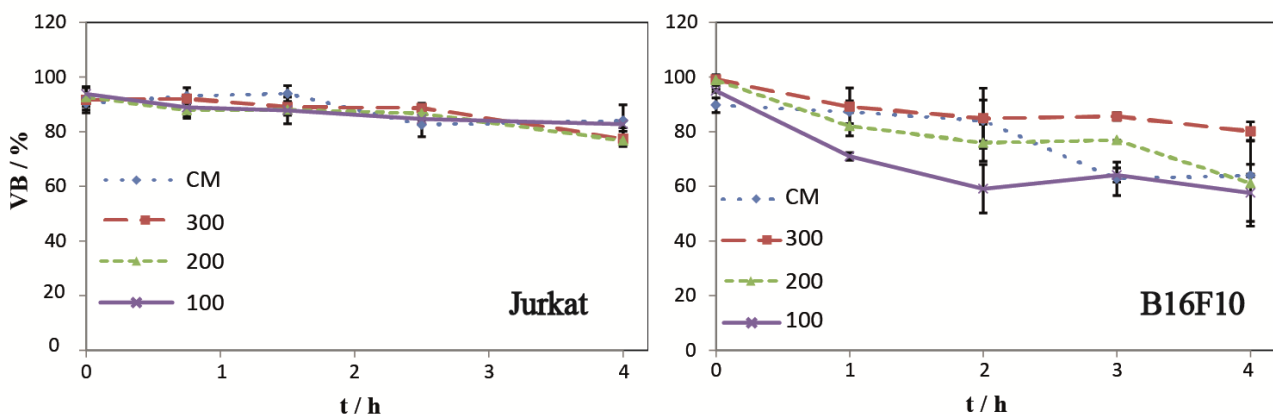
Les expériences d'électrorotation confirment la décroissance de la conductivité cytoplasmique dans les milieux hypotoniques, entraînant un décalage de la fréquence de coupure en DEP.

Les cellules subissant un stress osmotique ne sont pas dans leur état normal et ne devraient pas survivre longtemps. Il est important d'avoir une idée de la cinétique de survie

des cellules dans un milieu hypotonique. La prochaine section traite de l'évolution dans le temps de la viabilité des cellules dans les trois différents milieux.

d. Osmolarité et viabilité cellulaire :

Afin d'observer la cinétique de survie des cellules, nous avons utilisé du bleu de trypan ; colorant utilisé en routine de culture cellulaire pour le comptage. Ce colorant, perméable à la membrane, a tendance à entrer facilement dans toutes les cellules sans exception. Les cellules déclenchent ensuite un mécanisme d'exclusion de la molécule de bleu de trypan rejetant cette dernière de la cellule. Ce principe d'exclusion nécessitant de l'énergie (stockée dans l'ATP), seules les cellules encore actives rejettent la molécule et restent incolores. Ainsi, seules les cellules non actives ou mortes sont colorées en bleu. En utilisant cette méthode, nous avons pu comparer la cinétique de survie sur 4h de cellules Jurkat et de B16F10 plongées dans les 3 milieux de la section précédente (figure 4.7).



**Figure 4.7 :** Viabilité (VB) de cellules (a) Jurkat et (b) B16F10 en suspension dans des milieux d'osmolarités différentes (osmolarité en mOsmol/L, CM = milieu de culture). Barres d'erreur :  $\pm$  SD.

Contrairement aux B16F10, les Jurkat sont des cellules en suspension (se développant sans avoir à adhérer à une surface). Cette caractéristique nous permet de décorrélérer le stress dû à l'état en suspension de celui dû à l'osmolarité du milieu externe. En effet, les B16F10 étant des cellules adhérentes (ayant besoin d'adhérer à une surface pour proliférer), elles subissent un double stress dans les milieux de test (suspension et osmolarité) alors que les Jurkat ne subissent que le stress osmotique. Cette différence peut s'observer sur les courbes de la figure 4.7. Nous constatons que pour des Jurkat, la viabilité reste à peu près stable dans les 3 milieux, en comparaison du contrôle (milieu de culture RPMI, 1% antibiotiques et 10% de sérum fœtal de veau ou SVF). En revanche, le pourcentage de viabilité descend à 80% au bout

de 4h dans les différents milieux. La légère décroissance dans le milieu de contrôle est probablement due à « l'étouffement » au fond du tube.

Dans le cas des B16F10, les résultats sont plus dispersés. Nous pouvons voir que même pour le contrôle (milieu de culture DMEM, 1% antibiotiques et 10% SVF) la viabilité est fortement diminuée à partir de 3h de suspension. Nous observons aussi que la baisse de la viabilité est d'autant plus importante que le stress osmotique est important. En effet, au bout de 2h, plus de 80% des cellules survivent dans un milieu isotonique et un peu moins en semi-hypotonique alors que 60% seulement survivent en milieu hypotonique. Nous considérons donc que la durée de suspension des cellules dans ce dernier milieu ne doit pas excéder 1h, voire 30 min, afin d'avoir au moins 70% de survie. Nous avons aussi observé, lors des expériences d'électrofusion, que les cellules ne réagissaient plus aussi bien aux impulsions au-delà de 30-45 min d'immersion dans le milieu hypotonique car les cellules commençaient à être en souffrance.

Dans la prochaine partie, nous allons justement étudier l'effet d'un champ électrique, mais d'abord du point de vue de la déformation mécanique.

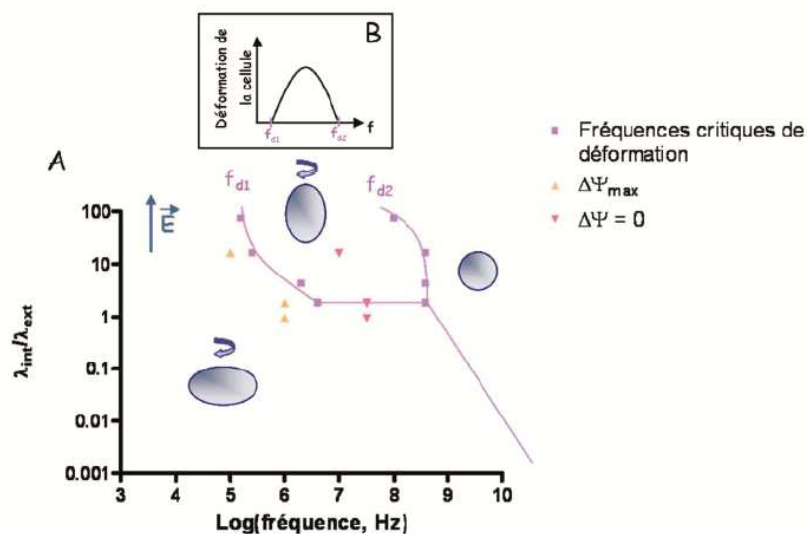
#### **IV.1.3. Déformation mécanique d'une cellule pendant l'application d'un champ électrique ou « électrodéformation » :**

Il a été démontré par Friend et *al.* en 1975 que l'application d'un champ électrique AC sur des cellules s'accompagnait de la déformation mécanique de ces dernières. Ces distorsions seraient dues au mouvement des ions dans la couche externe proche de la membrane lipidique sous l'application d'un champ. Ce mouvement entraînant, via les liaisons visqueuses, un mouvement de fluide parallèle à la membrane provoquant ainsi une contrainte de cisaillement sur cette dernière. Cette contrainte se traduit alors par la déformation de la particule (cellule ou vésicule) (Mauroy 2011). Tout porte à croire que ces forces transitoires peuvent précéder et accompagner le phénomène d'électroperméabilisation (Sukhorukov et *al.* 1998). Dans cette section nous allons rapidement lister ces déformations et voir qu'elles sont fortement dépendantes du milieu extracellulaire (osmolarité et conductivité). Pour cela, nous différencieront les déformations dans un champ alternatif AC et celles dues à une impulsion unipolaire DC.

##### **a. Déformation due à l'application de la diélectrophorèse:**

Comme dit précédemment, durant l'application d'un champ électrique AC, les cellules peuvent se déformer dans la direction du champ électrique ou dans la direction

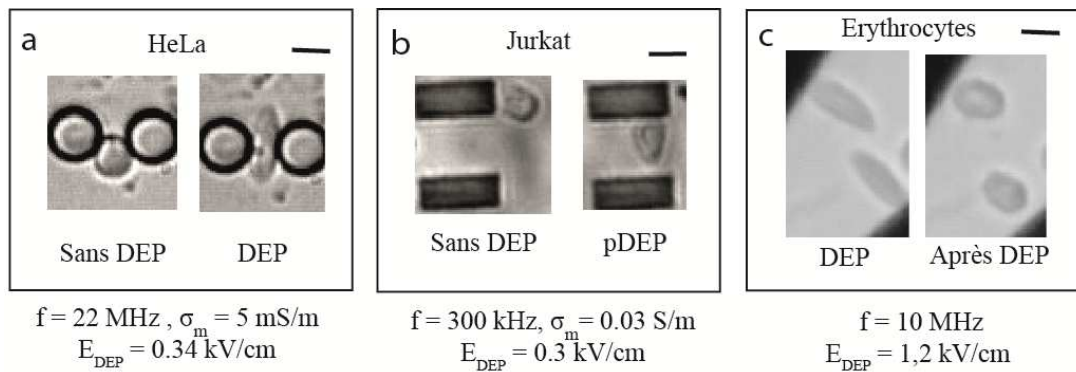
perpendiculaire. Il semblerait que la direction de déformation soit fortement dépendante de la différence de conductivité entre les milieux intra et extra cellulaires ainsi que de la fréquence appliquée. La figure 4.8 résume les déformations proposées par Sukhorukov et *al.* en 1998. Ces derniers ont ainsi pu observer la déformation à 2 MHz d'érythrocytes dans la direction du champ électrique lorsque les cellules étaient plongées dans un milieu faiblement conducteur (inférieurs à 0,2 S/m). Cette déformation augmenterait linéairement avec le carré du champ électrique. Il est aussi intéressant de noter que les cellules amibe protégées plongées dans un milieu de conductivité égale à 0,02 S/m sont soumises à une compression (élongation dans la direction perpendiculaire aux lignes de champ) pour des fréquences entre 1 et 100 kHz et dans la direction du champ pour de plus hautes fréquences (jusqu'à 10 MHz) (Friend et *al.* 1975).



**Figure 4.8 :** A. Résumé des déformations d'érythrocytes proposées par Sukhorukov et *al.* 1998 où  $\lambda_{int}$  et  $\lambda_{ext}$  sont les conductivités interne et externe respectivement et  $f_{d1}$  et  $f_{d2}$  les deux fréquences critiques de déformation. La déformation est maximale à une fréquence intermédiaire entre  $f_{d1}$  et  $f_{d2}$  (Mauroy 2011)

La figure 4.8 traduit bien la dépendance en conductivité et fréquence de la déformation en champ AC dans le cas d'érythrocytes. En effet, aux basses fréquences ( $f < f_{d1}$ ) la cellule est allongée dans le sens perpendiculaire à la direction du champ électrique alors qu'aucune déformation n'est observée en hautes fréquences ( $f > f_{d2}$ ). Pour les fréquences intermédiaires ( $f_{d1} < f < f_{d2}$ ), la déformation dépend de la différence de conductivité : dans un milieu faiblement conducteur ( $\lambda_{int}/\lambda_{ext}$  ou  $\sigma_{cy}/\sigma_m > 1$ ) la déformation est parallèle au champ, et dans le cas contraire, elle est perpendiculaire à celui-ci. En nous plaçant dans des milieux de faible conductivité ( $\sigma_{cy}/\sigma_m > 1$ ), nous avons pu observer la déformation de cellules Hela, d'érythrocytes et de Jurkat (figure 4.9). Toutes ces cellules étant en suspension dans un milieu hypotonique.





**Figure 4.9 :** Observation de la déformation cellulaire de différentes lignées cellulaires (Hela, Jurkat et érythrocytes) dans des milieux hypotoniques avec  $\sigma_{cy}/\sigma_m > 1$ . Barres d'échelle : 20  $\mu\text{m}$

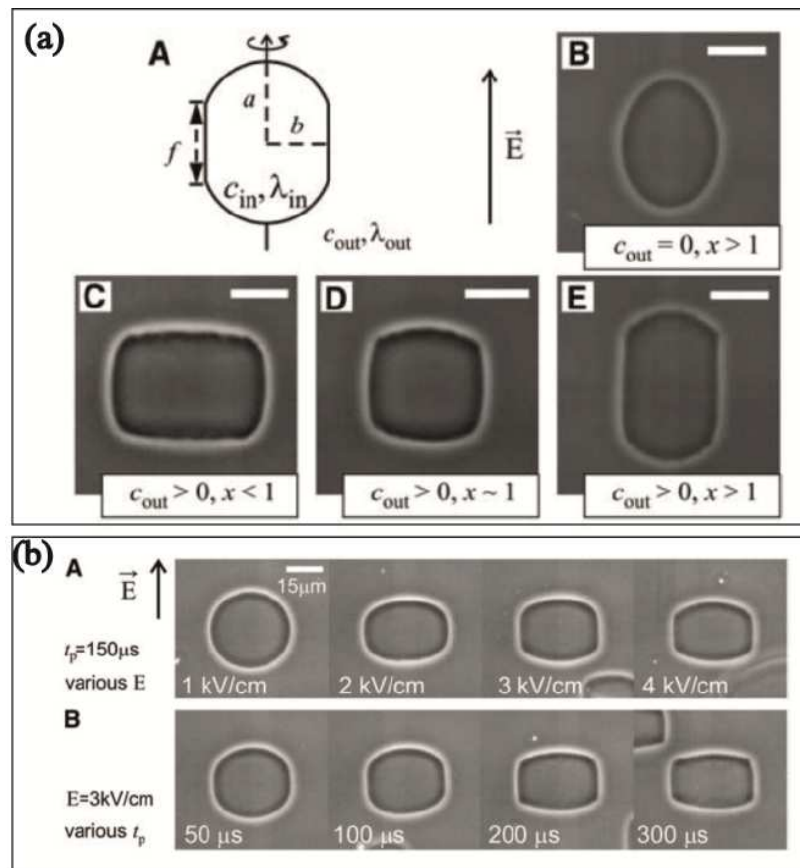
Dans le cas des érythrocytes, les déformations sont conformes à l'étude de Sukhorukov et *al.* 1998 (déformations observées dans la direction du champ électrique pour des fréquences entre 2 MHz et 30 MHz). Cependant, nous n'avons observé la déformation des B16F10 qu'en milieu hypotonique et à plus hautes fréquences (22 MHz) dans la direction du champ électrique. Dans le cas des Jurkat, les déformations pouvaient s'observer à de plus faibles fréquences (même à 300 kHz). Ces différences de comportement peuvent s'expliquer par les différences biologiques entre les lignées cellulaires. En effet, il est connu que les érythrocytes ont une structure interne plus souple (cytosquelette peu rigide) favorisant ainsi la compression des cellules. Les B16F10 étant peut-être dans un état moins rigide en milieu hypotonique (plus de molécules d'eau), elles sont probablement plus compressibles et plus sujettes aux déformations qu'en milieu isotonique.

#### b. Electrodéformation durant l'application d'une impulsion :

Les déformations présentées dans la partie précédente concernent l'application d'un champ électrique AC sur les cellules. Cependant, tout porte à croire qu'à très basse fréquence, ou durant l'application d'une impulsion DC, des déformations peuvent aussi survenir dans les premiers instants de l'application du champ. En cas de présence de ces déformations, elles pourraient induire un stress membranaire facilitant sa perméabilisation (Sukhorukov et *al.* 1998).

Différentes équipes se sont donc intéressées à ces déformations, et ce tout d'abord dans le cas d'un modèle membranaire très utilisé : les vésicules unilamellaires géantes (ou GUV). L'étude de la déformation de ce type de modèle a porté ses fruits. Il a été démontré que les GUVs se déformaient sous l'influence d'une impulsion DC (Riske et Dimova 2006, Mauroy 2011). Cette déformation se rapproche fortement de celle en champ AC. En effet,

elles dépendent aussi de la différence de conductivité intra et extracellulaire et de l'amplitude du champ appliqué (figure 4.10).

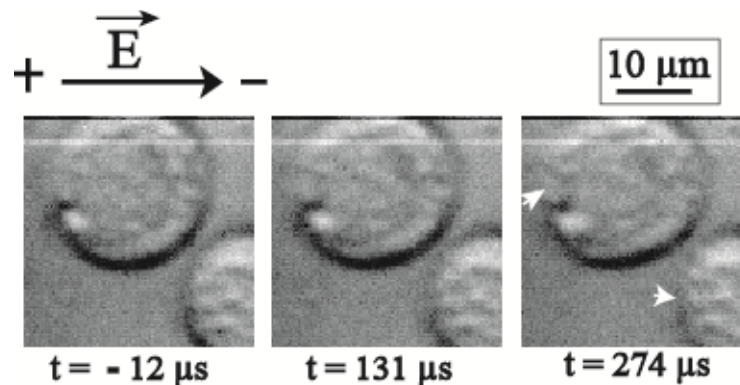


**Figure 4.10 :** Déformation de modèle membranaire (GUVs) dans différentes conditions de (a) conductivité ( $x = \sigma_{int}/\sigma_{ext}$ ) et de concentration en sel ( $c_{out}$  et  $c_{in}$ ) (b) d'intensité de champ électrique et de durée d'impulsion (Riske et Dimova 2006)

Selon les observations de Riske et Dimova, en absence de sel, la déformation des vésicules est ellipsoïdale (Figure 4.10.a.B). La présence de sel provoque un aplatissement des côtés de la cellule en forme de disque (Figure 4.10.a.C) de carré (D) ou de tube (E), selon le rapport de conductivité. L'intensité de la déformation quant à elle serait proportionnelle à l'amplitude du champ électrique DC et de la durée de l'impulsion (figure 4.10.b, où le rapport de conductivité est de 0,05 avec 1 mM de NaCl à l'extérieur).

Nous venons de voir que la déformation durant l'application d'une impulsion électrique classique a déjà été étudiée par quelques équipes et en partie caractérisée. Cependant, ces mêmes déformations n'ont jusqu'à présent été observées que sur des vésicules lipidiques mais n'ont jamais été rapportées dans le cas des cellules. Des études utilisant des impulsions nanosecondes sur cellules ont pris en considération le stress électromécanique durant l'application de l'impulsion. L'élongation transitoire était aussi maximale pour des

milieux très faiblement conducteurs. Si présente, cette déformation était très furtive (de l'ordre de la nanoseconde) et déclenchée avant la modulation du potentiel transmembranaire (Teissié et *al.* 2005, Muller et *al.* 2001, Sukhorukov et *al.* 1998). Durant nos expérimentations, nous avons tenté d'observer la déformation de cellules en impulsion DC grâce à une caméra ultra-rapide. Pour l'instant, la seule déformation observée est une légère élongation des cellules dans la direction du champ électrique durant l'application d'une forte amplitude (figure 4.11) et ce seulement en milieu hypotonique de très basse conductivité, avec des impulsions « longues » (300  $\mu$ s) et élevées (2,5 kV/cm). Cette déformation s'accompagne de la perméabilisation asymétrique de la cellule à cause de la présence du potentiel interne négatif (Gabriel et Teissié 1997). La légère déformation observée n'est pas significative et ne semble donc pas perturber le modèle utilisé (Schwan).



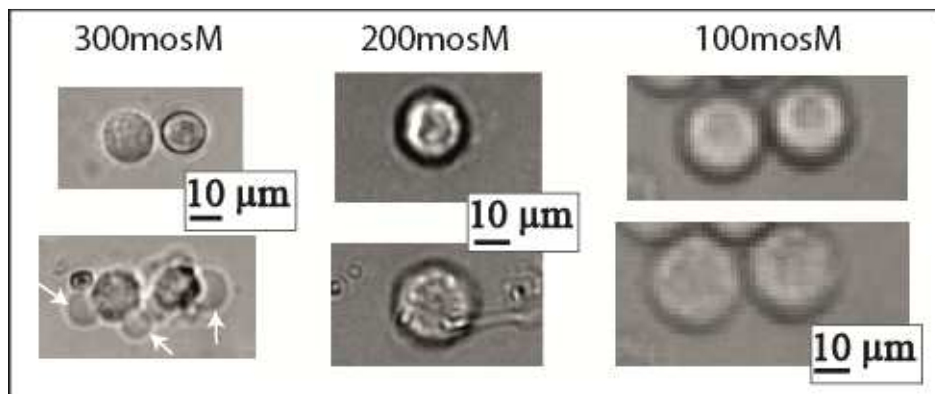
**Figure 4.11 :** Résultats préliminaires de déformation sur cellules Hela en milieu hypotonique à 5 mS/m ( $\sigma_{cy}/\sigma_m > 1$ ),  $E = 2,5$  kV/cm, durée d'impulsion  $t_p = 300$   $\mu$ s. La première image ( $t = -12$   $\mu$ s) est prise juste avant l'application de l'impulsion. Nous pouvons apercevoir une légère déformation dans la direction du champ électrique accompagnée de la perméabilisation des cellules (flèches blanches). Aucune déformation n'a été observée à l'application de champs plus faibles ou en utilisant des conductivités plus élevées.

Après l'application d'une impulsion, que la cellule se déforme ou non durant celle-ci, elle se perméabilise. Dans la prochaine section, nous allons voir les différences de comportement des cellules selon l'osmolarité du milieu externe, ainsi que le changement de caractéristiques électriques dû aux impulsions.

#### **IV.1.4. La cellule après impulsion**

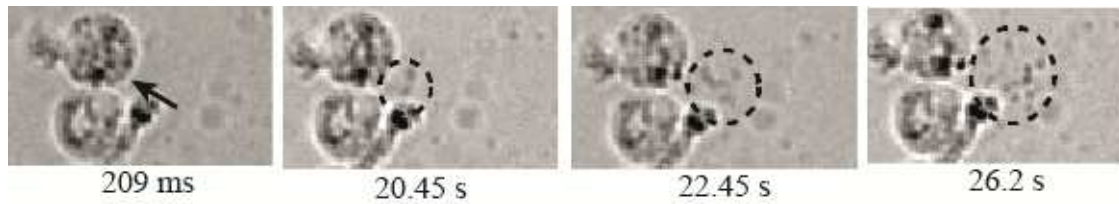
L'application d'impulsions électriques entraîne la perméabilisation des cellules. Cependant, l'aspect de ces cellules ne semble pas le même selon l'osmolarité du milieu utilisé. En effet, lors de l'application d'impulsions de forte amplitude sur des cellules en milieu isotonique, nous avons observé le phénomène de blebbing (ou apparition de

bourgeons, figure 4.12). La formation de ces blebs reste réversible (disparition au bout de 30 min) et n'induit pas forcément la mort cellulaire (Gass et Chernomordik 1990), mais peut compromettre l'électrofusion car le contact entre deux cellules est loin d'être optimal. Il est probable que ces cloques apparaissent en milieu isotonique car la membrane se détache transitoirement du cytosquelette, aux endroits où le potentiel transmembranaire est le plus élevé, à cause de l'entrée massive de molécules extracellulaires (dont de l'eau). Contrairement au milieu isotonique, les cellules perméabilisées en milieu hypotonique ou semi-hypotonique voient leur taille augmenter et l'aspect de leur membrane plus clair, mais pas d'apparition de cloques.



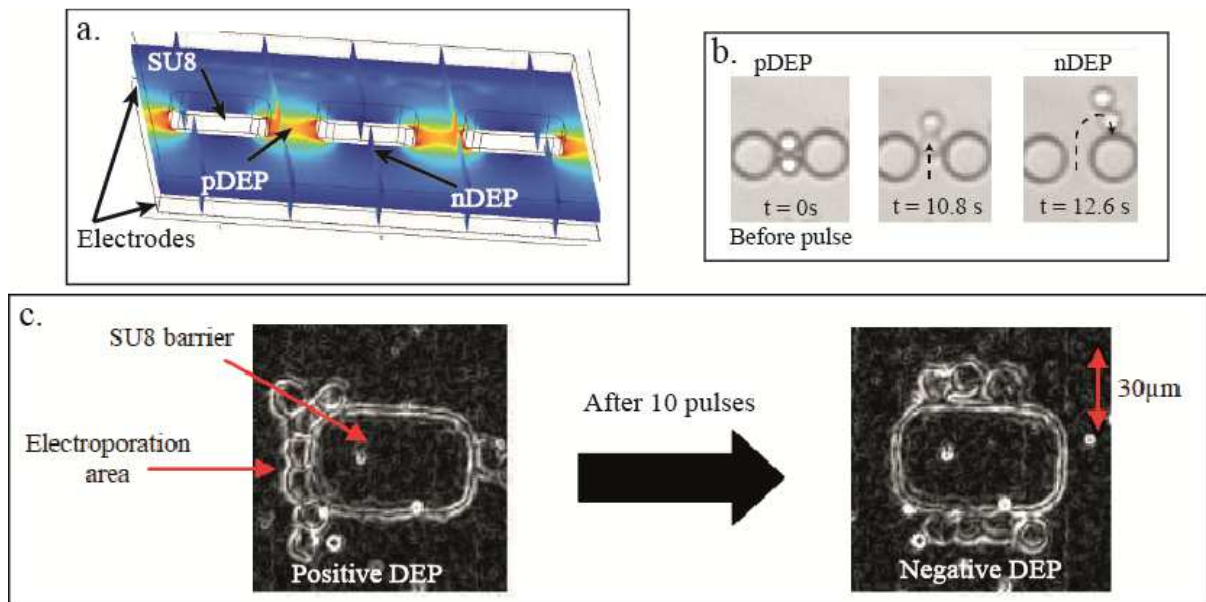
**Figure 4.12 :** Comparaison de l'effet d'impulsions de 100  $\mu$ s,  $E = 2,6$  kV/cm sur des cellules Hela en milieu isotonique (300 mOsm), semi-hypotonique (200 mOsm) et hypotonique (100 mOsm). 1 mOsm = 1 mosmol/L, en haut : avant impulsion, en bas : après 10 impulsions. Des blebs ou bourgeons se forment dans un milieu isotonique (flèches blanches) alors que dans les deux autres milieux, nous n'observons qu'une augmentation du volume cellulaire.

