



Développement de microsystèmes utilisant des champs électriques pour la création et la caractérisation d'agrégats de cellules

Jonathan Cottet, Olivier Fabrègue, Julien Marchalot, Riccardo Scorretti, François Buret, Marie Frénéa-Robin, Philippe Renaud

► To cite this version:

Jonathan Cottet, Olivier Fabrègue, Julien Marchalot, Riccardo Scorretti, François Buret, et al.. Développement de microsystèmes utilisant des champs électriques pour la création et la caractérisation d'agrégats de cellules. Symposium de Génie Electrique (SGE'18), Université de Lorraine [UL], Jul 2018, Nancy, France. <hal-02983064>

HAL Id: hal-02983064

<https://hal.science/hal-02983064v1>

Submitted on 29 Oct 2020

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

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



HAL Authorization

Développement de microsystemes utilisant des champs électriques pour la création et la caractérisation d'agrégats de cellules

Jonathan COTTET^{1,2}, Olivier FABREGUE¹, Julien MARCHALOT¹, Riccardo SCORRETTI¹, François BURET¹, Marie FRENEA-ROBIN¹ et Philippe RENAUD²

¹Univ Lyon, Ecole Centrale de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, CNRS, Ampère, F-69130, Ecully, France

²École Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL-STI-IMT-LMIS4, Station 17, CH-1015 Lausanne, Suisse

RESUME - Les agrégats de cellules peuvent avantageusement être employés en guise de modèles intermédiaires entre la cellule unique et le tissu dans le cadre de l'étude multi-échelle du phénomène d'électroporation. De tels assemblages peuvent être obtenus sur puce par diélectrophorèse (DEP) suivant une approche ascendante. Une interface graphique utilisateur a été développée pour faciliter le choix des paramètres expérimentaux. Des simulations multiphysiques ont été réalisées pour déterminer les configurations d'électrodes favorables au piégeage diélectrophorétique des cellules sous flux au sein d'une puce microfluidique. Après fabrication de la puce, des agrégats de cellules HEK (Human Embryonic Kidney) ont pu ainsi être obtenus par diélectrophorèse. Un dispositif expérimental pour la caractérisation électrique des cellules individuelles et des agrégats par spectroscopie d'impédance a également été développé.

Mots-clés—Diélectrophorèse, Spectroscopie d'impédance, Microfluidique, Assemblages cellulaires.

1. INTRODUCTION

L'électrochimiothérapie consiste à utiliser des champs électriques pour faciliter l'entrée de molécules cytotoxiques dans les cellules cancéreuses. Elle se base sur l'électroporation réversible, soit l'application d'une ou plusieurs impulsions de champ électrique induisant une perméabilisation transitoire de la membrane et permettant ainsi l'introduction des agents anticancéreux. Cependant, l'application de cette méthode sur des tissus nécessite de connaître l'influence de la structure des tumeurs (taille, composition) et de leurs propriétés électriques sur les conditions d'électroporation. Dans le but d'améliorer la compréhension de ce phénomène, des agrégats de cellules vont être formés à l'intérieur d'une puce microfluidique par DEP, puis employés comme modèles intermédiaires entre une cellule et un tissu. La spectroscopie d'impédance permettra de caractériser en flux les agrégats ainsi formés. Ceux-ci pourront alors être électroporés puis analysés par impédancemétrie.

2. ETUDE THEORIQUE DES CONDITIONS DE PIEGEAGE DES CELLULES SOUS FLUX

Afin de pouvoir créer des agrégats de cellules sous flux, il est nécessaire de comprendre l'influence des propriétés des cellules ainsi que de leur milieu de suspension sur la réponse diélectrophorétique. La force de DEP apparaît lorsqu'une particule polarisable est soumise à un champ électrique non

uniforme [1, 2]. L'expression moyennée sur le temps de la force (1) s'exerçant sur une particule diélectrique homogène sphérique est donnée ci-après : (les indices p et m faisant respectivement référence à la particule et à son milieu d'immersion) :

$$F_{DEP} = 2\pi r_{ext}^3 \epsilon_m \text{Re}[CM(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

avec $CM(\omega)$ le facteur de Clausius-Mossotti :

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

ϵ^* étant la permittivité complexe:

$$\epsilon_p^* = \epsilon_p \epsilon_0 - \frac{j\sigma_p}{\omega} \quad (3)$$

avec ϵ_0 la permittivité du vide, ϵ_p la permittivité relative de la particule, σ_p la conductivité électrique de la particule et $\omega = 2\pi f$ avec f la fréquence. r_{ext} désigne le rayon extérieur de la particule considérée et E l'intensité du champ électrique.

