Conception et réalisation d'un bio-microsystème basé sur la diélectrophorèse et l'électrofusion en vue de l'immunothérapie du cancer

Guillaume Mottet

▶ **To cite this version:**

Guillaume Mottet. Conception et réalisation d'un bio-microsystème basé sur la diélectrophorèse et l'électrofusion en vue de l'immunothérapie du cancer. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2009. Français. NNT : . tel-00442673

HAL Id: tel-00442673

https://theses.hal.science/tel-00442673

Submitted on 22 Dec 2009

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.

ENSC-(n° d'ordre) : 2009-n°170

THESE DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Présentée par :
Monsieur Guillaume MOTTET

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Domaine :
ELECTRONIQUE –ELECTROTECHNIQUE-AUTOMATIQUE
Spécialité : microsystème

Sujet de la thèse :

Conception et réalisation d'un bio-microsystème basé sur la diélectrophorèse et l'électrofusion en vue de l'immunothérapie du cancer.

Thèse présentée et soutenue à Cachan le 14/09/09 devant le jury composé de :

Isabelle Dufour	Professeure	Rapportrice
Marie Pierre Rols	Directrice	Rapportrice
Elisabeth Dufour-Gergam	Professeure	Présidente
Matthieu Denoual	Mcf	Examinatreur
Bruno Le Pioufle	Professeur	Directeur de thèse
Lluis M. Mir	Directeur	Directeur de thèse

Nom du Laboratoire : SATIE
ENS CACHAN/CNRS/UMR 8029
61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX (France)

Que tu sois lue…

Remerciements :

44 mois ont été nécessaires pour réaliser ces travaux de thèse, répartis sur trois lieux différents (ENS Cachan, Salle Blanche d'Orsay et l'Institut Gustave Roussy). Tous ces endroits ont été une occasion unique pour rencontrer de nombreuses personnes. Il y a donc une liste bien longue de personnes à remercier pour m'avoir permis à la fois ces nombreuses collaborations et pour y avoir passé de bons moments.

La façon la plus simple pour présenter cette longue liste de remerciements m'a semblé tout simplement de me rappeler ces souvenirs (bons, mauvais, paisibles…) par ordre chronologique. Le seul problème à ce listing est qu'il ne prend pas en compte les personnes présentes avant ces travaux et pourtant qui ont dû vivre, subir ou tout du moins m'ont escorté durant ces longues années. C'est donc par eux que je vais commencer mes humbles remerciements. À défaut de remercier Dieu, je remercie donc mes chers géniteurs : Papa et Maman qui m'ont toujours laissé suivre ma voie et ceux malgré le temps nécessaire pour arriver à ce titre de Dr. Mes remerciements vont ensuite à mon plus proche parent, génétiquement parlant, mon petit Frère toujours intéressé par mes travaux et qui j'espère réussira aussi bien ces études que moi (en plus rapide peut être). Vient bien naturellement après ma Princesse qui a peut être un peu subit ces années, mais qui a maintenant la chance de pouvoir dire qu'elle sort avec un Dr (en science). Et puis ce sont aussi tous mes amis qui par vents et marées sont toujours là : Arnaud, Cédric, Céline, Chris, David, Isabelle, Jérôme, Mathias, Seb, Vincent… Bien sûr, il y a tous les amis de la famille : Michelle, Francine et son regretté mari Gérard, Margaret, Agnès et Philippe, la famille Poule… et la famille de Maroussia : Roselyne, Caroline, Hervé et leurs petits Loic et Eline…

L'histoire de cette thèse a commencé quelques mois avant la rentrée 2005 lorsque Mme Claire Dupas (ancienne directrice de l'ENS Cachan) a donné son accord pour que j'obtienne une bourse ministérielle dans son établissement sous la direction de Bruno Le Pioufle. Je sais que pour soutenir ma candidature, j'ai pu compter sur le soutien de Mr Sylvain Alano (ancien directeur du SATIE) et de Mme Bogdana Neuville (directrice du SRI) et je leur en suis reconnaissant. Cette thèse avait toutefois une particularité puisque pour la première année je profitais d'un financement pour partir au Japon via l'école doctorale Franco-Japonaise. Donc à peine arrivé à l'ENS Cachan, me voilà déjà parti pour le Japon. Au Japon, j'ai été reçu par le prestigieux Baba sensei et son équipe située à Nagoya. Ce fut une première expérience forte enrichissante dans le monde des biopuces. Pendant ce voyage initiatique dans la culture Japonaise et les microtechnologies, j'ai fait d'heureuses rencontres : Jonathan, Nicolas, Reza et Laili, Sonoko, Yumiko et bien entendu tous les membres du Baba lab.