L'augmentation du rayon cellulaire dans ces deux derniers milieux, peut s'expliquer par le passage d'ions et de macromolécules cytoplasmiques à travers la membrane devenue perméable. Cette entrée/sortie créerait un choc osmotique entraînant l'entrée de molécules d'eau pour rétablir l'équilibre hydrique. En effet, l'électroperméabilisation permet l'entrée massive de molécules dans la cellule, mais permet aussi leur sortie. Ceci peut parfois même être optiquement observé (Figure 4.13). Dans nos expériences, la conductivité du milieu extracellulaire est de 0,03 S/m. Il est intéressant de noter que Moisescu et *al.* 2012 n'observent d'augmentation de volume que pour des conductivités supérieures à 0,1 S/m. Cette différence est peut-être due au fait que nous utilisons des milieux hypotoniques, infligeant ainsi au préalable un stress hypotonique aux cellules, auquel s'ajoute le stress osmotique dû à la perméabilisation.



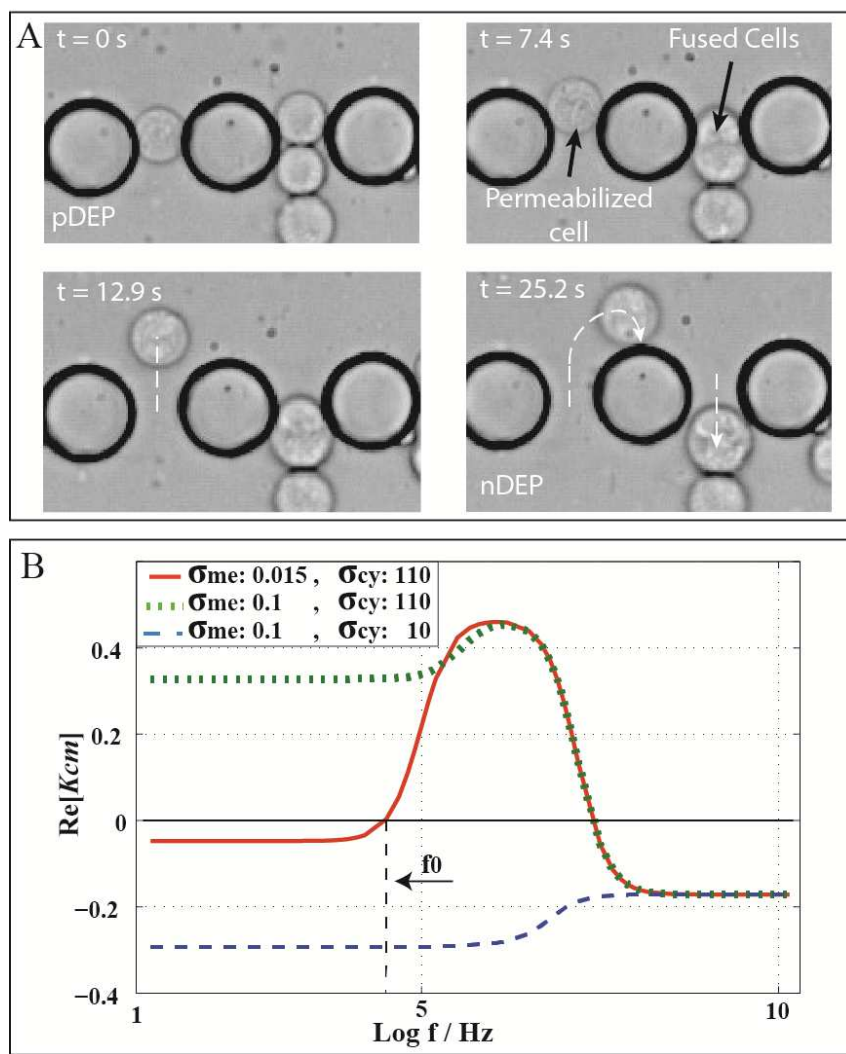
**Figure 4.13 :** Observation d'une perte de matériel cytoplasmique après forte perméabilisation d'une cellule Hela en milieu hypotonique

Nous avons observé un autre phénomène important se produisant lors de la perméabilisation des cellules : le changement de caractéristiques électriques (Figures 4.14 et 4.15).



**Figure 4.14 :** a. Simulation numérique des zones de DEPn et DEPP sur une structure à plots isolants. Passage de DEPn à DEPP de cellules B16F10 (b) et NIH3T3 (c) en milieu isotonique après application de 10 impulsions électriques (Hamdi et *al.* 2011a)

Les cellules tout d'abord piégées en DEP positive, sont électroporées grâce à un train d'impulsions électriques. Le signal de DEP est maintenu durant toute l'expérience sans changer d'intensité ou de fréquence. Dès la perméabilisation des cellules, ces dernières passent en DEP négative. Ce phénomène a été observé en milieu isotonique sur différents types cellulaires (B16F10 et NIH3T3 en figure 4.14) mais aussi en milieu hypotonique (figure 4.15). Ce changement a l'air un peu plus lent dans le cas de cellules fusionnées mais reste présent.

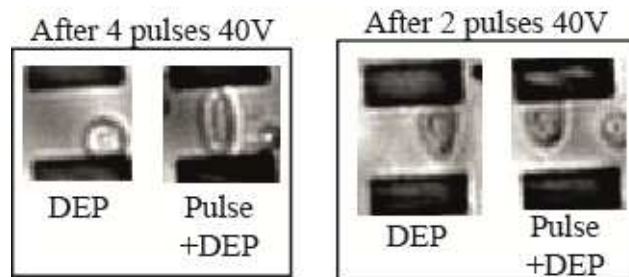


**Figure 4.15 :** Changement de comportement diélectrophorétique de cellules suite à l'application d'impulsions électriques en milieu hypotonique. A. D'abord piégées en DEP positive, des cellules B16F10 électroporées ou même fusionnées passent en DEP négative suite à l'application d'impulsions ( $t = 0$ ). B. Simulation de la partie réelle du coefficient  $K_{CM}$  après impulsions.  $\sigma_{me}$  est la conductivité de la membrane en mS/m,  $\sigma_{cy}$  est la conductivité du cytoplasme (HeLa) en mS/m.

Le flagrant changement de comportement diélectrophorétique des cellules après l'impulsion électrique (passage de DEP positive à négative) traduit un changement de caractéristiques électriques de la cellule provoquant un décalage de la première fréquence de coupure vers des valeurs plus élevées. Une diminution de la conductivité cytoplasmique peut entraîner ce décalage, voire un passage radical en nDEP (figure 4.15.B). Ce décalage a aussi été rapporté par Moiescu et *al.* 2012. Dans cette étude, basée sur le shift de la fréquence de coupure par une observation du comportement DEP, les auteurs expliquent ce décalage par la baisse de la conductivité intracellulaire. En effet, lors de l'électroperméabilisation, un important flux d'ions (majoritairement de potassium) vers l'extérieur, diminue la

concentration ionique interne, baissant ainsi la conductivité cytoplasmique. Ce décalage est aussi lié à la conductivité extracellulaire, probablement car l'efficacité de perméabilisation est d'autant plus grande que la conductivité externe est élevée.

Nous avons pu observer d'autres phénomènes, sur des cellules Jurkat cette fois (figure 4.16). Nous avons par exemple observé que certaines cellules pouvaient développer une forte déformation dans la direction du champ électrique après l'application de l'impulsion électrique. Dans d'autres cas, des cellules sujettes à une déformation lors de l'application de la DEP voyaient cette déformation diminuée après l'application de l'impulsion. Ceci est probablement dû aux changements de caractéristiques électriques des cellules suite aux impulsions. Cependant, par manque de temps, nous n'avons pu approfondir l'étude de ce phénomène.



**Figure 4.16 :** Jurkat après impulsion. Milieu hypotonique,  $\sigma_{mi} = 0,03 \text{ S/m}$ ,  $E_{DEP} = 0,2 \text{ kV/cm}$ ,  $E_{pulse} = 1,1 \text{ kV/cm}$

## **IV.2. Etude de l'électrofusion dans une structure à plots isolants :**

Dans cette partie nous allons étudier les fusions obtenues dans une structure de piégeage à plots isolants (introduite en section II.2.1). Ce type de motifs a été précédemment étudié dans la littérature (Masuda et *al.* 1989), cependant, à ma connaissance, la dynamique et le rendement de fusion en fonction de la zone d'évènement n'ont pas encore été explorés. Nous allons donc présenter ces aspects, après avoir détaillé le protocole utilisé durant les expériences.

### **IV.2.1. Procédure expérimentale et fusion dans la structure à plots isolants :**

Dans toutes nos expériences, les cellules sont tout d'abord décollées de leur support de culture (dans le cas de cellules adhérentes comme les B16F10) en utilisant de la trypsine. Elles sont ensuite suspendues dans du milieu de culture afin d'arrêter l'effet de la trypsine, toxique à long terme. La seconde étape consiste à centrifuger durant 5 min la quantité désirée de cellules afin de concentrer le culot au fond d'un tube et de pouvoir aspirer le milieu de

culture sans perturber les cellules. Avant de suspendre ces dernières dans le milieu optimal de fusion (n'ayant pas obtenu de fusions dans les milieux isotonique et semi-hypotonique, le milieu hypotonique décrit dans le tableau 4.3 a été considéré comme optimal), le culot est rincé deux fois avec ce dernier afin d'éliminer un maximum de milieu de culture fortement conducteur. Les cellules sont ensuite injectées dans la structure de fusion à l'aide d'un système de contrôle de flux dans le cas de puces fermées, ou simplement par dépôt d'une goutte dans le cas des canaux ouverts.

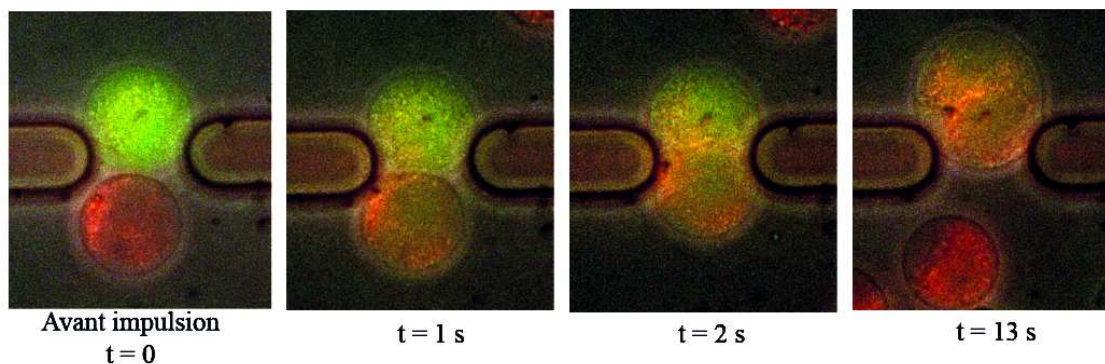
Il existe deux protocoles pour la phase d'alignement dans le cas de l'électrofusion : le « contact first » et le « pulse first ». Comme l'indiquent leurs noms, le premier consiste à d'abord mettre en contact les cellules (par DEP (Sukhorukov et *al.* 2006), ou en laissant les cellules confluentes légèrement adhérer au fond du puits) avant d'appliquer l'impulsion, contrairement au second qui consiste à appliquer l'impulsion avant le contact (par centrifugation ou par DEP). La méthode pulse first a notamment permis de démontrer que l'impulsion réduisait les forces de répulsion entre les cellules dues aux molécules d'eau à l'extérieur de la membrane (chapitre 1) (Teissié et *al.* 1986).

Les deux méthodes ont été comparées dans la littérature. Bien que certaines équipes rapportent un rendement équivalent pour les deux méthodes (Teissié et *al.* 1986, Teissié et *al.* 1993, Sowers 1986), d'autres études montrent que le rendement de fusion est diminué d'au moins la moitié en utilisant le protocole « pulse first » (Wu et *al.* 1992) et ce malgré le bon alignement des cellules (Usaj et *al.* 2013). Ceci peut en partie être dû au fait que la durée de l'état fusogène après l'impulsion ne soit pas clairement défini et soit fortement dépendant du type de lignée cellulaire. En effet, la durée semble aller de moins d'une minute pour les B16F1 et les CHO (Usaj et *al.* 2013) à 10 min pour des clones WTT de CHO et des érythrocytes (Teissié et *al.* 1986, Teissié et *al.* 1993, Sowers 1992, Wu et *al.* 1992). Ceci est probablement dû aux différences de caractéristiques biologiques de ces lignées cellulaires (comme le cytosquelette moins resserré pour les deux dernières lignées) (Teissié et Rols 1994). Ainsi, les divergences entre les études comparatives pulse first/contact first sont peut-être aussi liées à ces différences biologiques. Dans le doute, nous avons préféré nous en tenir au protocole contact first, en particulier parce que la méthode de contact est diélectrophorétique. Comme vu précédemment, l'application de l'impulsion provoque un changement des caractéristiques électriques de la cellule. La force de DEP appliquée sur des cellules ayant subi une perméabilisation sera donc beaucoup moins forte, voire quasi inexistante dans le cas d'une DEP positive. Le protocole retenu pour nos expériences est donc le suivant :



1. Application de la DEP pour apparier les cellules
2. Maintien de la DEP et application des impulsions de fusion
3. Maintien de la DEP pendant quelques secondes, le temps de la fusion membranaire.

En appliquant ce protocole dans la structure à plots isolants, nous avons réussi à obtenir des fusions efficaces et très rapides. La figure 4.17 présente une électrofusion, dans cette structure, de deux cellules dont le cytoplasme a été marqué différemment (FITC pour les cellules vertes et TRIC pour les rouges). Au bout d'une seconde, les colorants commencent déjà à diffuser entre les deux cellules et en moins de 13 secondes, l'hybridome prend une forme sphérique et commence à sortir du piège. La méthode étant validée, nous pouvons passer à l'étude de l'effet de la concentration du champ électrique sur le rendement et la dynamique de fusion.



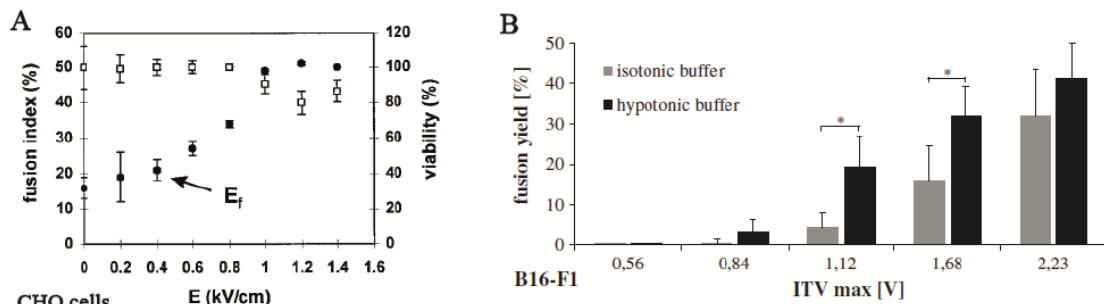
**Figure 4.17 :** Electrofusion de deux cellules B16F10 dont les cytoplasmes sont respectivement marqués en rouge et en vert. A  $t = 1s$ , les deux couleurs commencent à pénétrer dans chacune des deux cellules, sans marquer de fuites externes. A  $t = 2 s$  l'interface entre les deux membranes disparaît déjà, et à  $t = 13 s$  l'hybridome est formé, les deux couleurs se mélangent petit à petit et l'hybridome ressort lentement du piège

#### **IV.2.2. Effet de la concentration du champ électrique sur le rendement et la dynamique de fusion**

##### **a. Rendement de fusion :**

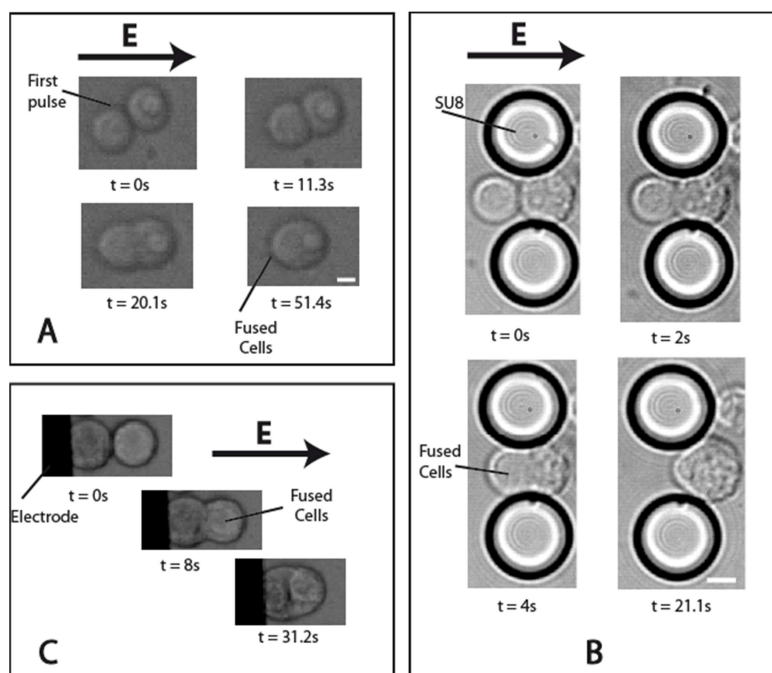
Il a été de nombreuses fois démontré que l'augmentation du champ électrique, et de ce fait le potentiel transmembranaire, améliorerait le rendement de fusion (Teissié et Ramos 1998, Usaj et *al.* 2012). Ces études montrent que plus le champ appliqué (et de ce fait le potentiel transmembranaire) est intense, plus le rendement de fusion est élevé, affectant cependant la viabilité cellulaire (Figure 4.18).

Cependant, ces observations ont toujours été effectuées pour des champs électriques uniformes, appliquant la loi de Schwan pour déterminer le potentiel transmembranaire, sans tenir compte de l'écrantage du champ électrique au point de contact dû à la présence de la cellule voisine (chapitre 2). Nous avons précédemment vu que potentiel transmembranaire est dans ces cas-là plus faible de 30% comparé au potentiel calculé à l'aide de la formule de Schwan.



**Figure 4.18 :** Evolution du rendement d'électrofusion (A) et de la viabilité en fonction du champ électrique pour des CHO (Teissié et Ramos 1998), (B) et en fonction du potentiel transmembranaire max (calculé par la loi de Schwan) pour des B16F1 en milieu hypotonique et isotonique (Usaj *et al.* 2012)

En utilisant la structure à plots isolants, nous avons pu comparer la différence de rendement de fusion dans le cas d'une concentration du champ électrique induite par les plots dans un champ externe uniforme ou encore dans le cas d'un effet de bord (au bord d'une électrode). Tout ceci en tenant compte de l'écrantage, dû à la cellule voisine, dans le calcul du potentiel transmembranaire. Il est important de noter que les comparatifs présentés dans cette partie sont effectués à champ électrique externe constant.

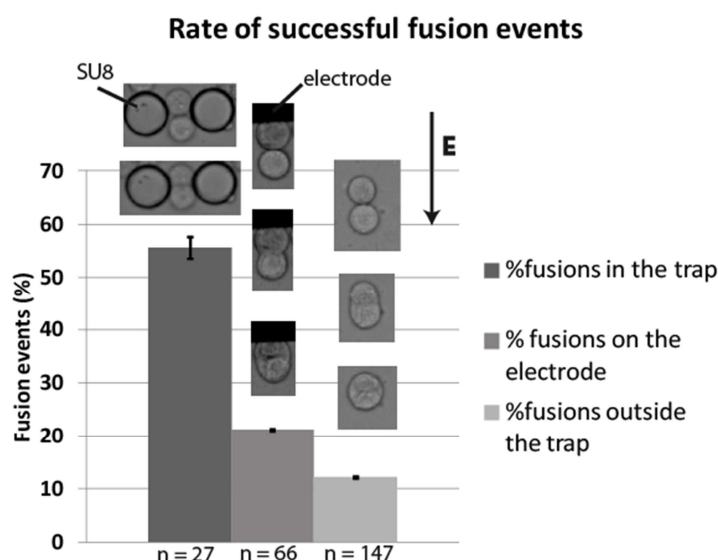


**Figure 4.19 :** Comparatif des cinétiques d'électrofusion dans les 3 zones du motif à plots isolants (A) en dehors du piège ou à champ uniforme, (B) dans la zone de concentration du champ ou dans le piège et (C) sur le bord d'une électrode, ou soumises à un pic de champ (Hamdi et al. 2013a)

Trois zones différentes se détachent :

- La zone de concentration du champ électrique, entre les plots isolants (dans le piège DEP)
- La zone de champ uniforme que nous appellerons « hors du piège »
- La zone où un pic de champ électrique se fait ressentir, au bord d'une électrode

La figure 4.19 montre des cas d'électrofusions dans ces trois zones avec une première idée de la cinétique de fusion. Nous avons constaté que, bien qu'il y ait possibilité de fusion dans les 3 zones durant une même expérience, le rendement de fusions viables était très différent d'une zone à une autre (figure 4.20). En effet, dans le cas de fusions aux bords des électrodes par exemple, grâce à l'intensité du champ électrique dû au pic, de multiples fusions pouvaient avoir lieu. Cependant, l'hybridome finissait très souvent par une lyse, contrairement à la zone de piégeage où les hybridomes étaient préservés dans la majorité des cas. Nous expliquons cela par la concentration du champ électrique principalement au point de contact dans ce dernier cas. Les résultats présentés dans la figure 4.20 ne prennent donc en compte que les hybridomes considérés viables.



**Figure 4.20:** Comparaison du rendement d'électrofusion, à champ électrique externe constant, dans les 3 différentes zones de piégeage dans le cas de plots isolants (Hamdi et al. 2013a)

La figure précédente montre clairement que le rendement de fusion dans le cas d'une constriction du champ électrique au point de contact est bien plus élevé que dans les deux autres cas. Afin d'avoir un regard sur le potentiel transmembranaire dans les différentes zones, le tableau 4.6 récapitule les valeurs calculées à l'aide de la méthode présentée dans la section II.3 du chapitre 2, qui tient compte de l'environnement de la cellule. Ces valeurs sont calculées en considérant le potentiel de repos de -50 mV (Golzio et al. 2002). Les valeurs de  $|V_m|$  sont très proches pour les deux cellules d'une même paire. Seule la valeur maximale est reportée dans le tableau. Dans le cas du contact avec une électrode, les deux cellules sont représentées car le champ électrique dans cette zone est asymétrique. La cellule en contact avec l'électrode est notée 'C1' alors que sa voisine est notée 'C2'.