Le sens de la force de DEP dépend du signe de $\text{Re}[CM(\omega)]$. Pour concentrer les cellules et permettre leur agrégation, deux phénomènes sont exploitables. La diélectrophorèse positive ou pDEP, obtenue quand $\text{Re}[CM(\omega)] > 0$, permet de concentrer les cellules vers les zones de fort champ électrique. Cependant l'agrégation aura lieu dans ce cas le plus souvent près des électrodes ce qui implique que les cellules seront directement au contact des électrodes et donc exposées à une tension élevée. Dans le cas de la diélectrophorèse négative ou nDEP, obtenue quand $\text{Re}[CM(\omega)] < 0$, les cellules sont dirigées à l'opposé du gradient de champ, vers la région d'intensité de champ minimale. Ce phénomène a déjà été appliqué à la fabrication collective d'agrégats de cellules de forme reproductible [3].

La plupart des particules, en particulier les cellules biologiques, ne possèdent cependant pas une composition homogène. Il est alors nécessaire de tenir compte des différentes couches qui les constituent (membrane, cytoplasme notamment). La méthode de calcul [4] du facteur de Clausius-Mossotti consiste alors à calculer successivement les permittivités effectives des couches

intérieures pour se ramener à une particule homogène équivalente.

Afin de mieux comprendre l'influence des différents paramètres (propriétés électriques des différents compartiments cellulaires et du milieu, taille de la cellule, épaisseur des différentes couches, fréquence du champ) sur la réponse diélectrophorétique, une Interface Graphique Utilisateur (GUI), présentée Fig. 1, a été développée en Java. La conductivité du milieu ainsi que la fréquence du champ appliqué ont ainsi pu

être choisies pour les expériences afin de maximiser la force de nDEP sur des cellules HEK en se basant sur leurs propriétés, extraites de la littérature [5]. Pour les cellules, il est nécessaire de tenir compte de l'influence de la membrane cellulaire sur la réponse diélectrophorétique. Les différents modèles implémentés dans l'interface correspondent au type « Homogeneous particle », « Single-shell », « Two-shell », « Three-shell » et « Four-shell » et sont illustrés Fig. 2 avec des exemples.