De retour du Japon, je me suis installé dans le grand bureau dans la salle à la fresque de l'ENS Cachan. À ce moment je passais une bonne partie de mon temps à tenter de simuler un microsystème innovant sous Comsol. Pour m'aider et me conseiller sur l'utilisation de ce logiciel, j'ai pu compter sur l'aide d'Eric Labouré. Au même moment, j'essayais de comprendre les arcanes de l'immunothérapie du cancer et pour cela Mme Marie-Alix Poul (LBPA) a toujours été là pour me les expliquer. Le midi essayant d'éviter au maximum le

CROUS, j'avais souvent mon petit repas, ce qui me poussa à rechercher désespérément un frigo pour stocker ma popote. Ce fut chose faite quand Gladys Mbamba m'autorisa à utiliser leur frigo. Commença alors une longue histoire de repas bien garnis et joviaux avec une partie de l'équipe du LBPA.

Vint le temps de passer à la fabrication du microsystème en salle blanche à Orsay. C'est Véronique Mathet qui m'a accueilli et m'a donné l'autorisation d'y travailler. C'est le début alors d'une longue collaboration, en particulier sur l'utilisation du MEB. Pour me former aux différentes machines et pour m'aider, j'ai pu compter sur David Bouville, toute l'équipe de la CTU : Benoit, Abdel, David, Cedric, José… et Marion et Mme Elisabeth Dufour-Gergam pour la technique de dépôt électrolytique. Ces nombreuses heures en salle blanche m'ont permis de rencontrer de nombreux thésards qui sont devenu au fils du temps de très bons copains, je pense en particulier à Olivier et à Seb Junior… C'est aussi la rencontre avec deux encyclopédies des techniques développées en salle blanche que sont Jean René et Xavier. Durant ces journées en salle blanche, pour de multiples raisons (machines occupées, cuissons…), j'étais à la recherche d'un ordinateur pour bien évidement mettre à jour ma bibliographie. Cette quête d'un bureau libre et équipé d'un PC m'a tout simplement poussé à aller voir mes anciens camarades de M2R : Audrey, Karim et Damien. J'avais ainsi avec un peu de chance un PC de libre, mais surtout de bonnes conversations devant moi.

En deuxième année, j'ai pu suivre des cours de biologie à l'ISBM via mon école doctorale. Suite à la qualité des cours et à la nécessité d'acquérir des connaissances en biologie, j'ai postulé à l'IFSBM pour pouvoir m'inscrire au D.U de biologie médicale. Ma candidature étant acceptée, j'ai pu suivre pendant 2 ans des cours aussi variés que la neurologie ou la cardiologie… En plus des cours, l'IFSBM nous imposait que nos travaux de thèse soit suivi par un chercheur en biologie ou un médecin (comme un tuteur). Ce qui aurait pu se révéler être une contrainte supplémentaire, s'est avérée être une très bonne initiative. En effet mon tuteur en la personne du Dr Lluis Mir s'est trouvé être en fin de thèse mon co-directeur de thèse. Sa rencontre fut décisive dans l'avancée de mes travaux et dans mon apprentissage scientifique. Il a en effet mis à ma disposition son laboratoire et son temps précieux pour comprendre et analyser mes résultats. Cette rencontre m'a permis d'avoir en plus un lieu de travail pour faire mes expérimentations de biologie et aussi de rencontrer de nouvelles personnes en particulier : Vanessa, Aude, Jean Rémy et Julien qui m'auront activement aidé et soutenu tout le long de ma thèse. A la même époque, je fis la rencontre de nouveaux collègues à l'ENS : Valérie, Joseph et Jean Pierre. Jean Pierre me fut d'une grande aide pour certains aspects technologiques et toujours là pour discuter sciences ou autres (sans fioriture, bien entendu).

Enfin, après une période difficile de rédaction de mon manuscrit, j'ai eu la chance de voir ma candidature de post doc à l'institut Curie acceptée. J'ai alors rejoint avant même de soutenir ma thèse, l'équipe de Jean Louis Viovy. En arrivant dans cette nouvelle équipe, j'ai découvert une très bonne ambiance de travail et une vraie famille scientifique : Anaïs, Francesca, Karla, Laure, Maeva, Sanae, Sandrine, Virginie, François-Damien, Ludovic,

Laurent, Julien, Giovanni, Guillaume, Stephano, Pierre, Velan, Fabien, Reza (merci encore d’être venu si nombreux à ma thèse).

Les multiples endroits avec les 3 points de suspension sont là pour tous ceux que ma mémoire de poisson rouge aurait oubliés.