**Tableau 4.6 :** Tableau récapitulatif du potentiel transmembranaire calculé, rendement de fusion et durée moyenne de fusion dans les trois cas de distribution de champ électrique (conditions expérimentales)

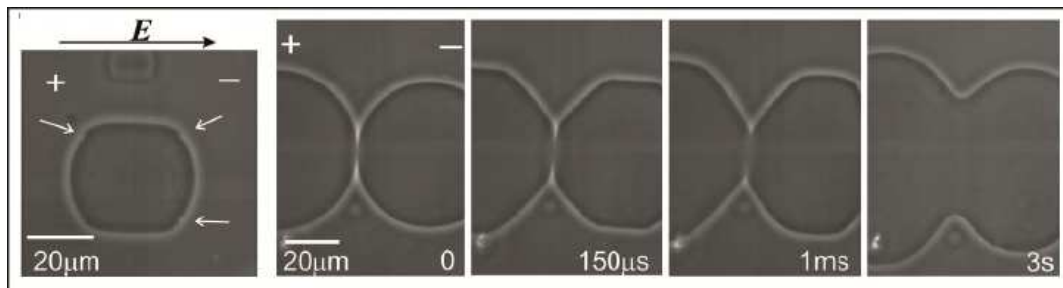
Zone	$ V_m $ pôle de contact (V)	$ V_m $ pôle opposé (V)	% de fusions	Erreur (%)	Durée moyenne de fusion/s	Erreur (s)
Dans le piège (constriction de E)	1,9	1,65	55,55	3,7	5,65	$\pm 0,96$
En dehors du piège (E « uniforme »)	0,9	1,17	12,24	0,7	13,7	$\pm 3$
Au contact d'une électrode (pic de E)	C1 : 0,32 C2 : 1,45	C1 : 1,7 C2 : 0,88	21,21	1,5	8,51	$\pm 1,44$

Comme prévu, le potentiel transmembranaire est plus élevé au point de contact dans la zone de piégeage, contrairement aux deux autres cas de figure. Il est intéressant de noter que le rendement de fusion augmente avec l'augmentation du potentiel transmembranaire au point de contact mais n'est pas proportionnel à l'évolution du potentiel au pôle opposé. En effet, le rendement est plus élevé dans le piège alors que le potentiel max dans ce cas est plus bas qu'au bord de l'électrode (au pôle opposé). Nous pouvons donc conclure que la simple augmentation du champ électrique appliqué n'est pas le seul moyen d'augmenter le rendement de fusion. L'autre méthode est de concentrer ce champ au point de contact. Cette dernière solution est même préférable car la viabilité est préservée. Dans la partie qui suit, nous allons étudier l'impact de la concentration du champ sur un autre paramètre de la fusion : sa dynamique.

b. Dynamique de fusion :

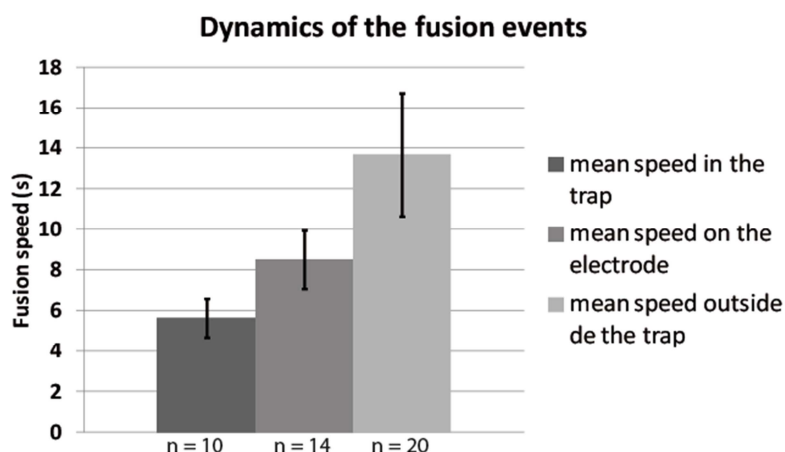
Selon Riske et Dimova (Dimova *et al.* 2007, Riske *et al.* 2006), la fusion se fait en 2 étapes (tout du moins dans le cas des vésicules) : ouverture d'un pore de fusion (fusion neck) avec une vitesse d'expansion moyenne de 2 cm/s, puis l'expansion du col et l'ouverture complète (fusion des deux membranes) avec une vitesse un peu plus lente.

Selon la littérature, la dynamique de fusion des cellules est de l'ordre de plusieurs minutes : 3 min pour Jaeger, moins de 10 min pour Usaj, moins d'une heure pour Teissié *et al.* 1986. Dans le cas des vésicules, il semblerait que le processus soit plus rapide (3 à 10 sec pour l'expansion du point de fusion ou fusion neck pour Halsuka *et al.* 2006) (figure 4.21). En comparaison, les fusions de GUVs induites par une fonctionnalisation de surface étaient bien plus rapides (69 ms).



**Figure 4.21:** GUVs 1 mM NaCl en milieu extérieur, 3 kV/cm,  $t_p = 150 \mu s$ , les flèches indiquent les endroits où la perméabilisation a conduit à une perte de liquide interne (Haluska *et al.* 2006). En absence de sel, la fusion était un peu plus lente (10 s)

Dans le cadre de nos expériences, nous avons pu observer des fusions très rapides, même dans le cas de fusions cellulaires. En effet, la grande majorité des fusions se produisaient en moins de 20 secondes. Cependant, cette dynamique est différente selon la zone de fusion et donc de la distribution du champ électrique externe. La figure 4.22 résume les résultats obtenus dans les 3 zones étudiées.



**Figure 4.22:** Comparaison de la dynamique de fusion dans les 3 zones, à Eexterne constant (Hamdi et *al.* 2013a)

Nous avons pu constater que les fusions les plus rapides sont celles produites dans la zone de piégeage (en moyenne moins de 6 s), alors que les plus lentes restent en dehors de cette zone (en moyenne 14 s). Une première explication possible est que la concentration du champ dans la zone de contact (dans le cas de la zone de piégeage) aide fortement le processus de fusion car la première zone à atteindre le potentiel critique est le point de fusion lui-même.

D'autre part, il est intéressant de noter que dans la majorité des études présentées dans la littérature, lorsque la DEP est utilisée, elle ne l'est qu'avant ou après la fusion et non pendant l'application des impulsions, contrairement à notre protocole. Ainsi, le fait d'appliquer la DEP durant tout le processus de fusion poussant ainsi les cellules l'une contre l'autre a peut-être aidé à accélérer le processus. Enfin, le fait que cette DEP soit plus forte dans la zone de fusion (grâce à la concentration du champ) a peut-être aussi contribué à l'obtention d'une dynamique aussi rapide dans cette zone.

Dans cette partie nous avons démontré que la concentration du champ électrique au point de contact entre les cellules à fusionner pouvait augmenter le rendement de fusions viables et nettement accélérer le processus. En revanche, bien qu'il soit parfois possible d'extraire les cellules du piège à plots isolants grâce à la modification des caractéristiques électriques (figure 4.15), ce motif n'est pas optimal pour la récupération des hybridomes. Il limite aussi fortement la densité de fusions sur puce. Or, nous avons vu dans le premier chapitre que la capacité de production en masse était importante dans le domaine de l'électrofusion dans un but de traitement. Afin de tendre vers une plus grande densité de fusion, nous allons proposer plusieurs stratégies pour la parallélisation de l'électrofusion sur puce.

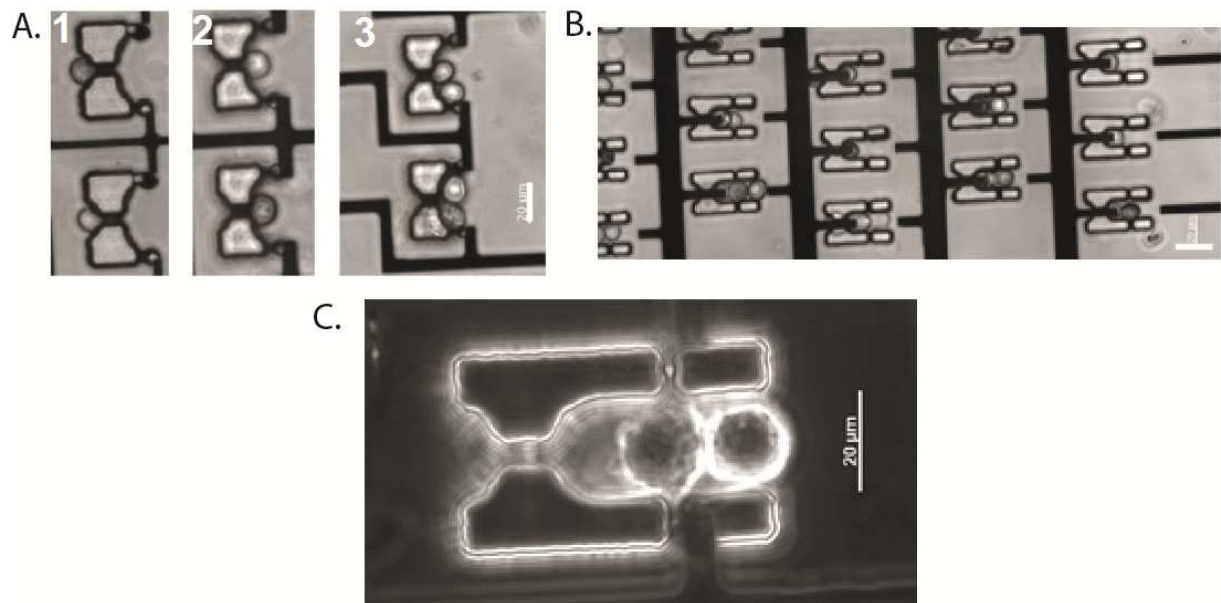
### **IV.3. Structures pour la parallélisation de l'électrofusion sur puce :**

Dans le chapitre 2 nous avons présenté deux structures permettant le piégeage et l'électrofusion haute densité. Cette dernière section présente les résultats des tests biologiques sur ces structures.

#### **IV.3.1. Piégeage de cellules, comparaison des deux structures développées**

##### **a. Piégeage fluidique :**

La première structure proposée s'inspire des travaux de l'équipe de Voldman (Skelley et al. 2009) disposant des pièges fluidiques en parallèle (présentée en section II.2.2). Cette structure ne pouvant fonctionner qu'en circuit packagé, les puces utilisées pour ces expériences ont été scellées grâce au procédé de packaging irréversible SU8/PDMS développé dans le chapitre 3. Des cellules dendritiques DC3F ont été suspendues dans un milieu isotonique et le procédé de piégeage en 3 étapes leur a été appliqué lors de l'injection à l'aide d'un pousse-seringue. La figure 4.23 présente les résultats de ce piégeage.



**Figure 4.23 :** Images de piégeage de cellules DC3F dans un milieu isotonique dans les pièges fluidiques. A. Succession des 3 étapes amenant au piégeage fluidique dans la structure en largeur (cellules côte à côte). B. Piégeage dans les pièges fluidiques en longueur. C. Application d'impulsions sur une paire cellulaire (barre d'échelle 20 µm) (Hamdi et al. 2011a)

Il a été possible d'obtenir des matrices de cellules piégées par paires. Cependant, les cellules étant suspendues dans un milieu isotonique, nous n'avons pu observer de fusions cellulaires, seule l'électroporation était visible lorsque de très fortes tensions (1500 V) étaient

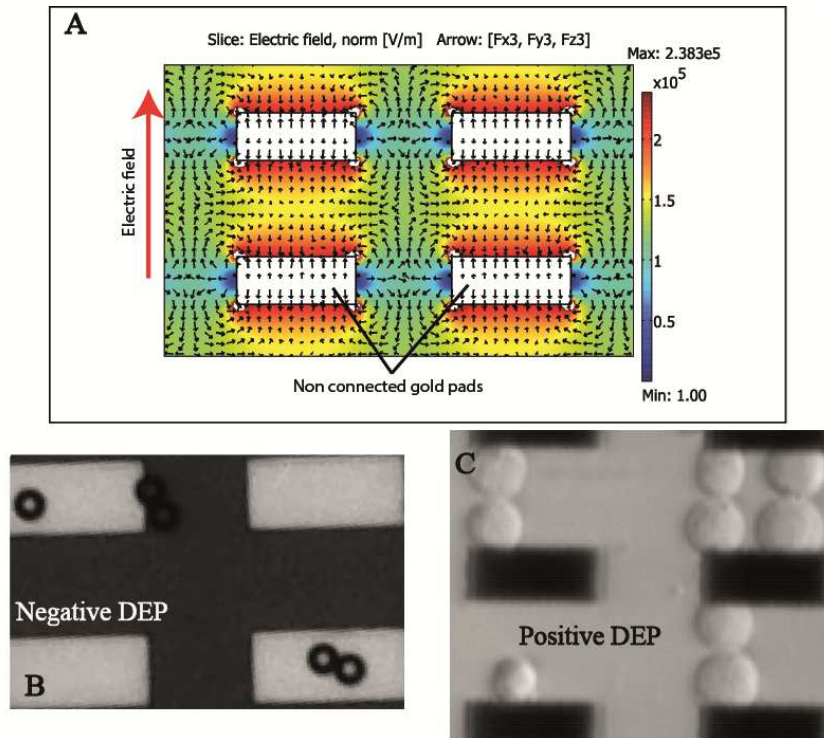
appliquées. Ce premier dispositif n'était en effet pas adapté en impédance avec le générateur. Le système d'électrodes, alimentant des centaines de motifs en parallèle, était trop peu impédant, réduisant fortement la tension appliquée. Ce défaut de conception fut corrigé dans une seconde version.

Nous avons donc modifié la structure en éloignant les électrodes. De plus, nous avons utilisé le milieu hypotonique identifié comme optimal. Ces modifications nous ont permis de voir la réaction des cellules augmenter à des tensions appliquées bien plus basses. Cependant, à cause du gonflement des cellules, elles étaient beaucoup plus flexibles, passant plus facilement dans les microcanaux prévus pour ne laisser passer que le liquide, compromettant ainsi le procédé de chargement en 3 temps. Les cellules étaient aussi souvent très stressées à cause de la force hydrodynamique. Il était donc très difficile d'obtenir du piégeage matriciel de paires cellulaires dans ces conditions. De plus, dans le cas où les cellules étaient dans le piège, il était très difficile de les en déloger confirmant que cette structure n'était peut-être pas optimale pour la récupération des hybridomes.

*b. Piégeage électrique (DEP):*

La seconde structure proposée utilise la seule force de DEP pour le piégeage et l'appariement des cellules. A l'aide de plots conducteurs non connectés, la cartographie du champ électrique est modifiée (Chapitre 2) créant des zones de maximum de champ entre les plots dans la direction du champ (zone de piégeage) où les cellules sont soumises à de la DEP positive. Ces endroits correspondent aussi aux zones d'électrofusion, exploitant doublement l'augmentation du champ électrique. Les zones de DEP négative sont dans des « couloirs » et au-dessus des plots eux-mêmes (figure 4.24).



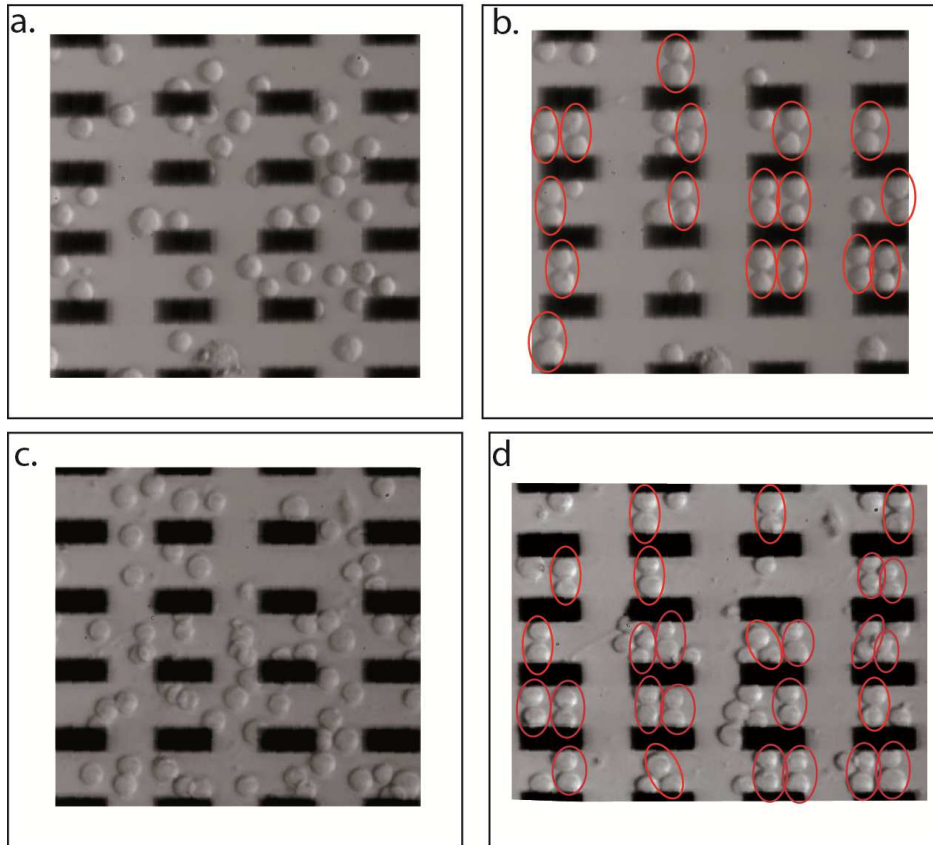


**Figure 4.24 :** A. Simulation numérique de la cartographie du champ électrique obtenue grâce à la présence de plots conducteurs non connectés. B. Résultat de piégeage en nDEP (billes de polystyrène) et C. en pDEP (de cellules B16F10) (Hamdi et *al.* 2013b)

En fonction de l'intensité du potentiel appliqué, les cellules se placent très rapidement dans les pièges (moins de 2 s en appliquant moins de 0,25 kV/cm). Afin d'évaluer la force de DEP effective sur les cellules, nous avons utilisé un dispositif packagé au PDMS associé à l'appareil de contrôle de pression Fluidigent. Nous avons ensuite appliqué une force de pDEP sur les cellules et augmenté progressivement la pression jusqu'à détection de la force limite au-delà de laquelle les cellules sont emportées par le flux. Cette force critique  $F_c$  correspond à l'équilibre où :

$$F_{\text{DEP}} = F_c = \gamma \times v_c \quad (4.2)$$

avec  $\gamma = 6\pi\eta R_{\text{Cell}}$  est le facteur de friction de la cellule de rayon  $R_{\text{Cell}}$  (10  $\mu\text{m}$  dans notre cas) dans le milieu de viscosité  $\eta$  ( $10^{-3}$  Pa.s pour l'eau). D'après nos expériences, la force de DEP correspondante vaut environ 10 pN (équivalente à une vitesse  $v_c \sim 50 \mu\text{m/s}$ ). Par ailleurs, d'après les simulations numériques, la force de DEP au centre du piège est de 14,5 pN (pour une particule de 10  $\mu\text{m}$  de rayon, un  $K_{\text{CM}} = 0,4$  et une tension de 20 Vpp). Ainsi, les résultats des simulations, très proches des résultats expérimentaux, montrent que la force de DEP est assez forte pour piéger très rapidement les cellules. De plus, nous confirmons par ces calculs que les cellules dans la structure sont bien soumises au champ électrique attendu.



**Figure 4.25 :** Cellules B16F10 avant (a,c) et pendant (b,d) l'application d'une DEP positive (milieu hypotonique, 400 kHz) dans le cas de faibles (haut) et fortes (bas) densités cellulaires. Barre d'échelle = 20  $\mu\text{m}$  (Hamdi et *al.* 2013c)

Nous venons de montrer que le piégeage des cellules dans la structure à plots conducteurs est efficace. Mais qu'en est-il de l'appariement ?

De manière à obtenir un appariement entre deux cellules uniquement, le gap entre les plots est fixé de manière à n'avoir la place que pour deux cellules dans la direction du champ (ici 40  $\mu\text{m}$ ). Les cellules s'alignent dans la direction du champ, même dans le cas de la présence de plus de deux cellules dans un même piège, elles ne s'aligneront que par paires. La figure 4.25 montre le résultat de l'appariement de cellules dans le cas de densités cellulaires différentes. Les figures 4.25.c et b confirment qu'en majorité, les cellules se mettent par paires dans la direction du champ.

Cette structure à plots conducteurs est donc très efficace pour le piégeage et l'appariement de cellules. L'avantage principal de cette structure en comparaison avec la précédente, est sa flexibilité. En effet, grâce au procédé on/off, permis par la DEP sans piégeage mécanique, le simple arrêt du signal électrique permet la libération des cellules. Cet avantage est très important dans le cadre de l'électrofusion car il facilite la récupération des hybridomes.

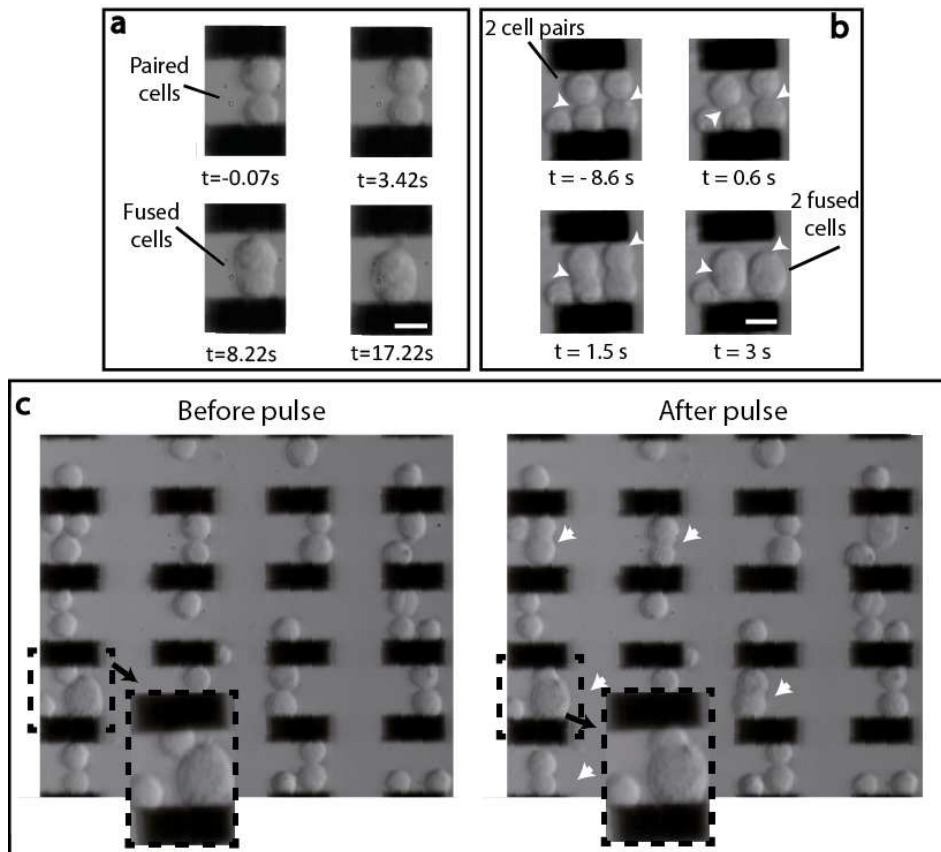
D'autre part, la structure à plots conducteurs est plus simple à mettre en œuvre et le processus de piégeage très simple et rapide comparé au procédé de piégeage fluïdique en 3 temps.

Maintenant que les cellules sont piégées et appariées, place aux fusions ! La dernière partie s'attache à l'étude de l'électrofusion dans la dernière structure présentée.

#### **IV.3.2. Electrofusions en parallèle (B16F10, Jurkat)**

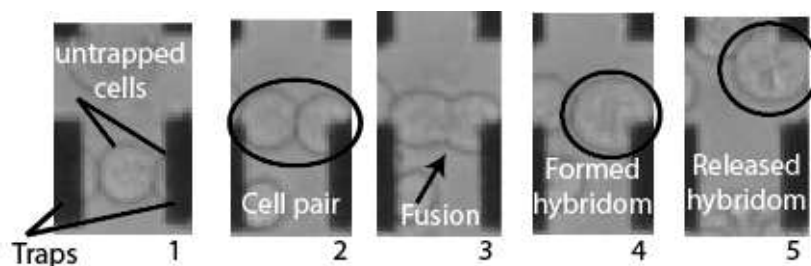
Après l'appariement des cellules par pDEP, un train de 10 impulsions à 1 Hz (d'une durée de 100  $\mu$ s et de 1,3-1,4 kV/cm) est superposé au signal de DEP afin d'initier l'électrofusion. Grâce à l'augmentation du champ électrique dans les pièges, le potentiel transmembranaire au point de contact est plus élevé dans cette zone comparativement au cas sans plots. Ainsi, les fusions seront plus probables dans les pièges qu'en dehors (pour  $U = 50$  V,  $\Delta\Psi_{\text{contact}} = 1,6$  V dans le piège et 1,3 V en dehors). La figure 4.26 présente la dynamique de fusion de cellules B16F10 dans la structure à plots conducteurs. Dans ces conditions, et en répétant l'expérience plus d'une vingtaine de fois, nous avons obtenu jusqu'à 75 % de fusions simultanées (en moins d'une minute). Un second train d'impulsions a pu augmenter le rendement dans certains cas. Ceci peut-être dû au réarrangement des cellules dans l'alignement du champ grâce à la première salve, permettant un meilleur effet de la seconde salve.

Nous avons aussi constaté qu'avec deux (figure 4.26.a) ou plusieurs (5 cellules sur la figure 4.26.b) cellules capturées, il n'y a quasiment que des fusions bi-nucléaires produites. En effet, 97% des fusions observées ne contiennent que 2 noyaux (en se basant sur 91 événements). Le faible taux de fusions polynucléaires est dû à l'encombrement dans la zone de piégeage. Cette dernière ne pouvant accueillir que deux cellules dans la direction du champ électrique, en plus du fait que les cellules s'alignent dans cette même direction grâce à la DEP, cela conduit à un bon appariement. Enfin, le potentiel transmembranaire étant maximal aux zéniths ( $\theta = 0^\circ$  et  $\theta = 180^\circ$ ), les cellules se perméabilisent à ces endroits et fusionnent le plus souvent avec la cellule en face, et rarement avec la voisine de côté. Nous avons même pu observer des fusions de cellules de tailles très différentes (figure 4.26.c).