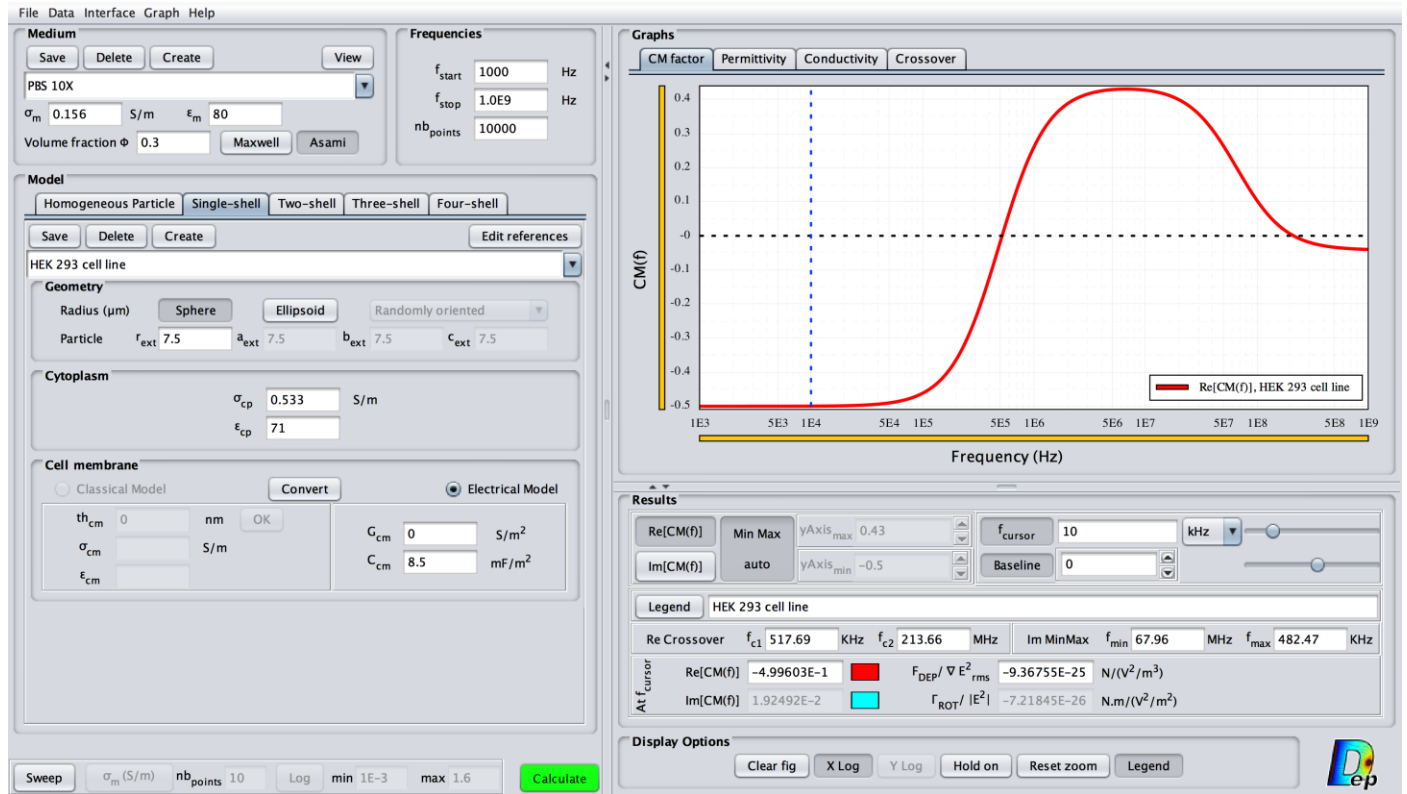


Fig. 1 Interface Graphique Utilisateur (GUI) permettant de simuler les parties réelle et imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti pour prédire le comportement diélectrophorétique de particules, ici pour une cellule HEK. Les paramètres utilisés pour la cellules HEK proviennent de la littérature [5].