GLOSSAIRE 11
Introduction générale 12
I. Chapitre I : L'immunothérapie du cancer 14
A. Introduction : 14
B. Cancer et système immunitaire, une histoire compliquée 15
1. Antigènes tumoraux ? 15
2. Le système immunitaire contre les tumeurs 15
3. Échappement des tumeurs à la surveillance du système immunitaire 18
C. *Reprogrammer* le système immunitaire pour lutter contre le cancer 20
1. Stratégie immunitaire pour la lutte antitumorale 20
2. Les cellules dendritiques : une grande famille 21
3. La voie in-vivo 22
4. La voie ex-vivo 22
5. Considérations sur le choix de la technique pour mener au mieux la présentation des antigènes tumoraux. 23
6. Les essais cliniques ? 26
7. PEG ou Electrofusion ? 27
D. Conclusion 29
II. Chapitre II : Microsystèmes 30
A. Introduction 30
B. Intérêts et enjeux des bio-microsystèmes 33
1. Introduction 33
2. Un monde microscopique 34
3. Opportunités de la miniaturisation et de la parallélisation 36
4. Conclusion 37
C. Micromanipulation : déplacer et placer des cellules 37
1. Introduction 37
2. Utilisation de la microfluidique (forces hydrodynamiques) 37
3. Utilisation de la force mécanique 39
4. Utilisation de pince optique 40
5. Utilisation des Anticorps 42
a) Fonctionnalisation de surface via des anticorps pour immobiliser des cellules. 42
b) Anticorps greffés à des particules magnétiques 43
6. Utilisation de l'électroosmose 45

a) Théorie 45
b) Pratique 47
7. Conclusion 48
D. Micromanipulation de cellules par la force électrique 49
1. Introduction 49
2. Comportement d'une cellule soumise à un champ électrique 49
a) Cas d'un champ électrique continu ou de très basses fréquences (f<1kHz) 49
b) Cas d'un champ électrique alternatif 50
c) La force de diélectrophorèse 53
d) Électrorotation et Diélectrophorèse à onde progressive 56
3. Rapport de force à l'échelle microscopique 57
4. Application au déplacement et au placement cellulaire 59
a) Déplacer des cellules par DEP 59
b) Placer des cellules par DEP à l'aide d'électrodes interdigitées 60
c) Placer des cellules à l'aide de réseaux d'électrodes en 3D 61
d) Placer des cellules via des structures isolantes 62
5. Conclusion 63
E. Électrofusion 64
1. Introduction 64
2. Une vision simplifié de l'électrofusion 65
3. Une vision de l'électrofusion un peu plus proche de la réalité 67
4. Dispositif macroscopique pour l'électrofusion 68
a) Appareillage et protocole expérimental 68
b) Choix du milieu d'électrofusion 70
5. Dispositif microscopique pour l'électrofusion 72
a) Dispositif à électrodes interdigitées 72
b) Dispositif à base de structures isolantes 73
c) Dispositif basé sur la fonctionnalisation de surface par anticorps 73
d) Dispositif microfluidique 74
6. Conclusion 76
F. Microtechnologies pour la microfluidique 77
1. Introduction 77
2. Microtechnologie PDMS 78

3. Micromoulage par injection ou compression 79
4. Microtechnologie SU-8 80
5. Conclusion 83
G. Conclusion 83
III. Chapitre III, Conception et Réalisation 84
A. Introduction 84
B. Conception : une idée, des simulations, un design. 85
1. Introduction 85
2. Structure Washizu : cas d'école et premières optimisations 86
a) La structure Washizu 86
b) Modification des structures isolantes 89
c) Simulation avec une cellule 91
d) Parallélisation de la structure 92
3. Une architecture à trois canaux 93
4. Électrodes épaisses 94
5. Interaction sur le flux hydrodynamique 95
6. Conclusion 97
C. Fabrication 98
1. Introduction 98
2. La salle blanche : univers épuré 98
3. Les masques 99
a) Dessin et fabrication : 99
b) Bien utiliser des masques 101
4. Les électrodes 101
a) Les électrodes fines. 103
b) Les électrodes épaisses 104
5. Parois des canaux et isolation des électrodes 106
6. Collage de substrats souples et durs pour sceller les canaux 110
a) Collage de film SU-8 (Soft bonding) 110
b) Collage de substrats durs (hard bonding) 112
7. Connectique et tests hydrauliques 113
8. Conclusion 113
D. Conclusion 114

IV. Chapitre IV, Expérimentation biologique 115
A. Introduction 115
B. Matériels et Méthodes 116
1. Introduction 116
2. Cellules et milieu 116
3. Microsystèmes 117
4. Électronique et microscope 118
5. Conclusion 119
C. Résultats expérimentaux sur la diélectrophorèse 120
1. Introduction 120
2. Placement des cellules par DEP 120
3. Étude du comportement diélectrophorétique des cellules 121
4. Étude de la variation de la largeur des parois centrales sur la force de DEP 122
5. Conclusion 125
D. Résultats expérimentaux sur l'électrofusion 125
1. Introduction 125
2. L'électroperméabilisation 125
3. L'électrofusion 126
4. Amplitude des impulsions et électrofusion 128
5. Étude de la fluorescence durant l'électrofusion 129
6. Conclusion 130
E. Tests microfluidique et observations 131
1. Introduction 131
2. Diélectrophorèse et microfluidique 131
3. Observation de la fluorescence dans les canaux 131
F. Conclusion 132
V. Conclusion générale 133
VI. Annexe I, Le Système Immunitaire 135
A. Introduction 135
B. Stratégies de défense: 136
C. Immunité acquise ou naturelle : 137
D. Immunité adaptative : 139
E. La réaction immunitaire : 141