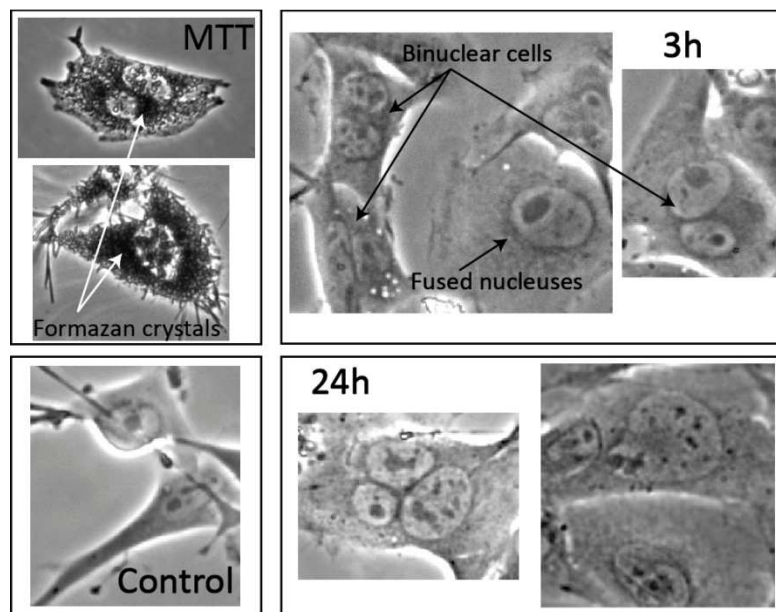
**Figure 4.26 :** Dynamique de fusion dans une structure à plots conducteurs de (a) une paire, (b) deux fusions simultanées sur un même pad (c) fusions en parallèle (indiquées par les flèches blanches) avec un zoom sur la fusion d'une paire de cellules B16F10 de tailles très différentes (barre d'échelle = 20  $\mu\text{m}$ ) (Hamdi *et al.* 2013c)

Quant à la dynamique de fusion, elle est d'en moyenne 9 secondes (basée sur 83 évènements). En outre, plus de 85% des fusions se produisent en moins de 12 s. Cette vitesse de fusion est en accord avec les résultats trouvés dans la section IV.2.2.b (tableau 4.7) pour des fusions au bord de l'électrode. La différence étant que les plots n'étant pas directement connectés dans le cas présent diminue peut-être l'effet de bord entraînant moins de pertes cellulaires au moment du pulse. En appliquant les mêmes paramètres sur des cellules Jurkat (avec des salves de 3 à 5 pulses au lieu de 10), la même dynamique a pu être observée (moins de 12 s en moyenne). Après formation de l'hybridome, le signal de DEP est arrêté et les cellules relâchées pour être collectées pour d'autres caractérisations (figure 4.27).



**Figure 4.27 :** Capture et électrofusion d'une paire de cellules B16F10 puis relargage de l'hybridome formé

Afin de valider la structure développée, il est important de s'assurer de la viabilité des cellules après l'application des impulsions électriques. Le test de viabilité le plus couramment utilisé est le test d'exclusion de bleu de trypan. Cependant, dans le cas de l'électroperméabilisation, ce test est exclu car, du fait de l'état perméabilisé de la cellule, le bleu entre dans toutes les cellules sans exception, faussant ainsi le test. Il a donc fallu trouver un autre moyen pour l'évaluation de l'effet des impulsions sur la viabilité des cellules.



**Figure 4.28 :** Tests préliminaires de culture après électrofusion sur puce, culture après 3h et 24h et test de viabilité au MTT sur cellules fusionnées et adhérentes. Images en contraste de phase avec magnification x40.

1) Nous avons tout d'abord vérifié visuellement les changements d'aspect de la membrane après application des impulsions. Si une modification considérable est notée, la cellule est considérée non viable. Comme indiqué précédemment, l'augmentation de l'amplitude des impulsions entraîne une augmentation du nombre de fusions ainsi qu'une diminution de viabilité. Nous avons alors graduellement augmenté l'amplitude afin de déterminer la gamme de champ où les paires fusionnent sans causer de lyse cellulaire. Nous avons donc fixé un champ de 1,1-1,25 kV/cm dans le piège pour les expériences d'électrofusion. Dans cet intervalle, nous avons compté 3% d'hybridomes non viables (sur 91 évènements) et 8% de cellules considérées non viables (sur 1043 cellules piégées).

2) Le second test de viabilité consiste à collecter les hybridomes électrofusionnés puis les mettre en culture dans du milieu complet (dans le cas de B16F10 : DMEM, 1% antibiotiques et 10% de sérum fœtal de veau). Au bout de 3h, les hybridomes avaient déjà

adhéré, confirmant leur viabilité (figure 4.28). Les cellules fusionnées contenaient deux noyaux distincts ou un gros noyau (probablement le résultat d'une fusion nucléaire). Au bout de 24h, les cellules continuaient à proliférer. Certains hybridomes étaient d'une taille anormalement grande avec de gros noyaux (prolifération sans division) ou polynucléaires indiquant une division.

3) Enfin, afin de confirmer l'activité cellulaire des hybridomes, nous avons ajouté un marqueur tétrazolium (utilisé en test MTT) aux cellules proliférant 24h après l'électrofusion. Cette molécule étant réduite en cristaux de formazan dans les mitochondries des cellules vivantes, ces dernières apparaissent violettes. Ces cristaux se sont bien formés dans les hybridomes, confirmant leur activité métabolique (figure 4.28).

#### **IV.4. Conclusion**

En première partie de ce chapitre, nous avons étudié les différents paramètres importants à prendre en considération lors de l'élaboration d'un milieu de fusion. Nous avons ensuite étudié l'impact de ces différents paramètres sur les cellules, en particulier l'augmentation de taille, la viabilité et le changement de comportement diélectrophorétique. Nous avons ensuite abordé l'effet d'un champ électrique sur la déformation des cellules, que ce soit en AC (signal de DEP) ou en DC (impulsions d'électroperméabilisation/électrofusion).

En seconde partie, la structure de piégeage à plots isolants a été exploitée afin d'étudier l'effet de la concentration du champ électrique sur le rendement et la dynamique d'électrofusion. Cette partie montre que la structure à plots isolants, bien qu'elle soit peu pratique pour la parallélisation sur puce, est quand même très intéressante pour l'étude du phénomène de fusion.

Enfin, dans la dernière partie de ce chapitre, les deux structures de parallélisation du piégeage cellulaire (pièges fluidiques et pièges électriques) ont été testées et comparées. Le fait que la dernière structure présente plus d'avantages que le piégeage fluidique (simplicité de mise en œuvre, récupération des hybridomes et efficacité), cela nous a poussés à exploiter d'avantage cette structure. Les résultats d'électrofusions binucléaires parallèles nous permettent d'envisager l'emploi de plots conducteurs non connectés pour l'électrofusion/électroporation très haute densité sur puce.



## **Conclusions et perspectives**



### Conclusions :

L'étude présentée dans ce manuscrit avait pour vocation de montrer la pertinence de l'utilisation des microtechnologies dans le domaine de la fusion cellulaire. Le premier objectif a consisté à développer une structure d'appariement de cellules en vue de leur fusion. D'autre part, le nombre d'hybridomes étant un paramètre important pour les applications de la fusion cellulaire, le second objectif de cette thèse était de concevoir et de réaliser une structure novatrice pour la parallélisation de la fusion cellulaire sur puce.

A ces fins, nous avons tout d'abord étudié les différentes techniques de fusion ; il nous est apparu que, bien que les mécanismes mis en jeu ne soient pas encore cernés avec certitude, l'*électrofusion* était la voie la plus prometteuse. Les microtechnologies permettant de concevoir des micro-dispositifs dédiés et de contrôler la topologie du champ électrique, elles présentent un fort potentiel dans ce domaine. Afin de replacer notre travail dans le contexte actuel du développement de biopuces pour l'électrofusion, une étude bibliographique a été proposée.

Dans le chapitre II, nous avons effectué une analyse comparative des différentes forces exercées sur la cellule durant l'application d'un champ électrique. L'évaluation analytique puis numérique des déplacements induits a confirmé que pour une cellule plongée dans un milieu faiblement conducteur, la diélectrophorèse était la force dominante, en considérant nos conditions expérimentales de fréquence et d'intensité du champ électrique. Dans un second temps, nous avons optimisé, à l'aide de simulations par éléments finis, les dimensions des structures. La première architecture se base sur la déformation des lignes de champ électrique à l'aide de plots isolants créant ainsi une force de diélectrophorèse. Dans cette structure, le champ électrique est amplifié dans la zone de piégeage ; entre les plots. A l'aide de simulations numériques, nous avons analysé l'évolution du potentiel transmembranaire de paires cellulaires dans cette structure d'électrofusion. Grâce à cela, nous avons pu constater que la concentration du champ électrique au point de contact pouvait améliorer le rendement de fusion. Néanmoins, ce type de dispositif n'étant pas adapté à l'électrofusion parallélisée à grande échelle, nous avons en parallèle développé deux autres architectures. La première se base sur un piégeage fluide, et la seconde sur un piégeage électrique à l'aide de plots conducteurs. La présence des plots non connectés dans la dernière structure permet de s'affranchir de l'adressage électrique des électrodes.

En utilisant un protocole de fabrication simple et reproductible, commun aux différentes biopuces présentées, nous avons pu réaliser différents dispositifs pour l'électrofusion cellulaire. Afin d'être en mesure de mettre sous flux les dispositifs, nous avons

développé puis caractérisé une méthode de scellement, biocompatible et reproductible, du PDMS sur les canaux en SU8 par silanisation. Cette technique a par la suite été appliquée dans le cadre de plusieurs autres projets dans les laboratoires respectifs liés à ces travaux de thèse. Ayant observé des difficultés de rinçage sur certaines structures complexes, nous avons en parallèle commencé à développer et caractériser deux types de scellement réversible.

Afin de valider les différentes structures, il était nécessaire d'évaluer la capacité à produire des hybridomes par électrofusion sur nos biopuces. Pour cela, nous avons commencé par étudier l'effet de certaines caractéristiques du milieu sur les cellules afin d'optimiser ce dernier. L'osmolarité du milieu s'est alors révélée d'une importance capitale car elle peut influencer la viabilité des cellules, leurs caractéristiques électriques, leur électrodéformation et le rendement de fusion.

Nous avons ensuite exploité la structure de piégeage à plots isolants afin d'étudier l'effet des impulsions électriques sur les caractéristiques électriques. Ces expériences, confrontées aux calculs numériques, ont permis de démontrer qu'un champ électrique pulsé augmentait la conductivité cytoplasmique. En exploitant la même structure de piégeage, nous avons pu étudier l'effet de la concentration du champ électrique sur la fusion cellulaire. Ainsi, nous avons prouvé que, comme le laissaient penser les simulations numériques, la concentration du champ au point de contact favorisait la fusion et produisait un meilleur rendement d'hybridomes viables. Par ailleurs, nous avons observé que dans cette configuration, le temps de fusion membranaire pouvait être divisé par 2.

Enfin, nous avons confronté les deux structures de parallélisation. La structure à plots conducteurs s'est révélée plus efficace que la structure fluide, tant au niveau du piégeage que du point de vue de l'électrofusion. Nous avons pu atteindre un rendement de fusion de 75% entre les plots conducteurs, dont plus de 97% de fusions binucléaires. Nous pensons que cette structure est très prometteuse pour l'électrofusion sur puce hautement parallélisée.

Ainsi, trois principaux objectifs ont été atteints au terme de ces travaux de thèse :

- Le développement d'une méthode de packaging PDMS-SU8 reproductible et biocompatible,
- La réalisation et la comparaison des performances entre plusieurs microdispositifs (à plots isolants ou à plots conducteurs) pour l'électrofusion cellulaire,
- La conception et la réalisation d'un microdispositif pour l'appariement et l'électrofusion parallélisée de cellules sur puce, tout en s'affranchissant de l'adressage électrique.

### Perspectives :

Nous avons montré que les biopuces développées pouvaient constituer un outil d'étude de cellules biologiques (dynamique et rendement de fusion, évolution des paramètres électriques). Ainsi, de multiples axes de recherche peuvent être développés dans le prolongement de ces travaux de thèse, et ce dans différents domaines :

- Développements technologiques :
  - Afin de réduire l'effet de sur-gravure des électrodes en or, les masques des dispositifs doivent être améliorés en ajoutant des motifs leurres. Une autre voie concernerait la mise au point du micromoulage d'or.
  - Par ailleurs, le développement des procédés de collage réversible par PDMS et par DMPMS sont poursuivis. Les résultats très prometteurs obtenus avec le DMPMS sont particulièrement intéressants. L'optimisation et la caractérisation complète du procédé pouvant demander beaucoup de temps, nous envisageons aussi une troisième voie : le scellement par aspiration. Cette dernière méthode n'abîmant pas la surface des canaux, elle permettrait de réutiliser un grand nombre de fois les biopuces.
  
- Aspects biologiques :
  - La validation des dispositifs concernant l'électrofusion a été effectuée sur des échantillons homogènes (un seul type cellulaire). L'étape suivante consisterait bien sûr à utiliser des échantillons hétérogènes. Il est à noter que les cellules de lignées différentes présentent des caractéristiques électriques et biologiques différentes. La détermination des paramètres de piégeage et d'électrofusion de paires hétérogènes peut donc s'avérer difficile et nécessite une étude en soi. Les biopuces présentées peuvent aussi être utilisées pour cette étude en temps réel.
  
- Evolution des systèmes:
  - Le dispositif à électrodes non connectées a prouvé son efficacité quant aux fusions binucléaires. Néanmoins, dans le cadre de fusions hétérogènes, il est possible d'améliorer la structure par un système de *pré-placement* en amont de la structure,
  - Beaucoup de questions restent ouvertes concernant le développement et la prolifération des cellules post-électrofusion. Pour la collecte des cellules (hybridomes) après l'expérience, l'interface doit être améliorée pour intégrer un changement rapide de milieu afin de limiter le stress dû à la suspension en environnement hypotonique.



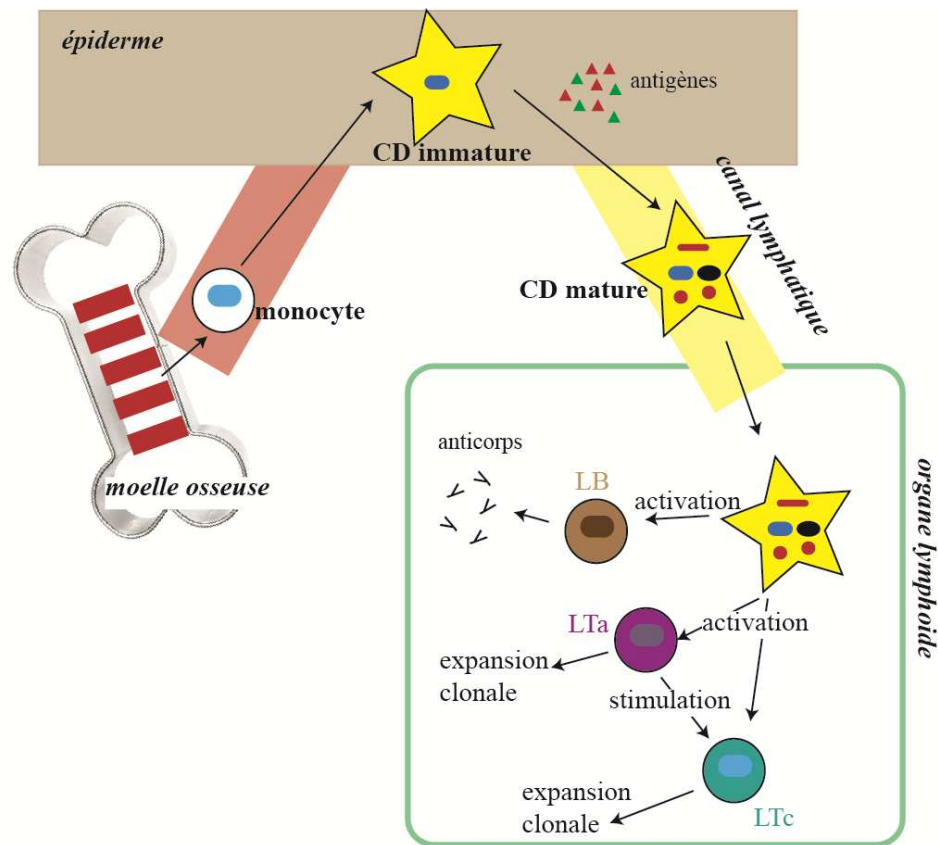
### Le système immunitaire :

Le système immunitaire est la machinerie qui protège notre corps des agressions endogènes et exogènes. Néanmoins, nous allons dans cette partie en donner une vue, certes très simplifiée, mais globale (figure A1.1).

L'immunité est basée sur le principe de reconnaissance du *soi* (ce qui vient de notre propre corps) et du *non-soi*. Pour cela, toute cellule présente des molécules à la surface externe de sa membrane afin de permettre cette reconnaissance par le système immunitaire. Ces molécules (antigènes) sont présentées via un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les sentinelles pouvant détecter puis présenter ces antigènes au reste de la machinerie sont appelées «cellules présentatrices d'antigènes ». Les cellules les plus efficaces ayant cette fonction sont les cellules dendritiques (CD).

Dans la moelle osseuse, à partir de cellules souches, plusieurs types cellulaires sont produits dont les monocytes et certains autres précurseurs de CD. Ces cellules migrent ensuite à travers les vaisseaux sanguins vers les tissus et deviennent des cellules dendritiques immatures. Ces cellules parcourent constamment notre organisme à la recherche d'antigènes du *non-soi*.

A travers divers signaux, ces CD immatures sont recrutées au niveau du site inflammatoire (inflammation causée, par exemple, par un agent pathogène). Elles capturent alors les antigènes présents puis les traitent/analysent. Dans le cas où un danger est détecté (antigène du *non-soi* ou du *soi modifié*), la CD s'active et se différencie en CD mature pouvant présenter les antigènes aux autres cellules immunitaires et sécréter des molécules de stimulation. Les CD matures migrent de nouveau, mais cette fois-ci vers l'organe lymphoïde le plus proche stockant les lymphocytes B (B pour *Bone marrow* ou moelle osseuse, lieu de leur production et maturation) et lymphocytes T (maturant dans le Thymus). Ces lymphocytes matures mais naïfs (non activés) vont alors être activés par les signaux émis par les cellules dendritiques matures qui leur présentent les antigènes concernés afin de reconnaître la menace à combattre.



**Figure A1.1:** Schéma simplifié représentant le système immunitaire et son action

Une fois les antigènes présentés aux lymphocytes B, la production d'anticorps (ou immunoglobulines) spécifiques d'antigène est lancée. Ces anticorps se fixent de façon spécifique aux antigènes extracellulaires comme les fragments de microbes, toxines, etc. Ils vont alors inhiber leur toxicité et permettre le recrutement de cellules phagocytaires qui élimineront cet objet.

Dans le cas d'une infection à germes intracellulaires (échappant aux anticorps), ce sont les lymphocytes T qui se révèlent plus efficaces. Les CD matures activent (entre autres) deux types de lymphocytes T : les T cytotoxiques ( $CD8^+$ ) et les T auxiliaires ( $CD4^+$ ). Les T cytotoxiques (LTc), comme leur nom l'indique, peuvent agir directement sur les cellules (efficaces même sur des infections à germes intracellulaires). Quant aux T auxiliaires (LTa), ils jouent un rôle de coordination de la réponse immune, qu'elle soit à médiation cellulaire via les LTc ou à médiation humorale par le biais des LB.

Une fois activés par les cellules présentatrices d'antigènes, les LTa spécifiques secrètent des cytokines qui leur permettent, d'une part de s'auto stimuler et, d'autre part, de stimuler les LTc pré-activés par les cellules dendritiques. Les deux types de lymphocytes T prolifèrent donc avant de migrer vers le site inflammatoire. Les LTc reconnaissent la cellule infectée puis

secrètent des enzymes qui perforent et détruisent sa membrane. De leur côté, les LTa recrutent des macrophages pour digérer les résidus.

Bien que ce système soit très efficace, il n'est pas infallible. En effet, les microbes, virus et autres organismes nuisibles peuvent modifier leur structure (antigènes).

### **Comment les cellules peuvent échapper au système immunitaire:**

Nous venons de voir comment une grande partie des virus, bactéries et cellules du *soi* porteuses de mutations génétiques, se voit éliminée grâce au système immunitaire (figure A1.1). Néanmoins, certains types d'invasions échappent à la vigilance de cette machinerie. C'est le cas des cellules cancéreuses. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que chaque année, le cancer fait environ 15 Millions de morts dans le monde, dont 150.000 en France. Il est possible de dire que les tumeurs dérivent d'une anomalie génétique (innée, acquise ou aggravée par certains facteurs). La mutation d'un ou de plusieurs gènes d'une cellule originellement saine du corps va modifier ou inhiber certaines de ses fonctions cellulaires la rendant cancéreuse. Elle va alors proliférer anarchiquement et contaminer les cellules environnantes induisant un cancer. Les principales particularités des cellules cancéreuses sont :

- Immortalité car elles réussissent à « déprogrammer » le système d'apoptose (mort programmée) présent en chaque cellule
- Recrutement de vaisseaux sanguins pour irriguer la tumeur en développement. Cette néo-vascularisation permet aux cellules tumorales de migrer vers les autres organes (métastases) et au cancer de se généraliser.
- A noter que le classement des cancers est rendu difficile du fait du nombre élevé de mutations génétiques possibles.
- Faisant à la base partie du *soi*, leurs antigènes sont très proches des antigènes normaux, les rendant difficiles à détecter
- Furtives, elles vont développer plusieurs techniques pour leurrer le système immunitaire comme la diminution drastique de la production d'antigènes. D'autre part, elles secrètent plusieurs molécules afin de recruter des macrophages et certains lymphocytes immunorégulateurs freinant la réponse immunitaire anticancéreuse.

Ainsi, d'un point de vue immunologique, les cellules cancéreuses développent des techniques de camouflage afin d'échapper au système immunitaire. Elles expriment peu ou pas d'antigènes ou de CMH à leur surface. D'autre part, la majorité des antigènes cancéreux sont associés au *soi* et donc peu immunogènes. Enfin, les cellules cancéreuses s'attaquent directement au système immunitaire en recrutant ses acteurs (macrophages, LT régulateurs) en sécrétant des immunosuppresseurs. C'est ainsi que la tolérance immunitaire s'installe.

Pourtant il a été prouvé que le système immunitaire pouvait se réactiver et combattre la tumeur. La première observation dans ce sens a été faite par le père de l'immunothérapie anti-cancéreuse, le Dr William Coley, vers la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Il avait en effet remarqué que dans plusieurs cas de cancers, les patients pouvaient voir leur tumeur rétrécir à chaque poussée de fièvre suite à une infection bactérienne exogène. Il a alors entrepris plusieurs essais cliniques où il infectait des patients par des bactéries. Les patients qui survivaient à l'infection, répondaient favorablement au traitement par une diminution de la tumeur. Bien qu'on ne le sache pas avec certitude à ce moment-là, c'était la première preuve que s'il était débloqué (par l'infection bactérienne en l'occurrence) le système immunitaire arrivait à combattre le cancer.



### « Vaccins » anti-tumoraux :

Durant le 20<sup>ème</sup> siècle, les tumeurs ont essentiellement été traitées par chirurgie, radiothérapie ou chimiothérapie, voire une combinaison des trois. Efficaces, ces thérapies s'accompagnent néanmoins d'effets secondaires très lourds. Bien que la théorie de Coley ne fût pas totalement oubliée, les vaccins anticancéreux sur le principe du réveil du système immunitaire, ne voient le jour que vers la fin des années 80 avec le lancement d'un essai clinique. Des lymphocytes infiltrant les tumeurs (LIT) et pouvant les combattre avaient été observés. L'idée était de les prélever, les amplifier puis les réinjecter en grande quantité chez les patients. L'essai n'a pu être lancé que lorsque la molécule pouvant pousser les LIT à se multiplier (l'IL2 pour *Interleukine 2*) a été découverte. Les premiers essais sont très encourageants (régression de la tumeur chez 50% des patients). Néanmoins, les LIT sont rares ou inexistantes chez la majorité des patients. C'est pour cela que des recherches sont en cours dans le but de transformer des lymphocytes T classiques en LIT.

Certains chercheurs se sont intéressés, quant à eux, aux cellules dendritiques. Dans le cas des cancers, les CD ne voient malheureusement pas le danger et ne passent donc pas à l'état mature (présentateur d'antigènes). L'idée des vaccins anti-tumoraux à base de CD est de contourner le problème d'immaturité en chargeant directement les CD avec l'antigène tumoral. Ces dernières passent alors à l'état mature et peuvent déclencher la réponse immunitaire en activant les lymphocytes. Le chargement des antigènes tumoraux peut se faire *in vivo* par injection en utilisant des protéines bactériennes ou des adénovirus comme vecteurs. Cette voie reste quand même très limitée à cause de l'état de fatigue des CD. Un moyen de s'affranchir des contraintes du corps humain est de charger les CD avec les antigènes *ex vivo (in vitro)*, ce qui ouvre la voie à plus de techniques de chargement. Après l'activation, la CD mature est réinjectée au patient (en général près ou dans un organe lymphoïde secondaire comme les ganglions) pour induire une réponse immunitaire lymphocytaire antitumorale.