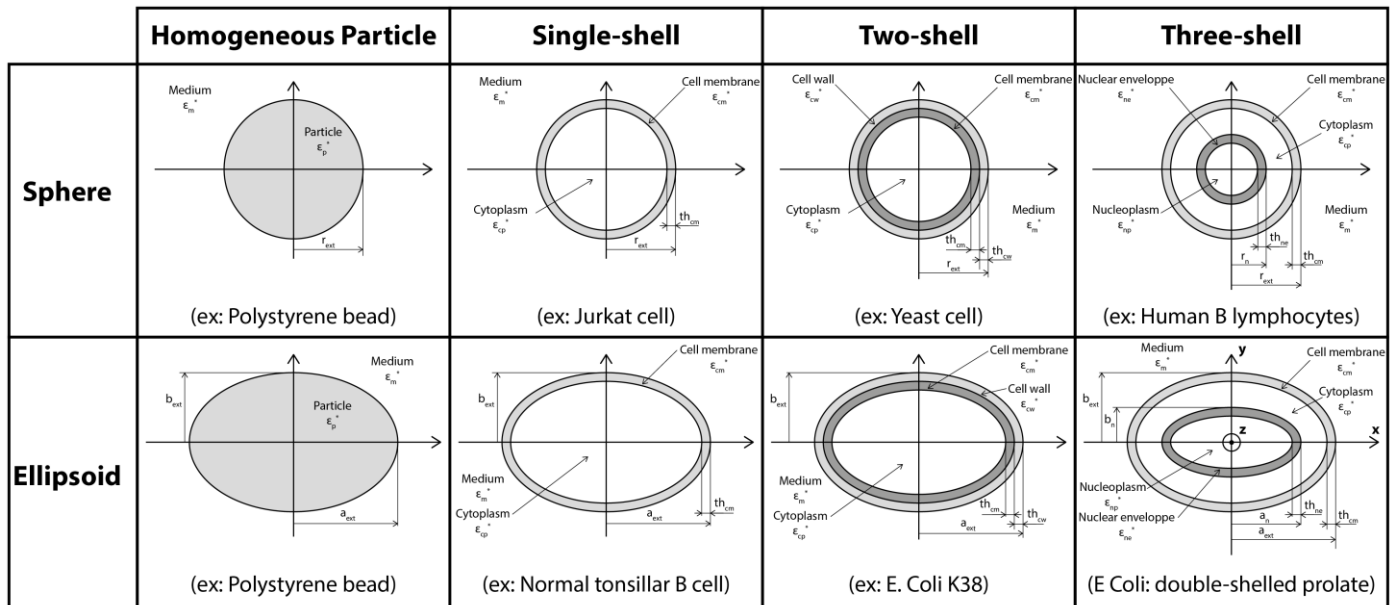


Fig. 2 Illustration des différents modèles de particules et cellules, sphériques et ellipsoïdales, implémentés dans l'interface Java. Les différents modèles, « Homogeneous particle », « Single-shell », « Two-shell », « Three-shell » sont ici à chaque fois donnés avec un exemple. Le modèle « Four-shell » bien qu'implémenté, n'est pas illustré ici.

Pour une cellule du type « single-shell » constituée d'une membrane avec un cytoplasme, la permittivité complexe équivalente à la cellule [4] est :

$$\epsilon_{eq}^* = \epsilon_{cm}^* \frac{\left(\frac{r_{ext}}{r_{ext}-th_{cm}}\right)^3 + 2\left(\frac{\epsilon_{cp}^* - \epsilon_{cm}^*}{\epsilon_{cp}^* + 2\epsilon_{cm}^*}\right)}{\left(\frac{r_{ext}}{r_{ext}-th_{cm}}\right)^3 - \left(\frac{\epsilon_{cp}^* - \epsilon_{cm}^*}{\epsilon_{cp}^* + 2\epsilon_{cm}^*}\right)} \quad (4)$$

La permittivité relative équivalente ainsi que la conductivité électrique équivalente à la cellule HEK peuvent alors être tracées en fonction de la fréquence à l'aide de l'interface Java, comme représenté Fig. 3 et Fig. 4. En basse fréquence, les propriétés sont équivalentes à celles de la membrane multipliées par le ratio rayon extérieur de la cellule, r_{ext} , sur épaisseur de la membrane cellulaire, th_{cm} , alors qu'en haute fréquence ces propriétés tendent vers celles du cytoplasme.

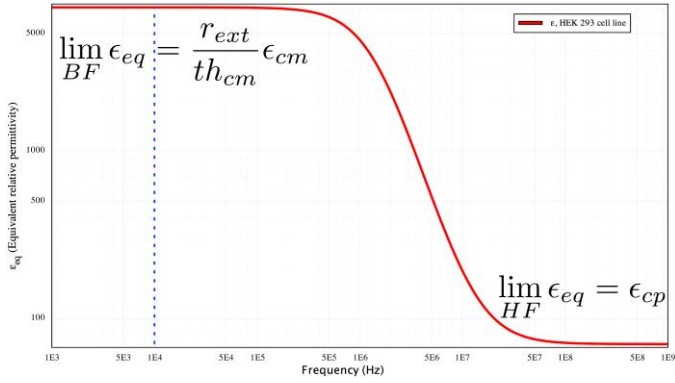


Fig. 3 Evolution de la permittivité relative équivalente avec la fréquence d'une cellule HEK.

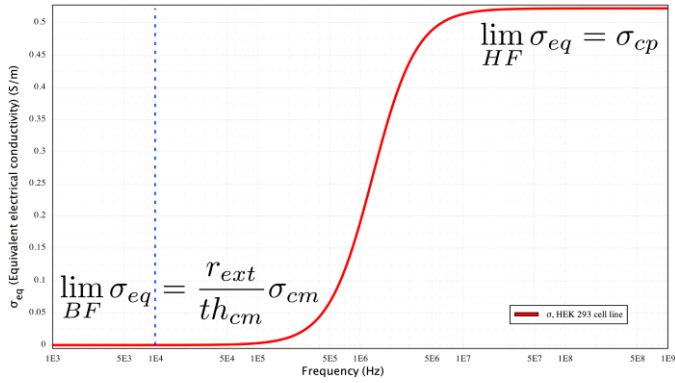


Fig. 4 Evolution de la conductivité électrique équivalente avec la fréquence d'une cellule HEK.

3. SIMULATION COMSOL DU CHAMP DANS LA PUCE

La puce microfluidique étudiée intègre un ensemble d'électrodes octopolaire. Afin d'identifier les configurations d'électrodes permettant le piégeage des cellules et la stabilité de l'agrégat, des simulations ont été réalisées avec le logiciel Comsol Multiphysics. Ces simulations utilisent les modules AC/DC (« Electric Currents ») et « Fluid Flow » (« Creeping Flow » et « Particle Tracing for Fluid Flow »).

Une configuration à 3 électrodes a été retenue car elle permet de piéger les particules dans une position d'équilibre stable quand la force de diélectrophorèse compense exactement la force de traînée du liquide comme présenté Fig. 6 et avec le point gris représentant une cellule HEK dans la Fig. 5. Pour piéger ces cellules d'un diamètre de 15 μm , il est nécessaire que $\text{grad}_x E^2$ soit supérieur à $10^{14} \text{ V}^2/\text{m}^3$ pour la configuration

choisie avec une vitesse de flux de 500 $\mu\text{m/s}$ en entrée comme présenté Fig. 7.

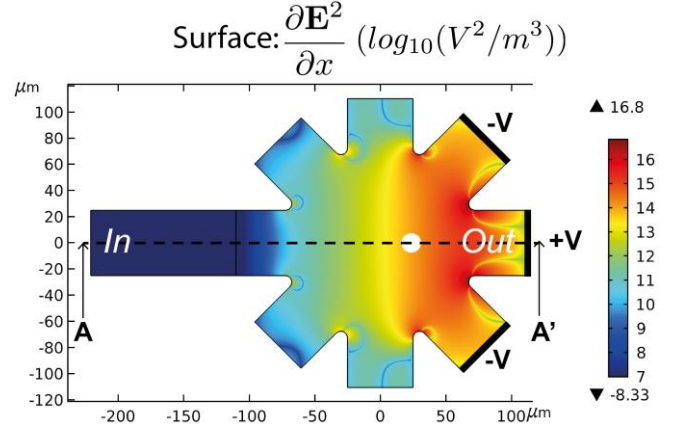


Fig. 5 Simulation Comsol 2D de $\text{grad}_x E^2$ suivant l'axe x. Seules trois électrodes sont alimentées. Le point gris représente la cellule HEK piégée, position obtenue via le module "particle tracing".

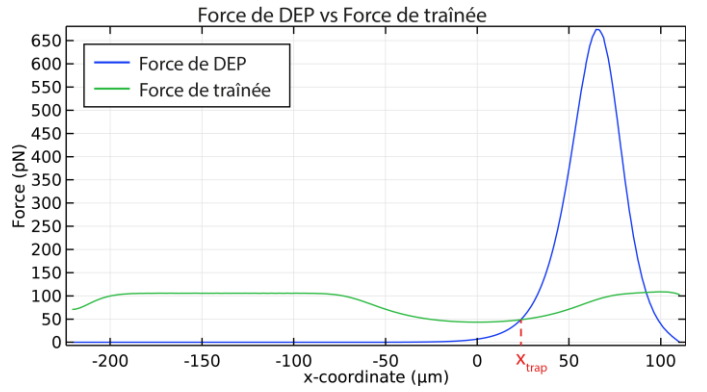


Fig. 6 Forces de diélectrophorèse (DEP) (en bleu) et de traînée (en vert) suivant la coupe AA' de la Fig. 5. La position de piégeage de la particule de diamètre 15 μm correspond à la position d'équilibre quand les deux forces se compensent.