Pour ce genre de traitement, il faudrait pouvoir récupérer des CD immatures (iCDs) chez les patients, principalement localisées dans les tissus (ce qui rend leur extraction difficile). A noter également que leur quantité dans le sang est trop faible pour envisager cette source

d'iCDs (< 0,5% des cellules mononucléaires circulantes). Fort heureusement, une majorité de cellules dendritiques immatures dotées des caractéristiques fonctionnelles essentielles (phagocytose, présentation d'antigènes, etc) peuvent être produites *in vitro* à partir de monocytes (Bohnenkamp and Noll, 2003).

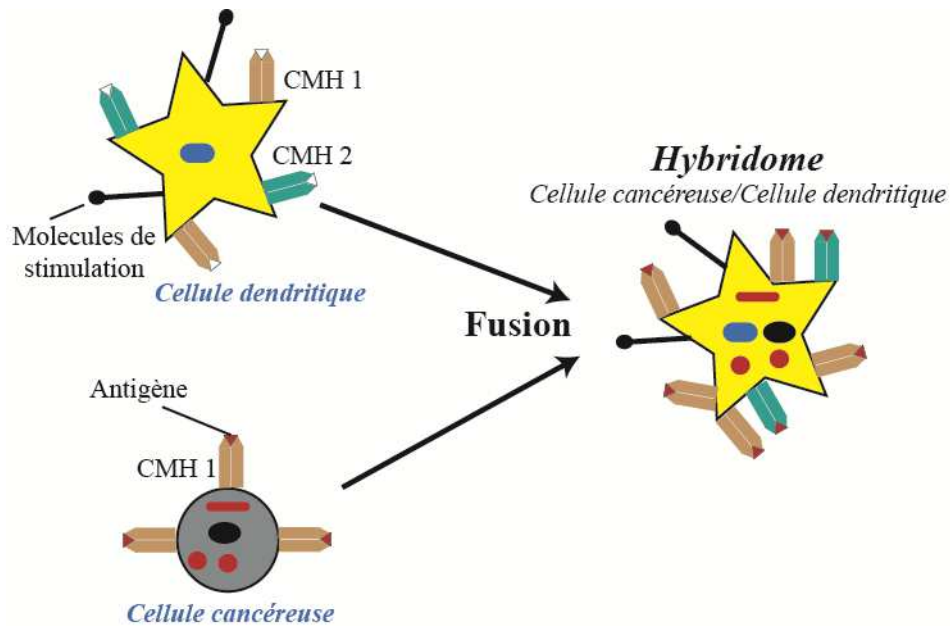
Différentes techniques de chargement *in vitro* des antigènes tumoraux sont investiguées comme la mise en contact d'iCD électroporées avec des peptides, des protéines, des cellules cancéreuses apoptotiques ou lysées, la transfection d'ARNm, l'utilisation de vecteurs viraux ou encore la fusion complète de cellules cancéreuses et CD. Toutes ces techniques nécessitent des recherches plus approfondies pour régler certains freins technologiques et biologiques. Bien que l'efficacité de ces méthodes n'ait pas été directement comparée, des études comparatives d'une partie d'entre elles semblent prouver que le chargement par fusion cellulaire (par voie chimique ou électrique) est une des voies les plus intéressantes. En effet Galea-Lauri et *al.* (2002), Goddard et *al.* (2003), Trevor et *al.* (2004) et Kao et *al.* (2005) ont tous vu que des vaccins obtenus par fusions induisent une meilleure réponse immunitaire.

### **Fusion et vaccination anticancéreuse :**

Le chargement par fusion présente deux potentiels avantages importants par rapport aux autres vaccins à CD :

- Les hybridomes sont supposés garder la fonction dendritique de présentation d'antigènes. Ainsi, contrairement aux techniques de chargement exogène (greffage/adsorption), l'expression de l'antigène, dans les approches *cellule tumorale entière* (fusion, transfection ADN/ARN), se fait de façon endogène par l'hybridome. Cette expression naturelle des antigènes est probablement plus efficace et plus stable. De plus, les antigènes présentés de façon endogène vont l'être sur les deux classes de CMH : molécules de classe 1 (présentées aux lymphocytes T cytotoxiques) et de classe 2 (présentées aux lymphocytes T auxiliaires). Ainsi les deux types de lymphocytes T peuvent être activés rendant la réponse immunitaire plus efficace (Parkhurst et *al.* 2003).

- L'applicabilité de la méthode ne dépend pas d'un antigène spécifique. En effet, la majorité des autres méthodes sélectionnent et se concentrent sur un seul antigène (y compris pour les autres approches *cellule tumorale entière*). Or, une cellule cancéreuse en contient une variété, incluant des antigènes non identifiés ou spécifiques à chaque patient. La fusion permet d'intégrer tout le répertoire antigénique de la cellule cancéreuse (figure A2.1) élargissant considérablement l'applicabilité de la technique.



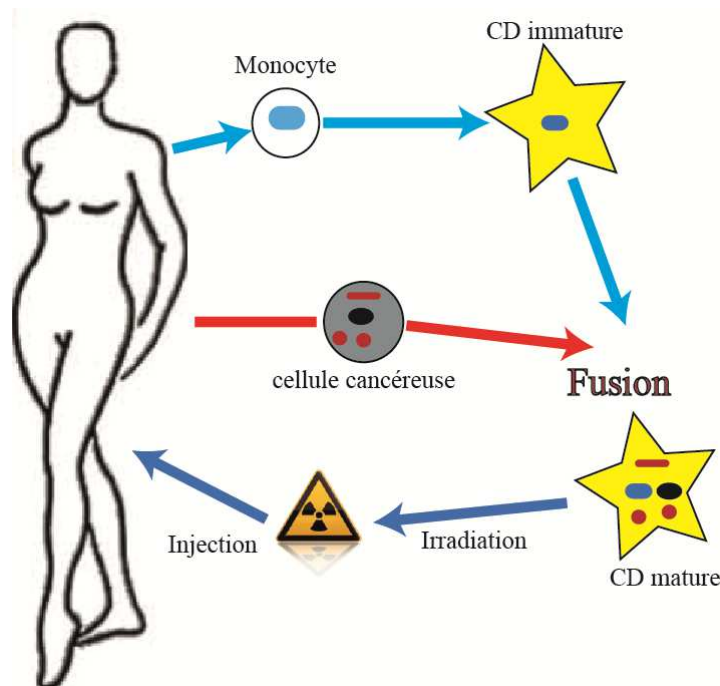
**Figure A2.1 :** Schéma représentatif d'un hybridome (CD mature) obtenu par fusion cellulaire, en supposant que l'hybridome acquiert les fonctions de présentation d'antigènes de la cellule cancéreuse sur les CMH de classe 1 et 2.

En 1997, Gong et *al.* proposaient l'utilisation d'hybridomes fusionnés (Cellule dendritique / Cellule cancéreuse) comme traitement anticancéreux contre des tumeurs murines établies (Gong et *al.* 1997). Très rapidement après ces premières expérimentations (3 ans), le premier test clinique en *phase 1* fut lancé (Kugler et *al.* 2000). Environ une dizaine d'essais cliniques utilisant des hybridomes fusionnés (par PEG ou électriquement) ont été effectués (dont : Kugler et *al.* 2000, Kikuchi et *al.* 2001, Marten et *al.* 2003, Avignan et *al.* 2004, Trefzer et *al.* 2004, Barbuto et *al.* 2004, Wei et *al.* 2007). Le mode opératoire est quasiment le même pour tous (figure A2.2) :

- Prélèvement de cellules cancéreuses et de précurseurs de CD
- Amplification des CD immatures
- Fusion des cellules cancéreuses autologues et des CD immatures (autologues ou allogéniques)

- Irradiation de la suspension non filtrée (contenant des hybridomes hétérologues, des fusions homologues CD/CD et cellules cancéreuses/cancéreuses) pour éliminer les risques de prolifération des cellules cancéreuses
- Injection intradermique du vaccin près du ganglion drainant la tumeur
- Le traitement est renouvelé sur plusieurs mois (en général 4 mois à raison d'une dose par mois).

Pour la majorité des patients, le traitement par hybridomes fusionnés a induit une réponse immunitaire. Dans certains cas, il a même entraîné une réponse anti-tumorale partielle ou totale (exceptionnellement). Le second résultat important découlant de ces études concerne les effets secondaires : quasiment aucun effet indésirable n'a été noté. En effet, à part une rougeur à l'endroit de l'injection et quelques poussées de fièvre, aucune réaction auto-immune contre les CMH n'a été observée ce qui est un bon signe pour la sécurité d'un traitement anti-tumoral.



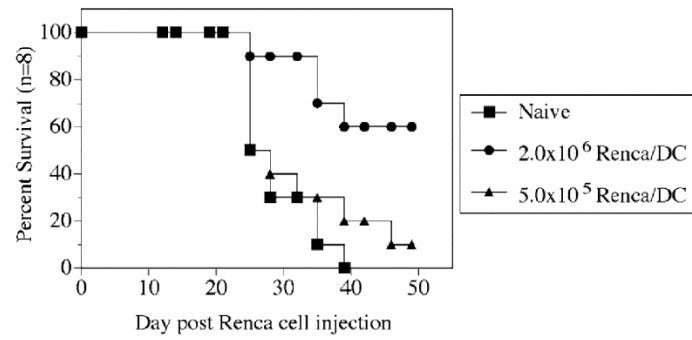
**Figure A2.2 :** Schéma de principe d'un traitement par fusion : prélèvement de monocytes (allogéniques ou autologues) et de cellules tumorales, production de cellules dendritiques (CD) immatures, fusion et génération de CD matures, irradiation de l'échantillon et enfin injection du vaccin.

En général, des CD autologues (issues du patient à traiter) sont utilisées. Néanmoins, il peut être difficile de produire des CD dans le cas de patients très immunodéprimés suite à de multiples traitements (ce qui était le cas des patients dans les essais cliniques précités car ils

avaient tous préalablement subi les traitements classiques sans succès). Les médecins ont donc souvent eu recours à des CD issues de donneurs sains (CD allogéniques). Malgré le risque de rejet dans ce dernier cas (réponse immunitaire dirigée contre les CMH non compatibles), certaines études sur souris ont prouvé que l'utilisation de CD allogéniques ou semi-allogéniques pour des hybridomes fusionnés, offrirait une meilleure protection anticancéreuse (Yasuda et *al.* 2007, Siders et *al.* 2003).

En ce qui concerne la méthode de fusion, la médiation chimique (PEG) est bien connue des biologistes, cliniciens et industriels car ce produit est utilisé depuis plus de 30 ans. Pourtant, il présente plusieurs inconvénients majeurs. Premièrement, il peut avoir un effet cytotoxique entraînant de faibles rendements de fusion (0,5% à 4,5 %) (Jantscheff et *al.* 2002). De plus, cette molécule induit la production d'agrégats cellulaires pouvant fausser l'analyse par FACS (pour *Fluorescence Activated Cell Sorting*). En effet, l'appareil ne pourra pas distinguer un hybridome cellule tumorale/CD d'un simple agrégat cellule tumorale/CD, entraînant ainsi un artéfact de mesure. Il y a alors une incertitude sur le rendement. Il est donc important de coupler la mesure FACS avec une autre méthode d'analyse. Enfin, la fusion par PEG n'est que partiellement contrôlable et difficile à standardiser (Karsten et *al.* 1988). Par ailleurs, l'électrofusion, de par son caractère non invasif, n'introduit aucune toxine dans la cellule. Elle est facile à standardiser et présente de bien meilleurs rendements (jusqu'à 20% en cuvettes, et beaucoup plus en microsystemes, mesures par FACS et méthode optique).

Bien que les résultats des tests cliniques sur l'Homme soient pour l'instant un peu décevants (très peu de rémissions), ils prouvent cependant l'applicabilité de la méthode sans dangers pour les patients. Les faibles taux de réussite peuvent être expliqués par la forte immunodépression induite par les multiples traitements anticancéreux antérieurs. De plus, très peu de CD matures (moins de 5%) injectées en intradermique migrent vers les organes lymphoïdes (De Vries et *al.* 2003). Cette méthode nécessite donc des études plus approfondies. De nombreuses équipes continuent les recherches afin d'améliorer le protocole sur modèles animaux. Il a par exemple été prouvé que l'augmentation de la dose injectée d'hybridomes avait un fort impact sur la qualité de la réponse immunitaire et augmentait considérablement le pronostic vital (Figure A2.3).



**Figure A2.3:** Effet de la dose d'hybridomes injectés. Des cellules tumorales rénales (Renca) furent injectées à 8 souris au jour 0 avant d'être traitées par des vaccins contenant  $2 \times 10^6$  ou  $5 \times 10^5$  hybridomes irradiés (électrofusion de cellules cancéreuse/dendritique) aux jours 3, 7 et 14. Des souris non vaccinées (Naive) représentent le contrôle négatif. Plus la quantité de CD matures par injection est élevée, plus la réponse au vaccin est importante (Siders et al. 2003)

### Rappels de calcul thermique :

Cette annexe vise à rappeler le développement de la force électrothermique, effectué par l'équipe de Ramos (Ramos et *al.* 1998, Castellanos et *al.* 2003).

L'application d'un champ électrique  $E$  dans un milieu de conductivité électrique  $\sigma$  provoque un échauffement dû à l'effet Joule. La puissance ainsi générée par unité de volume vaut  $\sigma E^2$ . Pour évaluer la variation de température qui en découle, l'équation de bilan d'énergie doit être résolue :

$$\underbrace{\rho_m C_p \bar{v} \cdot \nabla T}_{\text{Convection}} + \underbrace{\rho_m C_p \frac{\partial T}{\partial t}}_{\text{Changement différentiel de T}} = \underbrace{k \cdot \nabla^2 T}_{\text{Conduction}} + \underbrace{\sigma \cdot E^2}_{\text{Source de chaleur}} \quad (\text{A3.1})$$

où  $v$  est la vitesse et  $\rho_m$ ,  $C_p$  ( $4,18 \cdot 10^3 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) et  $k$  ( $0,6 \text{ J m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) respectivement la densité volumique, la chaleur spécifique à pression constante et la conductivité thermique du fluide. Le temps de diffusion du front de température peut être estimé par :

$$t_{diff} = \frac{\rho_m C_p l^2}{k} \quad (\text{A3.2})$$

Avec une distance caractéristique  $l = 20 \text{ }\mu\text{m}$ , nous obtenons  $t_{diff} \approx 10^{-3} \text{ s}$ . C'est-à-dire que le système atteint un équilibre thermique en 1 ms. Donc, pour des fréquences supérieures à 1 kHz, le changement différentiel de température est négligeable.

D'autre part, la convection est négligeable comparée à la conduction. Nous obtenons en analyse dimensionnelle:

$$\frac{|\rho_m C_p \nabla T|}{|k \cdot \nabla^2 T|} \approx \frac{\rho_m C_p v \cdot l}{k} \quad (\text{A3.3})$$

D'après les expériences de Ramos et *al.* (1998), la vitesse de billes en latex dans des microstructures à haute fréquence est de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{m/s}$ . En considérant que la vitesse du fluide est du même ordre de grandeur, et pour une distance caractéristique  $l = 20 \text{ }\mu\text{m}$  nous obtenons  $\rho_m C_p v \cdot l / k \sim 10^{-3} \ll 1$ . C'est ainsi que l'équation (A3.1) est simplifiée par:

$$k \cdot \nabla^2 T + \sigma \cdot E^2 = 0 \quad (\text{A3.4})$$

Notons que l'intensité lumineuse appliquée lors de l'observation sous microscope peut entraîner l'échauffement des électrodes, qui à leur tour créent un gradient de température dans le fluide (gradient inverse à l'échauffement électrothermique). Néanmoins, le mouvement provoqué par cette source est négligeable (Oh et *al.* 2009).

Expression de la force ETE :

La force électrique par unité de volume dans un fluide peut s'exprimer comme suit (Straton 1941):

$$\vec{f}_E = \rho_q \vec{E} - \frac{1}{2} \vec{E}^2 \cdot \vec{\nabla} \varepsilon + \frac{1}{2} \vec{\nabla} \left( \rho_m \frac{\partial \varepsilon}{\partial \rho_m} \vec{E}^2 \right) \quad (\text{A3.5})$$

avec  $\rho_q$  la densité de charge,  $\varepsilon$  la permittivité et  $\rho_m$  la masse volumique du milieu. Dans le cas d'un fluide incompressible, le dernier terme de l'équation (A3.5) n'a pas d'effet sur la dynamique. Il sera donc négligé dans la suite du développement (Straton 1941). La densité de charge du fluide s'exprime comme suit :

$$\rho_q = \vec{\nabla}(\varepsilon \vec{E}) \quad (\text{A3.6})$$

La force électrique par unité de volume s'écrit alors :

$$\vec{f}_E = (\nabla \varepsilon \cdot \vec{E} + \varepsilon \nabla \vec{E}) \vec{E} - \frac{1}{2} \vec{E}^2 \cdot \vec{\nabla} \varepsilon \quad (\text{A3.7})$$

Par ailleurs, considérons l'équation de conservation de la charge :

$$\vec{\nabla} \left( \sigma \vec{E} + \rho_q \vec{v} + \frac{\partial \rho_q}{\partial t} \right) = 0 \quad (\text{A3.8})$$

La divergence de la convection de la charge ( $\rho_q \vec{v}$ ) est négligeable devant la divergence du courant Ohmique :

$$\frac{|\vec{\nabla}(\rho_q \vec{v})|}{|\vec{\nabla}(\sigma \cdot \vec{E})|} \approx \frac{\rho_q \vec{v}}{|\sigma \cdot \vec{E}|} = \frac{|\vec{\nabla}(\varepsilon \cdot \vec{E}) \vec{v}|}{|\sigma \cdot \vec{E}|} \approx \frac{\varepsilon / \sigma}{l/v} \ll 1 \quad (\text{A3.9})$$

car le temps de parcours de la distance 'l' (typiquement 20  $\mu\text{m}$ ) à la vitesse 'v' (un maximum de 200  $\mu\text{m/s}$ ) est de 0,1 s, ce qui est bien supérieur au temps de relaxation de charge du milieu ( $\tau = \varepsilon/\sigma = 23,6$  ns, pour  $\varepsilon=80*8,85*10^{-12}$  m<sup>-3</sup> kg<sup>-1</sup> s<sup>4</sup> A<sup>2</sup> et  $\sigma = 0,03$  S/m). La divergence de la convection de la charge peut donc être négligée dans l'équation (A3.8), permettant d'exprimer le gradient du champ électrique et de simplifier l'équation (A3.7). La moyenne temporelle de la force électrique par unité de volume dans le cas d'un champ électrique réel est alors :



$$\langle \vec{f}_E \rangle = -\frac{1}{2} \left[ \left( \frac{\vec{\nabla} \sigma}{\sigma} - \frac{\vec{\nabla} \varepsilon}{\varepsilon} \right) \cdot \frac{\varepsilon \vec{E}^2}{1 + (\omega\tau)^2} + \frac{1}{2} E^2 |\vec{\nabla} \varepsilon| \right] \quad (\text{A3.10})$$

Force de Coulomb

Force diélectrique

En basses fréquences, la force de Coulomb domine alors qu'en hautes fréquences, c'est la force diélectrique qui prend le pas. Dans le cas de l'eau, nous avons  $\partial\sigma/(\sigma\partial T) = +2\%$  par degré et  $\partial\varepsilon/(\varepsilon\partial T) = -0,4\%$  par degré (Lide 1994). La fréquence de coupure est dans ce cas :

$$\omega_{cETE} = 2\pi f_{cETE} \approx \frac{1}{\tau} \left( 2 \frac{\left| \frac{\partial\sigma/\partial T}{\sigma} \right|}{\left| \frac{\partial\varepsilon/\partial T}{\varepsilon} \right|} \right)^{1/2} \approx \frac{3}{\tau} \Rightarrow f_{cETE} \approx 20\text{MHz} \quad (\text{A3.12})$$

Approximation de l'expression de la force ETE :

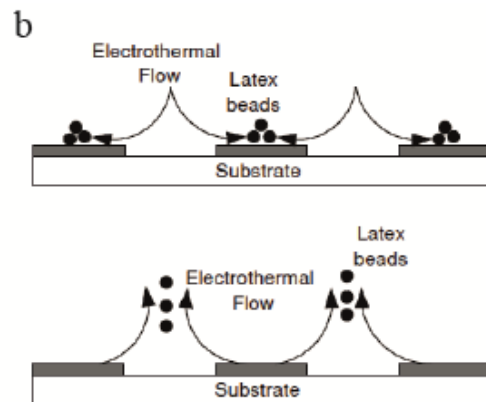
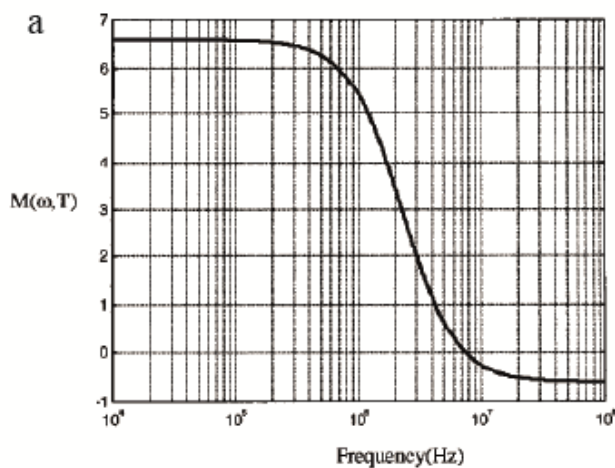
Le champ électrique dans le cas d'électrodes coplanaires faiblement écartées peut être approximé à :  $\vec{E}(r) = \frac{V}{\pi r} \vec{u}_\theta$  (Zahn 1979). De plus, les électrodes métalliques étant fortement conductrices, leur température est considérée constante. Ces hypothèses associées à l'équation (A3.4) permettent alors d'exprimer la variation de température comme suit :

$$\Delta T(\theta) = \frac{\sigma V^2}{2k} \left( \frac{\theta}{\pi} - \frac{\theta^2}{\pi^2} \right) \quad (\text{A3.13})$$

Cette dernière équation conduit à exprimer la force électrothermique (A3.10) en fonction de la tension appliquée :

$$\langle \vec{f}_E \rangle = -M(\omega, T) \left( \frac{\varepsilon \sigma V^4}{8k\pi^3 r^3 T} \right) \left( 1 - \frac{2\theta}{\pi} \right) \vec{u}_\theta \quad (\text{A3.14})$$

$$\text{avec : } M(\omega, T) = \left( \frac{T \cdot \partial\sigma}{\sigma \cdot \partial T} - \frac{T \cdot \partial\varepsilon}{\varepsilon \cdot \partial T} + \frac{T}{2\varepsilon} \frac{\partial\varepsilon}{\partial T} \right)$$



**Figure A3.1 :** a. Evolution du facteur M en fonction de la fréquence pour T=300°K et  $\sigma=0,01$  S/m (Ramos et *al.* 1998). b. Mouvement du fluide à basse fréquence (en haut, force Coulombienne donc M positif), et à haute fréquence (en bas) (Chen et *al.* 2006)

M est un coefficient sans unité. Il est positif aux fréquences inférieures à une fréquence de transition proche de  $f_{c_{ETE}}$  (A3.12). Pour des fréquences inférieures à la fréquence de coupure ( $\varepsilon\omega/\sigma \ll 1$ ) on prendra  $M = 6,6$ . Dans le cas contraire,  $M = -0,6$ . Ainsi la vitesse maximale d'une particule est estimée par (Castellanos et *al.* 2003):

$$\begin{aligned} \frac{\varepsilon\omega}{\sigma} \ll 1 & \quad : & \quad U_{ETE} \approx 5 \times 10^{-4} \frac{\varepsilon\sigma V^4}{k\eta r} \left( \left| \frac{\partial\sigma}{\partial T} \right| \right) \\ \frac{\varepsilon\omega}{\sigma} \gg 1 & \quad : & \quad U_{ETE} \approx 2.5 \times 10^{-4} \frac{\varepsilon\sigma V^4}{k\eta r} \left( \left| \frac{\partial\varepsilon}{\partial T} \right| \right) \end{aligned} \quad (A3.16)$$

Il est à noter que pour obtenir ces approximations, Castellanos et *al.* (2003) se sont placés dans le cas où r est compris entre la distance inter électrodes typique (25  $\mu\text{m}$ ) et la hauteur de la frontière supérieure (200  $\mu\text{m}$ ).