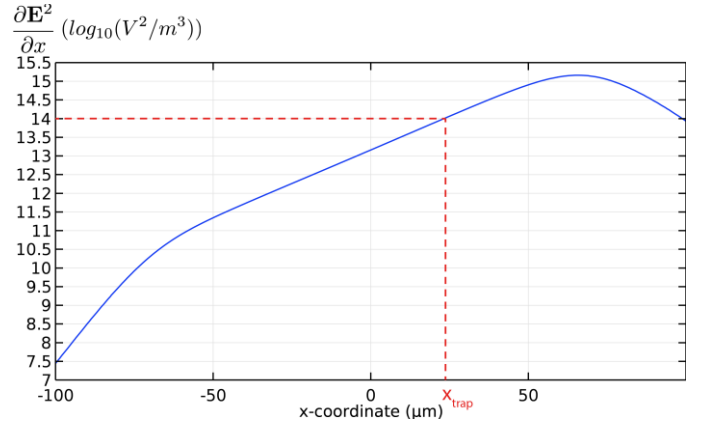


Fig. 7 Evolution de $\text{grad}_x E^2$ suivant la coupe AA' de la Fig. 5. La position de piégeage de la particule est identifiée en rouge.

4. FABRICATION

Les puces fabriquées en salle blanche comportent un ensemble d'électrodes en Ti/Pt microstructurées sur verre et recouvertes d'un canal microfluidique en PDMS comme présenté dans [6] et illustré Fig. 8. Ce microcanal a une section de 50 μm x 50 μm pour sa partie principale. La résistance hydrodynamique du canal est ajustée à l'aide d'un méandre de largeur 40 μm , de hauteur 50 μm et de longueur 42 mm.

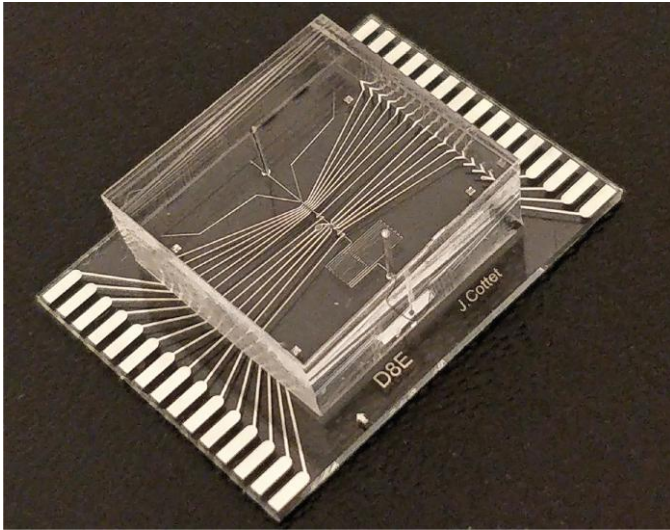


Fig. 8 Photographie de la puce microfluidique constituée des électrodes en Ti/Pt sur du verre et recouverte d'un canal microfluidique en PDMS.

5. PIEGEAGE EN FLUX

Le piégeage en flux de cellules de type HEK a été validé expérimentalement. De petits agrégats de cellules HEK ont ainsi pu être formés comme illustré Fig. 9. Ce piégeage est rendu possible par la diminution de la conductivité électrique du liquide dans lequel les cellules sont en suspension (ici 156 mS/m contre 1,5 S/m pour le milieu de culture) afin de limiter les phénomènes d'échauffement. Afin de ne pas engendrer de déséquilibre osmotique pouvant détériorer les cellules, l'osmolarité du milieu est maintenue à 300 mOm/l par ajout de glucose.