## Références bibliographiques

- Abgrall et al. 2006: P. Abgrall, C. Lattes, V. Conédéra, S. Colin, A.M. Gué, “A novel fabrication method of flexible and monolithic 3D microfluidic structures using lamination of SU-8 films”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16, 113-121 (2006)
- Alderman et al. 2001: Alderman BEJ, Mann CM, Steenson DP and Chamberlain JM 2001 Microfabrication of channels using an embedded mask in negative resist *J. Micromech. Microeng.* 11 703-5
- Alshareef et al. 2013 : M. Alshareef, N. Metrakos, E. J. Perez, F. Azer, F. Yang, X. Yang, G. Wang, “Separation of tumor cells with dielectrophoresis-based microfluidic chip”, *Biomicrofluidics* 7, 011803 (pp 12) (2013)
- Ammar et al. 2013: M. Ammar, C. Smadja, L. Giang Thi Phuong, M. Azzouz, J. Vigneron, A. Etcheberry, M. Taverna, E. Dufour-Gergam, “A new controlled concept of immune-sensing platform for specific detection of Alzheimer's biomarkers”, *Biosensors and Bioelectronics* Volume 40, Issue 1, Pages 329–335 (2013), Selected Papers from the World Congress on Biosensors
- Andrieux 2008: J. Andrieux, “Puces à ADN (CGH-array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques Array-CGH for routine diagnosis of cryptic chromosomal imbalances”, *Pathologie Biologie* 56, 368–374 (2008)
- Arnold et Zimmermann 1988: W.M. Arnold, U. Zimmermann, “Electro-rotation—development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles”, *J. Electrostat.* 21 (2-3), 151–191 (1988)
- Auvray et al. 2012 : P. Auvray, L. Rousseau, G. Lissorgues, F. Soulier, O. Potin, S. Bernard, F. Dieuleveult, E. Scorsone, P. Bergonzo, L. Chicaud, S. Picaud, J.A. Sahel, “A passive pressure sensor for continuously measuring the intraocular pressure in glaucomatous patients”, *IRBM* 33 (2), 117–122 (2012)
- Avignan et al. 2004 : D. Avigan, B. Vasir, J. Gong, V. Borges, Z. Wu, L. Uhl, M. Atkins, J. Mier, D. McDermott, T. Smith, N. Giallambardo, C. Stone, K. Schadt, J. Dolgoff, J.-C. Tetreault, M. Villarreal, D. Kufe, “Fusion cell Vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses”, *Clinical Cancer Research*, 10, 4699-4708 (2004)
- Ayed, thèse 2012 : Ichraf Ayed, “Développement d’une méthode de préconcentration de phosphopeptides sur phase monolithique en puce”, Thèse de Doctorat soutenue le 27 Septembre 2012, à l’Université Paris-Sud, Orsay.
- AZOM 2013: <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=4961>, site web visité le 23-07-2013.
- Bachi et al. 1973: T. Bachi, M. Aguet, C. Howe, “Fusion of Erythrocytes by Sendai Virus Studied by Immuno-Freeze-Etching”, *Journal of Virology* 11 (6), 1004-1012, 1973
- Bai et al. 2010: Y. Bai, X. He, D. Liu, S.N. Patil, D. Bratton, A. Huebner, F. Hollfelder, C. Abell, W.T.S. Huck, “A double droplet trap system for studying mass transport across a droplet-droplet interface”, *Lab Chip* 10, 1281–1285 (2010)
- Barbuto et al. 2004: J.A.M. Barbuto, L.F.C. Ensina, A.R. Neves, P.C. Bergami-Santos, K.R.M. Leite, R. Marques, F. Costa, S.C. Martins, L.H. Camara-Lopes, A.C. Buzaid, “Dendritic cell–tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer”, *Cancer Immunol Immunother* 53(12), 1111-1118 (2004)
- Barrau et al. 2004: C. Barrau, J. Teissie, B. Gabriel, “Osmotically induced membrane tension facilitates the triggering of living cell electropermeabilization”, *Bioelectrochemistry* 63, 327–332 (2004)
- Becker et al. 1995: F.F. Becker, X.-B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal, P.R. Gascoyne, “Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (3), 860-864 (January 1995)

- Bhattacharya et al. 2005: S. Bhattacharya, A. Datta, J. M. Berg, S. Gangopadhyay, “*Studies on Surface Wettability of Poly(Dimethyl) Siloxane (PDMS) and Glass Under Oxygen-Plasma Treatment and Correlation With Bond Strength*”, J of Microelectromechanical systems, Vol. 14, N°. 3, 590-597 (2005)
- Bisceglia et al. 2013: E. Bisceglia, M. Cubizolles, F. Mallard, F. Vinet, O. Français, B. Le Pioufle, “*Micro-organism extraction from biological samples using DEP forces enhanced by osmotic shock*”, Lab Chip, 13, pp 901-909 (2013)
- Bischoff et al. 1982: R. Bischoff, R.M. Eisert, I. Schedel, J. Vienken, U. Zimmerman, “*Human hybridoma cells produced by electro-fusion*”, FEBS Lett. 147(1), 64-8 (1982)
- Bohnenkamp and Noll, 2003: H.R. Bohnenkamp, T. Noll, “*Development of a standardized protocol for reproducible generation of matured monocyte-derived dendritic cells suitable for clinical application*”, Cytotechnology 42, 121-131 (2003)
- Cabodevila et al. 2002 : G. Cabodevila, M. Frénéa, K. Cozic, H. Nagai, B. Le Pioufle, Y. Murakami, E. Tamiya, H. fujita, “*Arrayed Micro Needles and Electrodes for Aligned Cell Capture and Gene Insertion*”, CHEMICRO 2002 symposium, Kyoto, Japan, pp. 35, March 15-16 (2002)
- Campbell et al. 1996: K.H.S. Campbell, J. Mcwhir, W.A. Ritchie, I. Wilmut, “*Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*”, Nature 380, 64 – 66 (1996)
- Canpolat et al. 2013: C. Canpolat, S. Qian, A. Beskok, “*Micro-PIV measurements of induced-charge electro-osmosis around a metal rod*”, Microfluid. Nanofluid. 14 (1–2), 153–162 (2013)
- Cao et at. 2011: C. Cao, S. W. Birtwell, J. Høgberg, A. Wolff, H. Morgan, D. Duong Bang, “*Surface modification of photoresist SU8 for low autofluorescence and bioanalytical applications*”, 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, October 2-6 2011, Seattle, Washington, USA, pp 1161-1163
- Castellanos et al. 2003: A. Castellanos, A. Ramos, A. Gonzalez, N.G. Green, H. Morgan, “*Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: scaling laws*”, J. Phys. D: Appl. Phys. 36, 2584–2597 (2003)
- Chaki et al. 2002: N. K. Chaki, K. Vijayamohanan, “*Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications*”, Biosensors and Bioelectronics 17 (1-2), 1-12 (2002)
- Chaumont 2013 : P. Chaumont, “*Caractérisation par spectroscopie infra-rouge d’une fonctionnalisation de surface en vue d’un greffage biologique*”, rapport de stage, soutenu le 11 Juin 2013
- Chen et al. 2006: D.F. Chen, H. Du, “*Simulation studies on electrothermal fluid flow induced in a dielectrophoretic microelectrode system*”, J. Micromech. Microeng. 16, 2411–2419 (2006)
- Chen et al. 2011: A. Chen, T. Pan, Three-dimensional fit-to-flow microfluidic assembly, Biomicrofluidics 5, 046505 (9 pp), (2011)
- Chernomordik et al. 2008: Chernomordik, M. M. Kozlov, “*Mechanics of membrane fusion*”, Nat Struct Mol Biol 15 (7), 675-83 (2008)
- Chuang et al. 2003: Y-J. Chuang, F-G. Tseng, J-H. Cheng, W-K. Lin, “*A novel fabrication method of embedded micro-channels by using SU-8 thick-film photoresists*”, Sensors and Actuators A-Physical 103 (1-2), 64-69 (2003)
- Clow et al. 2009: A. Clow, P. Gaynor, B Oback, “*Coplanar film electrodes facilitate bovine nuclear transfer cloning*”, Biomedical Microdevices 11 (4), 851-859 (2009)
- Clow et al. 2010: A.L. Clow, P.T. Gaynor, B.J. Oback, “*A novel micropit device integrates automated cell positioning by dielectrophoresis and nuclear transfer by electrofusion*”, Biomedical Microdevices 12, 777–786 (2010)

- Coirault et al. 2003 : C. Coirault, J-C. Pourny, F. Lambert, Y. Lecarpentier, “*Les pinces optiques en biologie et en médecine*”, *Medecine Sciences* 19 (3), 364-367 (2003)
- Couty, thèse 2012 : M. Couty, “*Etude du procédé de réalisation de micro-antennes souples implantables pour l’Imagerie médicale par Résonance Magnétique*”, thèse de Doctorat soutenue le 07 Décembre 2012
- Coster 1965: H.G. Coster, “*A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through"*”. *Biophys. J.* 5, 669–686 (1965)
- Crowley 1973: J.M. Crowley, “*Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability*”, *Biophys. J.* 13, 711–724 (1973).
- Cummings et al. 2003: E. B. Cummings and A. K. Singh, “*Dielectrophoresis in Microchips Containing Arrays of Insulating Posts: Theoretical and Experimental Results Analytical chemistry*”, 75(18), 4724-4731 (2003)
- Dalmay et al. 2010 : C. Dalmay, M. Cheray, A. Pothier, F. Lalloué, M.O. Jauberteau, P. Blondy, “*Ultra sensitive biosensor based on impedance spectroscopy at microwave frequencies for cell scale analysis*”, *Sensors and Actuators A: Physical* 162 (2), 189–197 (2010) (Euroensors conference XXIII, 2009)
- Dalmay et al. 2011: C. Dalmay, J. Villemejeane, V. Joubert, O. Français, L.M. Mir, B. Le Pioufle, “*Design and realization of a microfluidic device devoted to the application of ultra-short pulses of electrical field to living cells*”, *Sensors and Actuators B: Chemical* 160 (1), 1573–1580 (2011)
- Dalmay et al. 2012: C. Dalmay, M. A. De Menorval, O. Français, L. M. Mir, B. Le Pioufle, “*A microfluidic device with removable packaging for the real time visualisation of intracellular effects of nanosecond electrical pulses on adherent cells*”, *Lab Chip* 12, 4709-4715 (2012)
- Daud et al. 2008: A.I. Daud, R.C. DeConti, S. Andrews, P. Urbas, A.I. Riker, V.K. Sondak, P.N. Munster, D.M. Sullivan, K.E. Ugen, J.L. Messina, R. Heller, “*Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma*”, *J. Clin. Oncol.* 26, 5896–5903 (2008)
- Davalos et al. 2005 : R.V. Davalos, L.M. Mir, B. Rubinsky, “*Tissue ablation with irreversible electroporation*”, *Ann. Biomed. Eng.* 33, 223–231 (2005)
- Delemotte et al. 2008: L. Delemotte, F. Dehez, W. Treptow, M. Tarek, “*Modeling Membranes under a Transmembrane Potential*”, *J. Phys. Chem. B* 112 (18), 5547–5550 (2008)
- Deman et al. 2011 : A-L Deman, M Brun, M Quatresous, J-F Chateaux, M Frenea-Robin, N Haddour, V Semet, R Ferrigno, “*Characterization of C-PDMS electrodes for electrokinetic applications in microfluidic systems*”, *J. Micromech. Microeng.* 21 (9), 095013 (2011)
- Demierre et al. 2007: N. Demierre, T. Braschler, P. Linderholm, U. Seger, H. van Lintel, P. Renaud, “*Characterization and optimization of liquid electrodes for lateral dielectrophoresis*”, *Lab Chip* 7, 355–365 (2007)
- De Vries et al. 2003: I.J.M. De Vries, D.J.E.B. Krooshoop, N.M. Scharenborg, W.J. Lesterhuis, J.H.S. Diepstra, G.N. P. Van Muijen, S.P. Strijk, T.J. Ruers, O.C. Boerman, W.J. G. Oyen, G.J. Adema, C.J. A. Punt, C.G. Figdor, “*Effective Migration of Antigen-pulsed Dendritic Cells to Lymph Nodes in Melanoma Patients Is Determined by Their Maturation State*”, *Cancer Res* 63, 12-17 (2003)
- Di Carlo et al. 2006: D. Di Carlo, L. Y. Wu, L. P. Lee, “*Dynamic single cell culture array*”, *Lab Chip* 6, 1445–1449 (2006)
- Dimova et al. 2007 : R. Dimova, K. A. Riske, S. Aranda, N. Bezlyepkina, R. L. Knorr, R. Lipowsky, “*Giant vesicles in electric fields*”, *Soft Matter* 3, 817–827 (2007)
- Djilas et al. 2011: M Djilas, C Olès, H Lorach, A Bendali, J Dégardin, E Dubus, G Lissorgues-Bazin, L Rousseau, R Benosman, S-H Ieng, S Joucla, B Yvert, P Bergonzo, J Sahel, S Picaud, “*Three-dimensional electrode arrays*

- for retinal prostheses: modeling, geometry optimization and experimental validation”, *J. Neural Eng.* 8 (4), 046020 (2011)
- Ducloux et al. 2010: O. Ducloux, E. Galopin, F. Zoueshtiagh, A. Merlen, V. Thomy, “*Enhancement of biosensing performance in a droplet-based bioreactor by in situ microstreaming*”, *Biomicrofluidics* 4, 011102 (5 pp), (2010)
- Eddings et al. 2008: M. A. Eddings, M. A. Johnson, B. K. Gale, “*Determining the optimal PDMS–PDMS bonding technique for microfluidic devices*”, *J. Micromech. Microeng.* 18, 067001 (4pp), (2008)
- Feng et al. 2007: J. J. Feng, S. Krishnamoorthy, S. Sundaram, “*Numerical analysis of mixing by electrothermal induced flow in microfluidic systems*”, *Biomicrofluidics* 1 (2), 024102 (pp 8 ), (2007)
- Ferreira et al. 2008 : E. Ferreira, E. Potier, D. Logeart-Avramoglou, S. Salomskaite-Davaliene, L.M. Mir, H. Petite, “*Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection*”, *Gene Therapy*, 15(7), 537–544 (2008)
- Feynman 1959: R.P. Feynman, “*Plenty of room at the bottom*”, < <http://www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html> >, visité le 27 Août 2013
- Forestier 1929 : J. Forestier, “*L'aurothérapie dans les rhumatismes chroniques*”, *Ann Med Interne (Paris)* 53, 323-327 (1929)
- Frenea 2003: M. Frenea-Robin, “*Micromanipulation de particules par dielectrophorèse : Application au rangement matriciel et au tri de cellules sur puce*”, thèse de Doctorat soutenue le 17 Décembre 2003
- Frenea et al. 2004 : M. Frenea, S. P. Faure, B. Le Pioufle, P. Coquet, H. Fujita, “*Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis*”, *Mater. Sci. Eng. C* 23(5), 597–603 (2003)
- Friedrich et al. 1998: U. Friedrich, N. Stachowicz, A. Simm, G. Fuhr, K. Lucas, U. Zimmermann, “*High efficiency electrotransfection with aluminum electrodes using microsecond controlled pulses*”, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 47 (1), 103–111 (1998)
- Friend, Finch et al. 1975: A.W.Jr Friend, E. D. Finch, H.P. Schwan, “*Low frequency electric field induced changes in the shape and motility of amoebas*”, *Science* 187 (4174), 357-359 (1975)
- Gabriel et Teissié 1997: B. Gabriel, J. Teissié, “*Direct Observation in the Millisecond Time Range of Fluorescent Molecule Asymmetrical Interaction with the Electroporabilized Cell Membrane*”, *Biophysical J.* 73, 2630-2637 (1997)
- Galea-Laury et al. 2002: J. Galea-Lauri, D. Darling, G. Mufti, P. Harrison, F. Farzaneh, “*Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell–leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination*”, *Cancer Immunol Immunother* 51(6), 299-310 (2002)
- Gascoyne et al. 1997: P. Gascoyne, R. Pethig, J. Satayavivad, F. F. Becker, and M. Ruchirawat, “*Dielectrophoretic detection of changes in erythrocyte membranes following malarial infection*”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* , 1323, 240- 252 (1997)
- Gascoyne et Vykoukal 2004: P. R. C. Gascoyne, J. V. Vykoukal, J. A. Schwartz, T. J. Anderson, D. M. Vykoukal, K. W. Current, C. McConaghy, F. F. Beckera, C. Andrews, “*Dielectrophoresis-based programmable fluidic processors*”, *Lab Chip* 4 , 299–309 (2004)
- Gascoyne et al. 2009: P.R.C. Gascoyne, J. Noshari, T.J. Anderson, F.F. Becker, “*Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis*”, *Electrophoresis* 30 (8), 1388–1398 (2009)
- Gass et Chernomordik 1990: G.V. Gass, L.V. Chernomordik, “*Reversible large-scale deformations in the membranes of electrically-treated cells: electroinduced bleb formation*”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1023 (1), 1–11 (1990)

- Gel et al. 2009: M. Gel, S. Suzuki, Y. Kimura, O. Kurosawa, B. Tschamnat, H. Oana, M. Washizu, “*Microorifice-based high-yield cell fusion on microfluidic chip: electrofusion of selected pairs and fusant viability*”, IEEE Trans. Nanobiosci. 8, 300–305 (2009)
- Gel et al. 2010: M. Gel, Y. Kimura, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu, “*Dielectrophoretic cell trapping and parallel one-to-one fusion based on field constriction created by a micro-orifice array*”, Biomicrofluidics 4, 022808 (pp 8) (2010)
- Georgel et al. 2008: V. Georgel, F. Verjus, E.C.E. van Grunsven, P. Poulichet, G. Lissorgues, C. Pellet, S. Chamalye, T. Bourouina, “*A SAW filter integrated on a silicon passive substrate used for system in package*”, Sensors and Actuators A 142, 185–191 (2008)
- Gimsa et al. 1991: J. Gimsa, P. Marszalek, U. Loewe, T. Y. Tsong, “*Dielectrophoresis and electrorotation of neurospora slime and murine myeloma cells*”, Biophys. J. 60 (4), 749-760 (1991)
- Gimsa et al. 2001: J. Gimsa, D. Wachner, “*Analytical Description of the Transmembrane Voltage Induced on Arbitrarily Oriented Ellipsoidal and Cylindrical Cells*”, Biophysical Journal 81(4), 1888-1896 (2001)
- Glass et al. 2011: Nick R. Glass, Ricky Tjeung, Peggy Chan, Leslie Y. Yeo, James R. Friend, “*Organosilane deposition for microfluidic applications*”, Biomicrofluidics 5, 036501 (7 pp), (2011)
- Goddard et al. 2003: R.V. Goddard, A.G. Prentice, J. A. Copplestone, E. R. Kaminski, “*In vitro dendritic cell-induced T cell responses to B cell chronic lymphocytic leukaemia enhanced by IL-15 and dendritic cell–B-CLL electrofusion hybrids*”, Clin Exp Immunol, 131, 82-89 (2003)
- Golzio et al. 1998: Golzio M, Mora M-P, Raynaud C et al “*Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells*”, Biophys J. 74, 3015–3022 (1998)
- Gong et al. 1997: J. Gong, D. Chen, M. Kashiwaba, D. Kufe, “*Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells*”, Nature Medicine 3, 558 - 561 (1997)
- Gray et al. 2004: D. S. Gray, J. L. Tan, J. Voldman, C. S. Chen, “*Dielectrophoretic registration of living cells to a microelectrode array*”, Biosensors and Bioelectronics 19, 771–780 (2004)
- Gregoire et al. 2009: G. Gregoire, B. Grosogeat, P. Millet, P. Rocher, “*Alliages dentaires*”, Société Francophone des Biomateriaux Dentaires (SFBD), support de cours 2009-2010, <http://umvf.univ-nantes.fr/odontologie/enseignement/chap15/site/html/cours.pdf>
- Guerin et al. 1997: L. Guerin, M. Bossel, M. Demierre, S. Calmes, P. Renaud, “*Simple and low cost fabrication of embedded microchannels by using a new thick-film photoplastic*”, Solid State Sensors and Actuators 2, 1419-1422 (1997) (TRANSDUCERS '97, international conference, Chicago 16-19 Jun 1997)
- Halfmann et al. 1982: H.J. Halfmann, W. Röcken, C.C. Emeis, U. Zimmermann, “*Transfer of mitochondrial function into a cytoplasmic respiratory-deficient mutant of Saccharomyces yeast by electro-fusion*”, Current Genetics 6 (1), 25-28 (1982)
- Haluska et al. 2006: C.K. Haluska, K.A. Riske, V. Marchi-Artzner, J-M. Lehn, R. Lipowsky, R. Dimova, “*Time scales of membrane fusion revealed by direct imaging of vesicle fusion with high temporal resolution*”, PNAS 103 (43) 15841–15846 (2006)
- Hamdi et al. 2011a : F. Hamdi, O. Français, J. Villemejeane, M. Woytasik, C. Dalmay, L.M. Mir, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*A microfluidic biochip dedicated to highly parallelized electrofusion*”,; in Proceedings of MMB 2011, vol. 1, W2P2, 2011 (International Microtechnologies for Medicine and Biology conference, Suisse, 04- 06 mai 2011)
- Hamdi et al. 2011b : F. S. Hamdi, O. Français, M. Woytasik, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Self-control of cell electroporation by dielectrophoresis transistion*”, International NanoBioTech conference 2011, Suisse, 14-16 novembre 2011

- Hamdi et al. 2013a: F. S. Hamdi, O. Français, S. Subra, W. Wang, M. Woytasik, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Study of the transmembrane potential distribution of cell pairs in a microfluidic device using polymer obstacles to initiate electrofusion*”, Eur. Phys. J.: Appl. Phys. 62(1), 11202 (pp 10), (2013)
- Hamdi et al. 2013b: F. Hamdi, W. Wang, F. Subra, E. Dufour-Gergam, O. Français, B. Le Pioufle, “*High Density Cell Electrofusion on Chip using an Array of Non-connected Metallic Pads*”, In Proceedings of the International Conference on Biomedical Electronics and Devices, pages 68-72, 11-14 février 2013
- Hamdi et al. 2013c : F. S. Hamdi, O. Français, F. Subra, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Microarray of non-connected gold pads used as high density electric traps for parallelized pairing and fusion of cells*”, Biomicrofluidics 7, 044101 (14 pp), (2013)
- Hoettges et al. 2003: K.F. Hoettges, M.B. McDonnell, M.P. Hughes, “*Use of combined dielectrophoretic/electrohydrodynamic forces for biosensor enhancement*”, J. Phys. D: Appl. Phys. 36, p. L101 (2003)
- Holzel et al. 2005: R. Holzel, N. Calander, Z. Chiragwandi, M. Willander, F.F. Bier, “*Trapping Single Molecules by Dielectrophoresis*”, Phys.Rev. Lett. 95(12), 128102 (pp 4), (2005)
- Hu et al. 2011a: N. Hu, J. Yang, S. Qian, S.W. Joo, X. Zheng, “*A cell electrofusion microfluidic device integrated with 3D thin-film microelectrode arrays*”, Biomicrofluidics 5 34121 (pp 12) (2011)
- Hu et al. 2011b: N. Hu, J. Yang, Z.Q. Yin, Y. Ai, S. Qian, I.B. Svir, B. Xia, J.W. Yan, W.S. Hou, X.L. Zheng, “*A high-throughput dielectrophoresis-based cell electrofusion microfluidic device*”, Electrophoresis 32, 2488–2495 (2011)
- Hu et al. 2012: N. Hu, J. Yang, S. Qian, X. Zhang, S.W. Joo, X. Zheng, “*A cell electrofusion microfluidic chip using discrete coplanar vertical sidewall microelectrodes*”, Electrophoresis 33, 1980–1986 (2012)
- Hu et al. 2013: N. Hu, J. Yang, S.W. Joo, A.N. Banerjee, S. Qian, “*Cell electrofusion in microfluidic devices: A review*”, Sensors and Actuators B 178, 63– 85 (2013)
- Hua et al. 2004: F. Hua, Y. Sun, A. Gaur, M.A. Meitl, L. Bilhaut, L. Rotkina, J. Wang, P. Geil, M. Shim, J.A. Rogers, “*Polymer Imprint Lithography with Molecular-Scale Resolution*”, Nano letters 4, 2467-2472 (2004)
- Ivorra et al. 2010: A. Ivorra, J. Villemejane, L.M. Mir, “*Electrical modeling of the influence of medium conductivity on electroporation*”, Phys. Chem. Chem. Phys. 12, 10055-10064 (2010)
- Jager et al. 2000: E. W. H. Jager, O. Inganäs, I. Lundström, “*Microrobots for Micrometer-Size Objects in Aqueous Media: Potential Tools for Single-Cell Manipulation*”, Science 288 (5475), 2335-2338 (2000)
- Jaeger 2002: R.C. Jaeger, “*Lithography. Introduction to microelectronic fabrication*”, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA (2002)
- Jantscheff et al. 2002 : P. Jantscheff, G. Spagnoli, P. Zajac, C. Rochlitz, “*Cell fusion: an approach to generating constitutively proliferating human tumor antigen-presenting cells*”, Cancer Immunology, Immunotherapy 51 (7), 367-375 (2002)
- Jeon et al. 2004: S. Jeon, J. Park, R. Cirelli, S. Yang, C.E. Heitzman, P.V. Braun PV, P.J.A. Kenis, J.A. Rogers, “*Fabricating Complex Three-Dimensional Nanostructures with High-Resolution Conformable Phase Masks*”, PNAS 101 (34), 12428-12433 (2004)
- Jeyamkondan et al. 1999: S. Jeyamkondan, D.S. Jayas, R.A. Holley, “*Pulsed electric field processing of foods: a review*”. Journal of Food Protection 62(9), 1088–1096 (1999)
- Jo et al. 2000: B-H. Jo, L. M. Van Lerberghe, K. M. Motsegood, D. J. Beebe, “*Three-Dimensional Micro-Channel Fabrication in Polydimethylsiloxane (PDMS) Elastomer*”, J of Microelectromechanical Systems 9(1), 76-81 (2000)