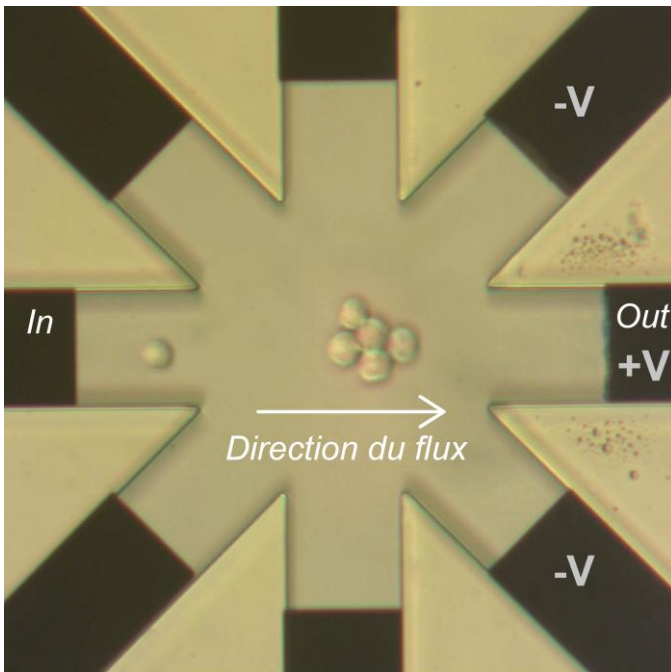


Fig. 9 Illustration de la formation d'un petit agrégat de cellules HEK sous flux en utilisant 3 électrodes.

6. CARACTERISATION DES CELLULES ET AGREGATS FORMES

Des électrodes de microimpédancemétrie ont été ajoutées à la puce afin de permettre la caractérisation des cellules individuelles et des agrégats formés, respectivement en amont et en aval de la chambre de piégeage. Le principe de la mesure consiste à appliquer une tension électrique alternative entre deux électrodes, ici situées en fond de canal, et à mesurer le

courant. Lorsqu'une particule passe entre ces électrodes, la résistance électrique est modifiée et il en est donc de même pour le courant mesuré. En basse fréquence, la membrane cellulaire se comporte comme une capacité ce qui empêche les lignes de champ de pénétrer dans la cellule : la mesure est donc sensible au volume des particules. En haute fréquence, la capacité membranaire est court-circuitée ce qui permet d'obtenir des informations sur les propriétés de l'intérieur de la cellule.

Une géométrie d'électrodes a été développée pour permettre de caractériser les cellules uniques et les agrégats sans que le signal obtenu ne dépende de la hauteur des particules dans le canal microfluidique. Le dispositif expérimental complet est présenté Fig. 10.

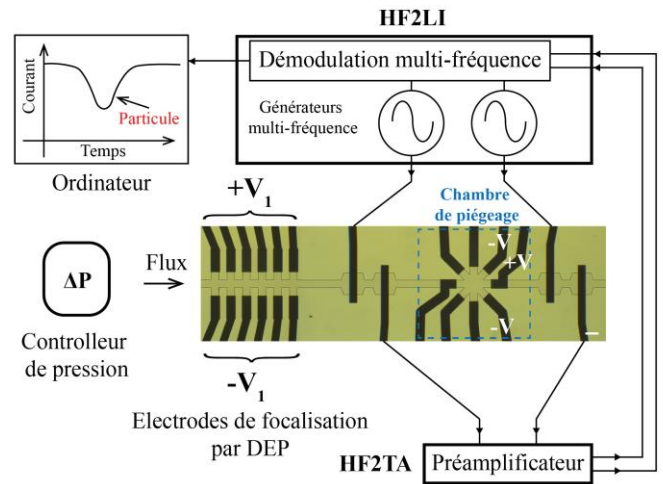


Fig. 10 Représentation schématique du système incluant une photo de la puce. Sur cette dernière figurent les électrodes dédiées au centrage des cellules dans le microcanal (tension V_1), à leur analyse par mesure d'impédance ainsi qu'à leur piégeage par DEP (tension V). Barre d'échelle 100 μm .

La géométrie des cellules de détection est issue d'une démarche d'optimisation présentée dans [7]. La variation relative de courant obtenue pour la géométrie optimisée (LO), comparativement à un canal droit (LC) est illustrée Fig. 11. Le design optimisé permet d'obtenir une plus grande variation lors du passage d'une particule ainsi qu'une variation plus étroite.