- Jokinen et al. 2012: V. Jokinen, P. Suvanto, S. Franssila, “*Oxygen and nitrogen plasma hydrophilization and hydrophobic recovery of polymers*”, *Biomicrofluidics* 6, 016501 (10 pp), (2012)
- Jones 1995: T. B. Jones, “*Electromechanics of particles*”, Cambridge University Press, 1995
- Jones 2003: T. B. Jones, “*Basic Theory of Dielectrophoresis and Electrorotation*”, *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, pp 33-42, Novembre/Décembre 2003
- Joshi et al. 2007: Manoj Joshi, Richard Pinto, V. Ramgopal Rao, Soumyo Mukherji, “*Silanization and antibody immobilization on SU-8*”, *Applied Surface Science* 253, 3127–3132 (2007)
- Jothimuthu et al. 2009: P. Jothimuthu, A. Carroll, A. A. S. Bhagat, G. Lin, J. E. Mark, I. Papautsky, “*Photodefinable PDMS thin films for microfabrication applications*”, *J. Micromech. Microeng.* 19, 045024 (9pp), (2009)
- Ju et al. 2009: J. Ju, J.M. Ko, H.C. Cha, J.Y. Park, C.H. Im, S.H. Lee, “*An electrofusion chip with a cell delivery system driven by surface tension*”, *J. Micromech. Microeng.* 19 (1), 015004 (pp 10) (2009)
- Ju et al. 2007: J. Ju, J-M. Ko, H-C. Cha, S.H. Lee, “*A microfluidic Device for Electrofusion of Two Plant Cells*” ; *IFMBE Proceedings* 14, 302-305 (2007), *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*
- Kao et al. 2005: J.Y. Kao, M. Zhang, C-M. Chen, J-J. Chen, “*Superior efficacy of dendritic cell-tumor fusion vaccine compared with tumor lysate-pulsed dendritic cell vaccine in colon cancer*”, *Immunology Letters* 101 (2), 154-159 (2005)
- Karsten et al. 1988: U. Karsten, P. Stolley, I. Walther, G. Papsdorf, S. Weber, K. Conrad, L. Pasternak, J. Kopp, “*Direct Comparison of Electric Field-Mediated and PEG-Mediated Cell Fusion for the Generation of Antibody Producing Hybridomas*”, *Hybridoma* 7(6): 627-633 (1988)
- Kato et al. 2011: M. Kato, E. Sasamori, T. Chiba, Y. Hanyu, “*Cell activation by CpG ODN leads to improved electrofusion in hybridoma production*”, *Journal of Immunological Methods* 373, 102–110 (2011)
- Kemna et al. 2011: E.W.M. Kemna, F. Wolbers, I. Vermes, A. van den Berg, “*On chip electrofusion of single human B cells and mouse myeloma cells for efficient hybridoma generation*”, *Electrophoresis* 32 3138–3146 (2011)
- Khoshmanesh et al. 2011: K. Khoshmanesh, S. Nahavandi, S. Baratchi, A. Mitchell, K. Kalantar-zadeh, “*Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems*”, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (5), 1800–1814 (2011)
- Kikuchi et al. 2001: T. Kikuchi, Y. Akasaki, M. Irie, S. Homma, T. Abe, T. Ohno “*Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusion of dendritic and glioma cells*”, *Cancer immunol. and immunother.* 50(7), 337-344 (2001)
- Kimura et al. 2011: Y. Kimura, M. Gel, B. Techaumnat, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu, “*Dielectrophoresis-assisted massively parallel cell pairing and fusion based on field constriction created by a micro-orifice array sheet*”, *Electrophoresis* 32, 2496–2501 (2011)
- Kleber 1983: A.G. Kleber, “*Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts*”, *Circulation Research* 52, 442-450 (1983)
- Koh et al. 2012: K.-S. Koh, J. Chin, J. Chia, C.-L. Chiang, “*Quantitative studies on PDMS-PDMS interface bonding with Piranha solution and its swelling effect*”, *Micromachines*, 3 (2), 427-441, (2012)
- Kohler et Milstein 1975: G. Kohler, C. Milstein, “*Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*”, *Nature* 256, 495 - 497 (1975)

- Kotnik et al. 1997: T. Kotnik, F. Bobanovic, D. Miklavcic, “*Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—a theoretical analysis*”, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43, 285-291 (1997)
- Kotnik et al. 2001: T. Kotnik, D. Miklavcic, L.M. Mir, “*Cell membrane electroporation by symmetrical bipolar rectangular pulses: Part ii. reduced electrolytic contamination*”, *Bioelectrochemistry*, 54 (1), 91–95 (2001)
- Kugler et al. 2000: A. Kugler, G. Stuhler, P. Walden, G. Zöller, A. Zobywalski, P. Brossart, U. Trefzer, S. Ullrich, C. A. Müller, V. Becker, A. J. Gross, B. Hemmerlein, L. Kanz, G. A. Müller, R-H. Ringert, “*Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell–dendritic cell hybrids*”, *Nature Medicine* 6, 332 - 336 (2000)
- Labeed et al. 2003: F.H. Labeed, H.M. Coley , H. Thomas, M.P. Hughes, “*Assessment of Multidrug Resistance Reversal Using Dielectrophoresis and Flow Cytometry*”, *Biophys.J.* 85(3), 2028–2034 (2003)
- Laforêt-Ast 2010: J. Laforêt-Ast, “*Caractérisation de microparticules par méthodes diélectrophorétiques : Applications aux cellules biologiques*”, Thèse de Doctorat soutenue en mars 2010.
- Landahl 1948: H. D. Landahl, “*A note on the units of membrane permeability to water*”, *Bulletin of mathematical biophysics*, 10 (3), 187-190 (1948)
- Landoulsi et al. 2011: Landoulsi, J., Genet, M. J., El Kirat, K., Richard, C., Pulvin, S., & Rouxhet, P. G. “*Silanization with APTES for controlling the interactions between stainless steel and biocomponents: reality vs expectation*”, *Biomaterials-Physics and Chemistry* 5, 99-126 (2011)
- Lang et al. 2011: J. Lang, B. Catargi, S. Renaud, M. Raoux, G. Charpentier, Y. Bornat, “*Sensor for measuring the activity of beta-pancreatic cells or of islets of langerhans, manufacture and use of such a sensor*”, European Patent Application 20110700172 (2011)
- Lapizco-Encinas et al. 2005: B.H. Lapizco-Encinas, R.V. Davalos, B.A. Simmons, E.B. Cummings, Y. Fintschenko, “*An insulator-based (electrodeless) dielectrophoretic concentrator for microbes in water*”, *J.Microbiol.Methods* 62(3), 317–326 (2005), 5th International Symposium on the Interface between Analytical Chemistry and Microbiology — ISIAM 2004
- Larramendy et al. 2012: F. Larramendy, L. Mazonq, P. Temple-Boyer, L. Nicu, “*Three-dimensional closed microfluidic channel fabrication by stepper projection single step lithography: the diablo effect*”, *Lab Chip* 12, 387-390 (2012)
- Lee et al. 1999: S-W. Lee, Y-C. Tai, “*A micro cell lysis device*”, *Sensors and actuators* 73, 74-79 (1999)
- Lee et al. 2008: H. Lee, E. Sun, D. Ham, R. Weissleder, “*Chip–NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells*, *Nature Medicine* 14, 869 - 874 (2008)
- Lee et al. 2009: N-Y. Lee, B-H Chung, “*Novel Poly(dimethylsiloxane) Bonding Strategy via Room Temperature “Chemical Gluing”*”, *Langmuir* 25, 3861-3866 (2009)
- Lentz 1994: B.R. Lentz, “*Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events*”, *Chem Phys Lipids* 73(1-2), 91-106 (1994)
- Leong et al. 2009: T. G. Leong, C. L. Randall, B. R. Benson, N. Bassik, G. M. Sterna, D. H. Gracias “*Tetherless thermobiochemically actuated microgrippers*”, *PNAS* 106, 703-708 (2009)
- Li et al. 2004: P.C. H. Li, L. de Camprieu, J. Caia, M. Sangar, “*Transport, retention and fluorescent measurement of single biological cells studied in microfluidic chips*”, *Lab Chip* 4, 174-180 (2004)
- Li et al. 2011: X.J. Li, Y. Chen, P.C. H. Li, “*A simple and fast microfluidic approach of same-single-cell analysis (SASCA) for the study of multidrug resistance modulation in cancer cells*”, *Lab Chip* 11, 1378-1384 (2011)
- Lide 1994: D.R. Lide, “*Handbook of Chemistry and Physics*”, 74th edn (London: CRC), 1994

- Ling et Lian 2007: Z. Ling, K. Lian, “*In situ fabrication of SU-8 movable parts by using PAG-diluted SU8 as the sacrificial layer*”, *Microsyst Technol* 13, 253-257 (2007)
- Mahaworasilpa et al. 1996: T.L. Mahaworasilpa, H.G.L. Coster, E.P. George, “*Forces on biological cells due to applied alternating (AC) electric fields.II. Electro-rotation*”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1281 (1), 5-14 (1996)
- Maillard 1912: L.C. Maillard, “*Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodique*”, *C R Hebd. Séances Acad. Sci.* 154, 66-68 (1912)
- Markin et al. 1984: V.S. Markin, M. M. Kozlov, V.L. Borovjagin, “*On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism*”, *Gen Physiol Biophys* 3(5), 361-77 (1984)
- Marten et al. 2003: A. Märten, S. Renoth, T. Heinicke, P. Albers, A. Pauli, U. Mey, R. Caspari, D. Flieger, P. Hanfland, A. von Ruecker, A.M. Eis-Hübinger, S. Müller, I. Schwaner, U. Lohmann, G. Heylmann, T. Sauerbruch, I.G.H. Schmidt-Wolf, “*Allogeneic Dendritic Cells Fused with Tumor Cells: Preclinical Results and Outcome of a Clinical Phase I/II Trial in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma*”, *Hum Gene Ther.* 20(14), 483-94 (2003)
- Masuda et al. 1989: S. Masuda, M. Washizu, T. Nanba, “*Novel method of cell fusion in field constriction area in fluid integration circuit*”, *IEEE Trans. Ind. Appl.* 25, 732–737 (1989)
- Mauroy 2010: C. Mauroy, “*Fusion d’auto-assemblages lipidiques*”, thèse de Doctorat soutenue le 13 Décembre 2010.
- Metz et al. 2004: S. Metz, S. Jiguet, A. Bertsch, P. Renaud, “*Polyimide and SU-8 microfluidic devices manufactured by heat-depolymerizable sacrificial material technique*”, *Lab on a Chip* 4 (2), 114-120 (2004)
- Microchem 2013 : <http://microchem.com/>, site internet visité le 28/09/2013
- Mir et al. 1988 : L.M. Mir, H. Banoun, C. Paoletti, “*Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol*”, *Exp. Cell Res.* 175, 15–25 (1988)
- Mir et al. 1991a: L.M. Mir, M. Belehradec, C. Domenge, S. Orłowski, B. Poddevin, J.Jr. Belehradec G. Schwaab, B. Luboinski, C. Paoletti, “*Electrochemotherapy, a new antitumor treatment : first clinical trial*”, *C.R. Acad. Sci.* III 313, 613–618 (1991)
- Mir et al. 1991b: L.M. Mir, S. Orłowski, J.Jr. Belehradec, C. Paoletti, “*Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses*”, *Eur. J. Cancer* 27, 68–72 (1991)
- Mir et al. 2005: L.M. Mir, P.H. Moller, F. Andre, J. Gehl, “*Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues*”, *Adv. Genet.* 54, 83–114 (2005)
- Mir et al. 2006: L.M. Mir, J. Gehl, G. Sersa, C.G. Collins, J.R. Garbay, V. Billard, P.F. Geertsens, Z. Rudolf, G.C. O’Sullivan, M. Marty, “*Standard operating procedures of the electrochemotherapy : Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the cliniporator by means of invasive or non-invasive electrodes*”, *Eur. J. Cancer (Suppl.)* 4, 14–25 (2006)
- Mir 2009: L.M. Mir, *Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenotherapy) : past, current, and future*, *Mol. Biotechnol.* 43,167–176 (2009)
- Moisescu et al. 2012 : Mihaela G. Moisescu, Mihai Radu, Eugenia Kovacs, Lluís M. Mir, Tudor Savopol, “*Changes of cell electrical parameters induced by electroporation : A dielectrophoresis study*”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1828, 365–372 (2013)
- Moncada-Hernandez et al. 2011: H. Moncada-Hernandez, J.L. Baylon-Cardiel, V.H. Perez-Gonzalez, B.H. Lapizco-Encinas, *Electrophoresis*, 32 (18), 2502-2511 (2011)

- Morgan et al. 1999: H. Morgan, M.P. Hughes, N.G. Green, “Separation of Submicron Bioparticles by Dielectrophoresis”, *Biophys.J.* 77(1), 516–525 (1999)
- Morgan et Green 2003: H. Morgan, N.G. Green, “AC Electrokinetics: Colloids and Nanoparticles”. Research Studies Press Ltd., Baldock (2003)
- Mottet 2009: G. Mottet, “*Conception et réalisation d’un bio-microsystème basé sur la diélectrophorèse et l’électrofusion en vue de l’immunothérapie du cancer*”, these de Doctorat soutenue en Septembre 2009
- Mottet et al. 2010: G. Mottet, J. Villemejeane, L.M. Mir, B. Le Pioufle, “A technique to design complex 3D lab on a chip involving multilayered fluidics, embedded thick electrodes and hard packaging—application to dielectrophoresis and electroporation of cells”, *J. Micromech.Microeng.* 20 (4), 047001 (11 pp), (2010)
- Mottet et al. 2012: G. Mottet, B. Le Pioufle, L. M. Mir, “High-resolution analyses of cell fusion dynamics in a biochip”, *Electrophoresis* 33(16), 2508-2515 (2012)
- Muller et al. 2001: K.J. Müller, V.L. Sukhorukov et U. Zimmermann, “Reversible Electropermeabilization of Mammalian Cells by High-Intensity, Ultra-Short Pulses of Submicrosecond Duration”, *The Journal of Membrane Biology* 184 (2), 161-170 (2001)
- Murillo et al. 2010: G. Murillo, Z. J. Davis, S. Keller, G. Abadal, J. Agusti, A. Cagliani, N. Noeth, A. Boisen, N. Barniol, “Novel SU-8 based vacuum wafer-level packaging for MEMS devices”, *Microelectronic Engineering* 87 (5–8), 1173–1176 (2010) (The 35th International Conference on Micro- and Nano-Engineering (MNE))
- Neumann et al. 1972: E. Neumann, K. Rosenheck, “Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes”, *J. Membr. Biol.* 10, 279–290 (1972)
- Neumann et al. 1992: E. Neumann, A. Sprafke, E. Boldt, H. Wolf, “Biophysical considerations of membrane electroporation - Guide to electroporation and electrofusion”, Academic Press: New York pp: 77-90 (1992)
- Oh et al. 2009: J. Oh, R. Hart, J. Capurro, H. Noh, “Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform AC electric fields in a microchannel”, *Lab Chip* 9, 62–78 (2009)
- Oh et al. 2012: K.W. Oh, K. Lee, B. Ahna, E. P. Furlani, “Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy”, *Lab Chip* 12, 515-545 (2012)
- Orlowski et al. 1988: S. Orlowski, J.J. Belehradek, C. Paoletti, L.M. Mir, “Transient electropermeabilization of cells in culture, increase of the cytotoxicity of anticancer drugs”, *Biochemical Pharmacology* 37(24), 4727–4733 (1988)
- Ozil et al. 1986: J-P. Ozil, J.A. Modlinski, “Effects of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos”, *J. Embryol. Exp. Morph.* 96, 211-228 (1986)
- Parkhurst et al. 2003: M. R. Parkhurst, C. DePan, J. P. Riley, S. A. Rosenberg, S. Shu, “Hybrids of Dendritic Cells and Tumor Cells Generated by Electrofusion Simultaneously Present Immunodominant Epitopes from Multiple Human Tumor-Associated Antigens in the Context of MHC Class I and Class II Molecules”, *The Journal of Immunology* 170 (10), 5317-5325 (2003)
- Patel et al. 2012: S. Patel, D. Showers, P. Vedantam, T.-R. Tzeng, S. Qian, X. Xuan, “Microfluidic separation of live and dead yeast cells using reservoir-based dielectrophoresis”, *Biomicrofluidics* 6, 034102 (pp 12) (2012)
- Pauly et Schwan 1959: H. Pauly, H. P. Schwan, “Über die impedanz einer suspension von kugelformigen teilchen mit einer schale”, *Z. Naturforsch. B : Anorg. Chem., Org. Chem.* 14, 125–131 (1959)
- Pesty 2013: [http://www.lps.u-psud.fr/Utilisateurs/pesty/PDF/ymj02\\_chI.pdf](http://www.lps.u-psud.fr/Utilisateurs/pesty/PDF/ymj02_chI.pdf), visitée le 28/09/2013
- Pethig et al. 2003: R. Pethig, M.S. Talary, R.S. Lee, “Enhancing traveling-wave dielectrophoresis with signal superposition”, *IEEE Eng.Med.Biol.Mag.* 22 (6), 43–50 (2003)

- Pethig 2010: R. Pethig, “Review Article—Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications”, *Biomicrofluidics* 4, 022811 (pp 35) (2010)
- Pohl 1958: H. A. Pohl, “Some Effects of Nonuniform Fields on Dielectrics”, *Journal of Applied Physics* 29 (8), 1182-1188 (1958)
- Poignard et al. 2010: C. Poignard, A. Silve, F. Campion, L. M. Mir, O. Saut, L. Schwartz, “Ion flux, transmembrane potential, and osmotic stabilization: A new electrophysiological dynamic model for Eukaryotic cells”, *European Biophysics Journal: EBJ* 40 (3), 235-246, (2011)
- Potter 1988: H. Potter, “Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation”, *Anal. Biochem.* 174 (2), 361–373 (1988)
- Prabhakar et al. 2010: Amit Prabhakar, Soumyo Mukherji, “A novel C-shaped, gold nanoparticle coated, embedded polymer waveguide for localized surface plasmon resonance based detection”, *Lab Chip*, 10, 3422–3425 (2010)
- Pucihar et al. 2001: G. Pucihar, T. Kotnik, M. Kandušer, D. Miklavčič, “The influence of medium conductivity on electroporation and survival of cells in vitro”, *Bioelectrochemistry* 54 (2), 107–115 (2001)
- Pucihar et al. 2002: G. Pucihar, L.M. Mir, D. Miklavcic, “The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electroporated cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy”, *Bioelectrochemistry* 57, 167–172 (2002)
- Pucihar et al. 2008: G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavcic, J. Teissié, “Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporated cells”, *Biophys. J.* 95, 2837–2848 (2008).
- Quake 2000: M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer et S. R. Quake, “Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography”, *Science* 288, 113-116 (2000)
- Quake 2001: T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold et S. R. Quake, “Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device”, *Phys. Rev. Lett.* 86, 4163-4166 (2001)
- Quemper et al. 2000: J.M. Quemper, E. Dufour-Gergam, N. Frantz-Rodriguez, J.P. Gilles, J.P. Grandchamp, A. Bosseboeuf, “Effects of direct and pulse current on copper electrodeposition through photoresist molds”, *J. Micromech. Microeng.* 10, 116–119 (2000)
- Ramadan et al. 2006: Q. Ramadan, V. Samper, D. Poenar, Z. Liang, C. Yu, T.M. Lim, “Simultaneous cell lysis and bead trapping in a continuous flow microfluidic device”, *Sens.Actuators B* 113 (2), 944–955 (2006)
- Ramos et al. 1998: A. Ramos, H. Morgan, N.G. Green, A. Castellanos, “AC electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures”, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 31, 2338–2353 (1998)
- Ramos et al. 1999: A. Ramos, H. Morgan, N.G. Green, A. Castellanos, “AC Electric-Field-Induced Fluid Flow in Microelectrodes”, *Journal of Colloid and Interface Science* 217 (2), 420–422 (1999)
- Ramos 2000: C. Ramos, “Etude des mécanismes de fusion cellulaire : approche biophysique par electropulsation”, thèse de Doctorat soutenue en 2000
- Raoux et al. 2011: M. Raoux, G. Bontorin, Y. Bornat, J. Lang, S. Renaud, “Bioelectronic Sensing of Insulin Demand”, Chapitre 11 de “Biohybrid Systems: Nerves, Interfaces, and Machines”, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, (2011)
- Regtmeier et al. 2007: J. Regtmeier, T.T. Duong, R. Eichhorn, D. Anselmetti, A. Ros, “Dielectrophoretic Manipulation of DNA: Separation and Polarizability”, *Anal. Chem.* 79 (10), 3925–3932 (2007)
- Riske et Dimova 2006: Karin A. Riske and Rumiana Dimova, “Electric Pulses Induce Cylindrical Deformations on Giant Vesicles in Salt Solutions”, *Biophysical Journal* Volume 91, 1778–1786 (2006)

- Riske et al. 2006: Karin A. Riske, Natalya Bezlyepkina, Reinhard Lipowsky and Rumian Dimova, “*Electrofusion of model lipid membranes viewed with high temporal resolution*”, *Biophysical Reviews and Letters*, 1 (4), 387–400 (2006)
- Rols et Teissié 1990: M-P. Rols, J. Teissie, “*Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure*”, *Biochemistry* 29, 4561–4567 (1990)
- Rols et al. 1998: M-P. Rols, C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros, J. Teissié, “*In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma*”, *Nat. Biotechnol.* 16, 168–171 (1998)
- Sale et al. 1968: A.J. Sale, W.A., Hamilton, “*Effects of high electric fields on micro-organisms. 3. lysis of erythrocytes and protoplasts*”, *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 37–43 (1968)
- Salomon 2011: S. Salomon, “*Manipulation de microparticules exploitant la force de diélectrophorèse: applications dédiées au tri d’espèces biologiques et à l’assemblage de nano objets*”, thèse de Doctorat soutenue le 30 Novembre 2011
- Salomon et al. 2011: S. Salomon, T. Leichlé, L. Nicu, “*A dielectrophoretic continuous flow sorter using integrated microelectrodes coupled to a channel constriction*”, *Electrophoresis* 32, 1508–1514 (2011)
- Salomon et al. 2012: S Salomon, T Leichlé, D Dezest, F Seichepine, S Guillon, C Thibault, C Vieu, L Nicu, “*Arrays of nanoelectromechanical biosensors functionalized by microcontact printing*”, *Nanotechnology* 23, 495501 (8pp), (2012)
- Schaper, 2007: J. Schaper, “*Development of a Technology for Arranged Electrofusion of Mammalian Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy*”, thèse de Doctorat soutenue en Juillet 2007.
- Schaumacher et al. 2008: J T Schumacher, A Grodrian, C Kremin, M Hoffmann, J Metze, “*Hydrophobic coating of microfluidic chips structured by SU-8 polymer for segmented flow operation*”, *J. Micromech. Microeng.* 18, 055019 (6pp) (2008)
- Schoenbach et al. 2001: K.H. Schoenbach, S.J. Beebe, E.S. Buescher, “*Intracellular effect of ultrashort electrical pulses*”, *Bioelectromagnetics* 22, 440–448 (2001)
- Schoenbach et al. 2007: K.H. Schoenbach, “*Bioelectric effects of intense nanosecond pulses*”, *IEEE Trans. Dielectrics and Electrical Insulation* 14, 1088 (2007)
- Schwan 1957: H.P. Schwan, “*Electrical properties of tissue and cell suspensions*”, *Adv. Biol. Med. Phys.* 5, 147-209 (1957)
- Schwarzenberger et al. 2011: T. Schwarzenberger, P. Wolf, M. Brischwein, R. Kleinhans, F. Demmel, A. Lechner, B. Becker, B. Wolf, “*Impedance sensor technology for cell-based assays in the framework of a high-content screening system*”, *Physiol. Meas.* 32, 977–993 (2011)
- Seger 2006: U. Seger, “*Electrical cell manipulation in microfluidic systems*”, these de Doctorat soutenue le 7 septembre 2006
- Seichepine et al. 2012: F. Seichepine, S. Salomon, M. Collet, S. Guillon, L. Nicu, G. Larrieu, E. Flahaut, C. Vieu, “*A combination of capillary and dielectrophoresis-driven assembly methods for wafer scale integration of carbon-nanotube-based nanocarpet*”, *Nanotechnology* 23, 095303 (7pp), (2012)
- Sharpe 1963: L. H. Sharpe, H. Schonhorn, “*Theory gives direction to adhesion work*”, *Chemical and Engineering News*, vol. 41 (15), 67-68 (1963)
- Shim et al. 2013: S. Shim, K. Stemke-Hale, A. M. Tsimberidou, J. Noshari, T. E. Anderson, P. R. Gascoyne, “*Dielectrophoresis has broad applicability to marker-free isolation of tumor cells from blood by microfluidic systems*”, *Biomicrofluidics* 7, 011807 (pp 12) (2013)

- Siders et al. 2003 : W. M. Siders, K. L. Vergilis, C. Johnson, J. Shields, J. M. Kaplan, “*Induction of Specific Antitumor Immunity in the Mouse with the Electrofusion Product of Tumor Cells and Dendritic Cells*”, *Molecular Therapy* 7 (4), 498-505 (2003)
- Silve 2011 : A. Silve, “*Nouveaux dispositifs pour l’application contrôlée d’impulsions électriques nanosecondes et pour la détection de leurs effets sur les cellules. Nouveaux résultats et hypothèses sur les paramètres contrôlant l’électroperméabilisation des cellules biologiques*”, thèse de Doctorat soutenue le 23 Novembre 2011.
- Silve et al. 2011b: A. Silve, I. Leray, R. Vezinet et L. M. Mir, “*Control of current intensity: experimental proofs of the relevance of the current density in biological cells permeabilisation caused by nanosecond electric pulses*”, 18th IEEE International Pulsed Power Conference, Chicago, Illinois, USA, 19th-23rd June, 2011.
- Sigurdson et al. 2005: M. Sigurdson, D. Wang, C.D. Meinhart, “*Electrothermal stirring for heterogeneous immunoassays*”, *Lab Chip* 5, 1366–1373 (2005)
- Skelley et al. 2009: A.M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch, J. Voldman, “*Microfluidic control of cell pairing and fusion*”, *Nature Methods* 6 (2), 147-152 (2009)
- Sowers 1986: A.E. Sowers, “*A long-lived fusogenic state is induced in erythrocyte ghosts by electric pulses*”, *J. Cell Biol.* 102 (1986) 1358–1362
- Squires et al. 2004: T. M. Squires, M. Z. Bazant, “*Induced-charge electro-osmosis*”, *J. Fluid Mech.* 509, 217–252 (2004)
- Stratton 1941: J.A. Stratton, “*Electromagnetic Theory*”, New York: McGraw Hill, 1941
- Sukhorukov et al. 1998: V.L. Sukhorukov, H. Mussauer, U. Zimmermann, “*The Effect of Electrical Deformation Forces on the Electropermeabilization of Erythrocyte Membranes in Low- and High-Conductivity Media*”, *J. Membr. Biol.* 163, 235-245 (1998)
- Sukhorukov et al. 2006: V. L. Sukhorukov, R. Reuss, J.M. Endter, S. Fehrmann, A. Katsen-Globa, P. Geßner, A. Steinbach, K. J. Muller, A. Karpas, U. Zimmermann, H. Zimmermann, “*A biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346, 829–839 (2006)
- Sunkara et al. 2011: V. Sunkara, D-K. Park, H. Hwang, R. Chantiwas, S.A. Soperac, Y-K. Cho, “*Simple room temperature bonding of thermoplastics and poly(dimethylsiloxane)*”, *Lab Chip* 11, 962–965 (2011)
- Tabeling 2003: P. Tabeling, “*Introduction à la microfluidique (Collection échelles)*”, Paris, France: Editions Belin (2003).
- Tabeling 2005: P. Tabeling, “*Introduction to microfluidics*”, Oxford University Press (2005)
- Tabeling 2013: P. Tabeling, “*La microfluidique : une révolution ? Des révolutions ?*”, < <http://www.paristechreview.com/2013/06/18/microfluidique-revolution/> >, visitée le 27 Août 2013
- Talaei et al. 2009: S. Talaei, O. Frey, P. D. Van Der Wal, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, “*Hybrid microfluidic cartridge formed by irreversible bonding of SU8 and PDMS for multilayer flow applications*”, *Procedia Chemistry* 1, 381–384 (2009), Proceedings of the Eurosensors XXIII conference
- Tanaka et al. 2002: H. Tanaka, K. Shimizu, T. Hayashi, S. Shu, “*Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells*”, *Cellular Immunology* 220 (1), 1-12 (2002)
- Tarek et al. 2005: M. Tarek, “*Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation*”, *Biophys J* 88, 4015–4053 (2005)
- Taketo 1988: A. Taketo, “*DNA transfection of Escherichia coli by electroporation*”, *Biochim. Biophys. Acta.* 31, 318–324 (1988)

- Techaumnat et al. 2007: B. Techaumnat, M. Washizu, “*Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells*”, J. Phys. D: Appl. Phys. 40, 1831–1837 (2007)
- Techaumnat et al. 2008 : B. Techaumnat, K. Tsuda, O. Kurosawa, G. Murat, H. Oana, M. Washizu, “*High-yield electrofusion of biological cells based on field tailoring by microfabricated structures*”, IET Nanobiotechnol. 2, 93–99 (2008)
- Teissié et al. 1986: J. Teissie, M.P. Rols, “*Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electropermeabilization*”, Biochem. Biophys. Res. Commun. 140, 258–266 (1986)
- Teissié et al. 1993: Justin Teissie and Marie-Pierre Rols, “*An Experimental Evaluation of the Critical Potential Difference Inducing Cell Membrane Electropermeabilization*”, Biophysical Journal 65, 409–413 (1993)
- Teissié et Rols 1994: Justin Teissie and Marie-Pierre Rols, “*Manipulation of Cell Cytoskeleton Affects the Lifetime of Cell Membrane Electropermeabilization*”, Annals of the New York Academy of Sciences 720, 98–110 (1994)
- Teissié et Ramos 1998: J. Teissie´ and C. Ramos, “*Correlation between Electric Field Pulse Induced Long-Lived Permeabilization and Fusogenicity in Cell Membranes*”, Biophysical Journal 74, 1889–1898 (1998)
- Teissié et al. 2005: J. Teissie, M. Golzio, M.P. Rols, “*Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge*”, Biochimica et Biophysica Acta 1724, 270–280 (2005)
- Tekle et al. 1991: E. Tekle, R.D. Astumian, P.B. Chock, “*Electroporation by using bipolar oscillating electric field: An improved method for DNA transfection of NIH 3T3 cells*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4230–4234 (1991)
- Tixier-Mita et al. 2003: A. Tixier-Mita, Y. Mita, and H. Fujita, “*A simple, robust and controllable nano-structures fabrication technique using standard silicon wafers*”, in TRANSDUCERS – Solid State Sensors, Actuators and Microsystems, 12th International Conference (Volume 1), 250–253 (2003) Boston
- Trainito 2012: C. Trainito, “*Determination of electro-physiological properties of cells by using rotating electric field*”, Rapport de stage de Master, Juillet 2012
- Trefzer et al. 2005: U. Trefzer, G. Herberth, K. Wohlan, A. Milling, M. Thiemann, T. Sharav, K. Sparbier, W. Sterry, P. Walden, “*Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results*”, Vaccine 23 (17–18), 2367–2373 (2005)
- Tresset et al. 2004: G. Tresset, S. Takeuchi, “*A microfluidic device for electrofusion of biological vesicles*”, Biomedical Microdevices 6, 213–218 (2004)
- Trevor et al. 2004: K.T. Trevor, C. Cover, Y.W. Ruiz, E.T. Akporiaye, E.M. Hersh, D. Landais, R.R. Taylor, A.D. King, R.E. Walters, “*Generation of dendritic cell– tumor cell hybrids by électrofusion for clinical vaccine application*”, Cancer Immunol Immunother 53(8), 705–714 (2004)
- Tuomikoski 2005: S. Tuomikoski, S. Franssila, “*Free-standing SU-8 microfluidic chips by adhesive bonding and release etching*”, Sensors and Actuators A 120, 408–415 (2005)
- Ulman 1996: A. Ulman, “*Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers*”, Chem. Rev. 96, 1533–1554 (1996)
- Usaj et al. 2010: Marko Usaj, Katja Trontelj, Damijan Miklavcic, Masa Kanduser, “*Cell–Cell Electrofusion: Optimization of Electric Field Amplitude and Hypotonic Treatment for Mouse Melanoma (B16-F1) and Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells*”, J Membrane Biol 236, 107–116 (2010)
- Usaj et al 2012: Marko Usaj, Masa Kanduser “*The Systematic Study of the Electroporation and Electrofusion of B16-F1 and CHO Cells in Isotonic and Hypotonic Buffer*”, J Membrane Biol 245, 583–590 (2012)
- Usaj et al 2013: Marko Usaj, Karel Flisar, Damijan Miklavcic, Masa Kanduser, “*Electrofusion of B16-F1 and CHO cells: The comparison of the pulse first and contact first protocols*”, Bioelectrochemistry 89, 34–41 (2013)



- Velugotla et al. 2012 : S. Velugotla, S. Pells, H. K. Mjoseng, C. R. E. Duffy, S. Smith, P. De Sousa, R. Pethig, “*Dielectrophoresis based discrimination of human embryonic stem cells from differentiating derivatives*”, *Biomicrofluidics* 6, 044113 (pp 12), (2012)
- Vernier et al. 2006: P.T. Vernier, Y. Sun, M.A. Gundersen, “*Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization*”, *BMC Cell Biol.* 7, 37 (2006)
- Vernier et al. 2007: P.T. Vernier, M.J. Ziegler, “*Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers*”, *J. Phys. Chem. B.* 111, 12993–12996 (2007)
- Vernier et al. 2010: Z.A. Levine, P.T. Vernier, “*Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation*”, *The Journal of Membrane Biology* 236(1), 27–36 (2010)
- Vézy et al. 2011: C. Vézy, N. Haddour, N.M. Dempsey, F. Dumas-Bouchiat, M. Frénéa-Robin, “*Simple method for reversible bonding of a polydimethylsiloxane microchannel to a variety of substrates*”, *Micro & Nano Letters* 6 (10), 871–873 (2011)
- Villemejeane, these 2010: Julien Villemejeane, “*Etude des effets d’impulsions électriques ultra-courtes sur des cellules vivantes*”, thèse de Doctorat soutenue le 07 Juillet 2010
- Walther et al. 2009: F. Walther, T. Drobek, A.M. Gigler, M. Hennemeyer, M. Kaiser, H. Herberg, T. Shimitsu, G. E. Morfill, R. W. Stark, “*Surface hydrophilization of SU-8 by plasma and wet chemical processes*”, *Surf. Interface Anal.* 42, 1735–1744 (2010)
- Wang et Lu 2006: J.Wang, C. Lu, “*Microfluidic cell fusion under continuous direct current voltage*”, *Applied Physics Letters* 89, 234102 (3 pp), (2006)
- Wang et al 2009: M-H.Wang, L-S. Jang, “*A systematic investigation into the electrical properties of single HeLa cells via impedance measurements and COMSOL simulations*”, *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2830–2835 (2009)
- Washizu et al. 2007: M. Washizu, B. Techaumnat, “*Cell membrane voltage during electrical cell fusion calculated by re-expansion method*”, *J. of electrostatics* 65, 555-561 (2007)
- Wei et al. 2007 : Y.C. Wei, R.P. Sticca, J. Li, L.M. Holmes, K.E. Burgin, S. Jakubchak, H. Bouton-Verville, J. Williamson, K. Meyer, L. Evans, J. Martin, J.J. Stephenson, S. Trocha, S. Smith, T. Wagner, “*Combined treatment of dendritoma vaccine and low-dose interleukin-2 in stage IV renal cell carcinoma patients induced clinical response: A pilot study*”, *Oncology Reports* 18(3) (2007)
- Whitesides et al. 1983: G. M. Whitesides, R. J. Kazlauskas, and L. Josephson, “*Magnetic separation in biotechnology*”, *Trends in Biotechnology* 1, 144-148 (1983)
- Whitesides et al. 1996: D. Qin, Y. Xia, G.M. Whiteside, “*Rapid Prototyping of Complex Structures with Feature Sizes Larger Than 20 μm*”, *Adv. Mater.* 8 (11), 917- 919 (1996)
- Whitesides et al. 1998: D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, “*Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)*”, *Anal. Chem.* 70 (23), 4974-4984 (1998)
- Whitesides et al. 2000: J.R. Anderson, D.T. Chiu, R.J. Jackman, O. Cherniavskaya, J. C. McDonald, H. Wu, S.H. Whitesides, G.M. Whitesides, “*Fabrication of Topologically Complex Three-Dimensional Microfluidic Systems in PDMS by Rapid Prototyping*”, *Anal. Chem.* 72 (14), 3158-3164 (2000)
- Whitesides et al. 2002: J. C. McDonald, G.M. Whitesides, “*Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices*”, *Accounts of Chemical Research* 35 (7), 491-499 (2002)
- Wilmut et al. 1997: I. Wilmut, A.E. Schnieke, J. Mcwhir, A.J. Kind, K.H.S Campbell, “*Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*”, *Nature* 385, 810 – 813 (1997)

- Woytasik et al. 2006: M. Woytasik, J.P. Grandchamp, E. Dufour-Gergam, E. Marincic, J.P. Gilles, S. Megherbi, V. Lavalley, V. Mathet, “*Fabrication of planar and three-dimensional microcoils on flexible substrates*”, *Microsyst. Technol.* 12, 973–978 (2006)
- Wu et al. 2008: L.Y. Wu, D. Di Carlo, L. P. Lee, “*Microfluidic self-assembly of tumor spheroids for anticancer drug discovery*”, *Biomed Microdevices* 10, 197–202 (2008)
- Wu et al. 1992: Y. Wu, J.G. Montes, R.A. Sjodin, “*Determination of electric field threshold for electrofusion of erythrocyte ghosts. Comparison of pulse-first and contact-first protocols*”, *Biophys. J.* 61, 810–815 (1992)
- Yalcin et al. 2011: S. E. Yalcin, A. Sharma, S. Qian, S. W. Joo, O. Baysal, “*On-demand particle enrichment in a microfluidic channel by a locally controlled floating electrode*”, *Sens. Actuators B* 153(1), 277–283 (2011)
- Yang et al. 1999: J. Yang, Y. Huang, X. Wang, X-B. Wang, F. F. Becker, P. R. C. Gascoyne, “*Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by Electrorotation as a Cell Separation Criterion*”, *Biophysical Journal*, 76, 3307–3314 (1999)
- Yang et al. 2009: C. Yang, W. Wang, Z. Li, “*Optimization of corona-triggered PDMS-PDMS bonding method*”, 4th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS), Shenzhen, China, 5-8 January 2009, pp. 319
- Yasuda et al. 2007: T. Yasuda, T. Kamigaki, K. Kawasaki, T. Nakamura, M. Yamamoto, K. Kanemitsu, S. Takase, D. Kuroda, Y. Kim, T. Ajiki, Y. Kuroda, “*Superior anti-tumor protection and therapeutic efficacy of vaccination with allogeneic and semiallogeneic dendritic cell/tumor cell fusion hybrids for murine colon adenocarcinoma*”, *Cancer Immunology, Immunotherapy* Volume 56 (7), 1025-1036 (2007)
- Yeh et Zhang 2012 : P.Y. Yeh, Z. Zhang, M. Lin, X. Cao, “*Nonfouling Hydrophilic Poly(ethylene glycol) Engraftment Strategy for PDMS/SU-8 Heterogeneous Microfluidic Devices*”, *Langmuir* 28 (46), 16227–16236 (2012)
- Yong et al. 1999: Yongcheng Song, Jagadese J Vittal, Nalini Srinivasan, Soh-Ha Chan, Pak-Hing Leung, “*Synthesis and anti-cancer activities of a pair of enantiomeric gold(I) complexes containing sulfanyl-substituted P-stereogenic phosphines*”, *Tetrahedron: Asymmetry*, Volume 10, (8), 23 April 1999, pp 1433–1436
- Zahn 1979: M. Zahn, “*Electromagnetic Field Theory : A Problem Solving Approach*”, John Wiley & Sons Inc, New York, 746 pages, 1979
- Zhang Y. et al. 2009: Yu Zhang, Hao Yu, Jianhua Qin, Bingcheng Lin, “*A microfluidic DNA computing processor for gene expression analysis and gene drug synthesis*”, *Biomicrofluidics* 3 (4), 044105 (8 pp), (2009)
- Zhang et al. 2009: Z. Zhang, The fabrication of polymer microfluidic devices using a solid to solid interfacial polyaddition, *Polymer* 2009
- Zhang et al. 2011: Z. Zhang, P. Zhao, G. Xiao, B. R. Watts, C. Xu, “*Sealing SU8 microfluidic channels using PDMS*”, *Biomicrofluidics* 5, 04650 (8 pp), (2011)
- Zhu et al. 2001: H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, “*Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips*”, *SCIENCE* 293, 2101-2105 (2001)
- Zimmermann et al. 1974: U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann, “*Dielectric breakdown of cell membranes*”, *Biophys. J.*, 14 :881–899 (1974).
- Zimmermann et al. 1982: U. Zimmermann, J. Vienken, “*Electric field-induced cell-to-cell fusion*”, *The Journal of Membrane Biology* 67 (1), 165-182 (1982)



## *Communications scientifiques :*

### **Articles de revue internationale (2)**

F.S. Hamdi, O. Français, F. Subra, W. Wang, M. Woytasik, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Study of the transmembrane potential distribution of cell pairs in a microfluidic device using polymer obstacles to initiate electrofusion*”, **The Eur. Phys. J. Appl. Phys** 62(1), 11202 (10 pages) (2013), Doi:10.1051/epjap/2013120392.

F. S. Hamdi, O. Français, F. Subra, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Microarray of non-connected gold pads used as high density electric traps for parallelized pairing and fusion of cells*”, **Biomicrofluidics** 7, 044101 (14 pages) (2013), Doi: 10.1063/1.4813062

### **Communications avec acte (6)**

N. Pham Van, F. Hamdi, G. Mottet, J. Villemejeane, M. Woytasik, E. Martincic, E. Dufour-Gergam, O. Français, L.M. Mir, B. Le Pioufle, “*A high density microfluidic device for cell pairing and electrofusion*”, **Euroensors XXIV conference**, Linz, Autriche, du 05 au 08 septembre 2010; in *Procedia Engineering*, vol. 5, p. 49, 4 pages, 2010

F. Hamdi, O. Français, J. Villemejeane, M. Woytasik, C. Dalmay, L.M. Mir, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*A microfluidic biochip dedicated to highly parallelized electrofusion*”, **Microtechnologies for Medicine and Biology**, Lucerne, Suisse, du 04 au 06 mai 2011 ; in *Proceeding de Microtechnologies in Medicine and Biology Switzerland*, vol. 1, W2P2, 2 pages, 2011 [*Présentation d'un poster*]

F. S. Hamdi, O. Français, M. Woytasik, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Self control of cell electroporation by dielectrophoresis transistion*”, **NanoBioTech**, Montreux, Suisse, du 14 au 16 novembre 2011 [*Présentation d'un poster*]

F. S. Hamdi, O. Français, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Biodevices for Cell Electroporation*”, **Electroporation Based Technologies and Treatments 2012**, Ljubljana, Slovénie, 18 au 24 Novembre 2012, ISBN: 978-961-243-216-4, PAGE : 124 [*Oral court*]

F.S. Hamdi, W. Wang, F. Subra, E. Dufour-Gergam, O. Français, B. Le Pioufle, “*High Density Cell Electrofusion on Chip Using an Array of Non-Connected Metallic Pads*”, **Biodevices 2013**, Espagne Barcelone, 11 au 14 février 2013, ISBN: 978-989-8565-34-1, Pages: 68-72 [*oral long*]

F. S. Hamdi, O. Français, M. Woytasik, L. M. Mir, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Biopuce microfluidique dédiée à l'électrofusion hautement parallélisée*”, **Journées Nationales du Réseau Doctoral en Micro nanoélectronique (JNRDM)** - 2011, Cachan, France, du 23 au 25 mai 2011, in Proceeding des JNRDM 2011, vol. 1, p. 242, 5 pages, 2011 [*oral long*]

### **Communications sans acte (5)**

M. Ammar, M. Azzouz, M. Couty, M. Deterre, E. Dufour-Gergam, A. Edmond, F. Hamdi, N. Isac, P-Y. Joubert, E. Lefeuvre, E. Martincic, M. Woytasik, “*Microsystèmes pour le Médical*”, Groupe de Recherche en Micro nanosystèmes et Micro nanofluidique (**GdR MNS-MNF**), Marseille, France, du 14 au 15 décembre 2011

F Hamdi, C. Dalmay, O. Français, E. Dufour-Gergam, B. Le Pioufle, “*Microtechnologies applied to the design of new tools for the cell therapies - electrofusion, nanoporation, cell sorting*”, **Japan Society for Promotion of Science France**, Paris, 12 au 13 Décembre 2011 [*Présentation d'un poster*]

F. Hamdi, J. Villemejeane, O. Français et B. Le Pioufle, “*Puce microfluidique pour l'électrofusion cellulaire*”, **Journées CNANO Ile de France**, Paris, 24 au 25 Mars 2011 [*Présentation d'un poster*]

F. S. Hamdi, “*Interaction cellule/champ électrique pulsé: Application à l'électrofusion*”, Séminaire 10ans IDA ENS **Cachan**, France, 22 Mai 2012 [*oral*]

F.S. Hamdi, B. Le Pioufle, E. Dufour-Gergam, O. Français, “*Biochip for cell electrofusion*”, **NANO and MICRO Systems 2012** (poster) Japon, Tokyo, 10 au 14 Septembre 2012 [*Présentation d'un poster*]

## « Interaction champ électrique cellule : Conception de puces microfluidiques pour l'appariement cellulaire et la fusion par champ électrique pulsé »

**Résumé :** La fusion cellulaire est une méthode de génération de cellules hybrides combinant les propriétés spécifiques des cellules mères. Initialement développée pour la production d'anticorps, elle est maintenant aussi investiguée pour l'immunothérapie du cancer. L'électrofusion consiste à produire ces hybrides en utilisant un champ électrique pulsé. Cette technique présente de meilleurs rendements que les fusions chimiques ou virales, sans introduire de contaminant. L'électrofusion est actuellement investiguée en cuve d'électroporation où le champ électrique n'est pas contrôlable avec précision et le placement cellulaire impossible, produisant de faibles rendements binucléaires. Afin d'augmenter le rendement et la qualité de fusion, la capture et l'appariement des cellules s'avèrent alors nécessaires.

Notre objectif a été de développer et de réaliser des biopuces intégrant des microélectrodes et des canaux microfluidiques afin de positionner et d'apparier les cellules avant leur électrofusion. Une première structure de piégeage se basant sur des plots isolants et l'utilisation de la diélectrophorèse a été réalisée. Afin d'effectuer des expérimentations sous flux, une méthode de scellement des canaux, biocompatible et étanche a été développée. Puis, le milieu d'expérimentation a été adapté pour l'électrofusion. En confrontant les résultats des expériences biologiques aux simulations numériques, nous avons pu démontrer que l'application d'impulsions électriques induisait la diminution de la conductivité cytoplasmique. Nous avons ensuite validé la structure par l'électrofusion de cellules. Un rendement de 55% avec une durée de fusion membranaire de 6 s a été obtenu. Dans un second temps, nous avons proposé deux microstructures de piégeage pour l'électrofusion haute densité. La première se base sur un piégeage fluidique, alors que la seconde, utilise la diélectrophorèse sans adressage électrique à l'aide de plots conducteurs. Jusqu'à 75% des cellules fusionnent dans cette dernière structure. Plus de 97% des hybridomes produits sont binucléaires. Le piégeage étant réversible, les hybridomes peuvent ensuite être collectés pour des études ultérieures.

**Mots-clefs :** *Laboratoire sur puce/Biopuce, microfluidique, électrofusion, électroperméabilisation, packaging, diélectrophorèse.*

---

## « Electric field-cell interaction: Conception of microfluidic biochips for cell pairing and fusion by electric field pulses »

**Abstract :** Cell fusion is a method to generate a hybrid cell combining the specific properties of its progenitor cells. Initially developed for antibody production, it is now also investigated for cancer immunotherapy. Electrofusion consists on the production of hybridoma using electric pulses. Compared to viral or chemical methods, electrofusion shows higher yields and this system is contaminant free. Actually, electrofusion is investigated in electroporation cuvettes, where the electric field is not precisely controllable and cell placement impossible, resulting in low binuclear hybridoma yields. To improve the fusion quality and yield, cell capture and pairing are necessary.

Our objective was the development and realization of biochips involving microelectrodes and microfluidic channels to place and pair cells prior to electrofusion. A first trapping structure based on insulators and the use of dielectrophoresis has been achieved. In order to perform fluidic experiments, a biocompatible irreversible packaging was developed. Then, the experimental medium was optimized for electrofusion. Confronting the biological experiments and the numerical simulations, we showed that the application of electric pulses leads to a decrease of the cytoplasmic conductivity. The microstructure was validated by cell electrofusion. A yield of 55%, with a membrane fusion duration of 6 s has been achieved. Secondly, we proposed two trapping microstructures for high density electrofusions. The first one is based on a fluidic trapping while the second one uses dielectrophoresis, free of electric wiring, thanks to conductive pads. Up to 75% of paired cells were successfully electrofused with the conductive pads. More than 97% of the hybridoma were binuclear. The trapping being reversible, the hybridoma can be collected for further analysis.

**Keywords :** *Lab-On-Chip/Biochip, microfluidics, electrofusion, electropermeabilization, packaging, dielectrophoresis.*