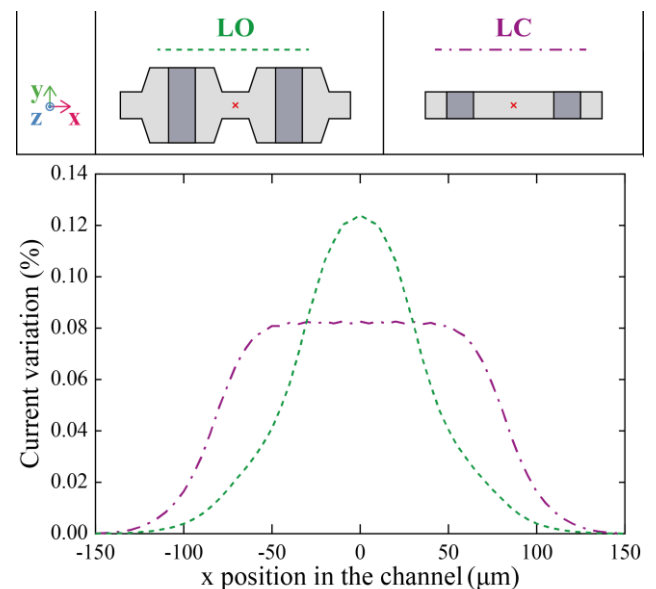


Fig. 11 Comparaison de la variation relative de courant due au passage d'une bille en polystyrène de diamètre 8 μm à une hauteur de 25 μm pour un canal droit (LC) et un canal dont la géométrie a été optimisée (LO). Section du canal 50 μm x 50 μm et distance interélectrode de 150 μm .

7. CONCLUSIONS

Une interface graphique utilisateur a été développée pour permettre de déterminer les conditions de piégeage par DEP de différents types de particules et de cellules. Une géométrie de puce microfluidique a ensuite été proposée et le piégeage de cellules par diélectrophorèse a été simulé. Un dispositif expérimental a été développé et des agrégats de cellules HEK ont été produits. Ces agrégats, aussi bien que les cellules uniques qui le constituent, pourront être caractérisés par spectroscopie d'impédance avec la géométrie optimisée présentée.

8. REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le personnel du CMI à l'EPFL pour son assistance dans la fabrication des puces. Le laboratoire Ampère souhaite aussi remercier l'INSERM pour son soutien (programme Physicancer, projet DYNAMO). Les auteurs remercient le Programme d'Avenir Lyon Saint-Etienne, le labex iMUST (ANR-10-LABX-0064/ANR-11-IDEX-0007) de l'Université de Lyon, ainsi que l'Ecole Doctorale 160 EEA pour les supports à la mobilité octroyés.

9. REFERENCES

- [1] H. A. Pohl, "The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields," (in English), *Journal of Applied Physics*, vol. 22, no. 7, pp. 869-871, 1951/07/01 1951.
- [2] R. Pethig, "Review article-dielectrophoresis: status of the theory, technology, and applications," *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 2, p. 022811, Jun 29 2010.
- [3] S. Menad, L. Franqueville, N. Haddour, F. Buret, and M. Fréneá-Robin, "nDEP-driven cell patterning and bottom-up construction of cell aggregates using a new bioelectronic chip," *Acta Biomater*, vol. 17, pp. 107-14, Apr 2015.
- [4] P. R. C. Gascoyne, F. F. Becker, and X. B. Wang, "Numerical-Analysis of the Influence of Experimental Conditions on the Accuracy of Dielectric Parameters Derived from Electrorotation Measurements," (in English), *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 36, no. 2, pp. 115-125, Mar 1995.
- [5] D. Zimmermann *et al.*, "A combined patch-clamp and electrorotation study of the voltage- and frequency-dependent membrane capacitance caused by structurally dissimilar lipophilic anions," *J Membr Biol*, vol. 221, no. 2, pp. 107-21, Jan 2008.
- [6] J. Cottet, C. Vaillier, F. Buret, M. Fréneá-Robin, and P. Renaud, "A reproducible method for μm precision alignment of PDMS microchannels with on-chip electrodes using a mask aligner," *Biomicrofluidics*, vol. 11, no. 6, 2017.
- [7] J. Cottet, A. Kehren, H. van Lintel, F. Buret, M. Fréneá-Robin, and P. Renaud, "How to improve the sensitivity of coplanar electrodes and micro channel design in Electrical Impedance Spectroscopy: a study," 2018 (Submitted).