1. La médiation humorale : Lymphocyte B 142
2. La médiation cellulaire : Lymphocyte T 143
F. Conclusion 145
VII. Annexe II, Le cancer ou les cancers 146
A. Introduction 146
B. Courte histoire du cancer 147
C. Le cancer, une maladie génétique 151
1. Du gène au cancer 151
2. Gènes suppresseurs de tumeur et proto-oncogènes 152
3. De la perte d'un gène à la métastase : le Cancer colorectal 154
4. La cause de la cause… 155
D. Etudes épidémiologiques 157
1. Grandes études épidémiologique et nouvelle législation européenne 158
2. Étude de la mortalité par cancer 159
3. Tabac et cancer 161
4. Facteurs de risque et décès par cancer 162
E. Dépister, trouver, diagnostiquer 165
1. Trouver ? 165
2. L'imagerie médicale 165
3. Diagnostiquer pour mieux guérir 169
4. Dépister 170
F. Guérir ou vivre dans de bonnes conditions avec son cancer 171
1. La chirurgie : 171
2. La radiothérapie 172
3. La chimiothérapie 174
4. Nouvelles molécules, grands espoirs, mais localisés 176
G. Conclusion 179
VIII. Annexe III, Projet Aiguilles 180
IX. Bibliographie 181

GLOSSAIRE

- AAT : Antigènes Associés à la Tumeur
- AST : Antigène Spécifique à la Tumeur
- CD : Cellule Dendritique ou *Dendritic Cell* (DC)
- C-M : Clausius-Mossotti
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CTU : Centrale Technologique Universitaire
- D.U : Diplôme Universitaire
- DEP : Diélectrophorèse (p: positive, n: négative)
- EOF : *ElectroOsmotic Flow* ou Flux ElectroOsmotique
- LOC : *Lab On a Chip* ou Laboratoire sur puce
- LTC : Lymphocyte T Cytotoxique
- MEMS : *MicroElectroMechanical Systems* ou microsystème électromécanique
- PDMS : PolyDiMéthylSiloxane
- PEG : PolyEthylene Glycol
- PET : PolyEthylène Téréphtalate
- SU-8 : résine photosensible négative de type époxy

Introduction générale

Aujourd'hui pas une seule semaine ne se passe sans que l'on parle des nanotechnologies et de leur potentiel important pour la société. Pourtant, si leur potentiel semble très prometteur, il faudra encore attendre quelques dizaines d'années pour que leurs applications se développent et se généralisent. Les microtechnologies, bien que moins médiatisées, sont en plein essor aussi bien dans l'industrie que dans la recherche académique. Elles sont déjà présentes dans notre vie quotidienne avec les microsystèmes électromécaniques (MEMS) que l'on peut retrouver par exemple dans nos téléphones, imprimantes, voitures... Cette importante croissance a permis il y a une dizaine d'années l'émergence des BIO-MEMS (MEMS appliqués à la biologie) et du concept plus complexe de laboratoire sur puce (LOC). Ce dernier permet d'intégrer tous les appareils d'un laboratoire sur une simple puce de quelques cm^2. Notre travail se situe dans ce champ disciplinaire.

Notre sujet de recherche vient d'une demande de cliniciens pour obtenir en grande quantité des hybridomes issus de la fusion entre cellules cancéreuses et cellules dendritiques. Ces travaux s'insèrent dans la recherche de la lutte contre le cancer par un procédé proche de la vaccination, appelé aussi immunothérapie du cancer. Il existe actuellement des dispositifs commercialisés, mais ceux-ci ne parviennent pas à produire de façon importante des hybridomes de qualités. L'idée était donc de se placer à l'échelle des cellules, c'est-à-dire à l'échelle microscopique, pour interagir sur elles de façon précise, tout en bénéficiant de la miniaturisation pour contrôler un grand nombre de cellules en parallélisant le dispositif. Si nous savions à quelle échelle nous placer, nous devions encore choisir quelles forces utiliser pour agir sur les cellules pour les déplacer, les placer et les fusionner, car à l'échelle microscopique le rapport des forces n'est pas le même que celui présent à notre échelle. Nous avons opté pour l'emploi de la microfluidique pour le transport des cellules, de la diélectrophorèse pour les positionner et de l'électrofusion pour les fusionner. Ce projet est à la conjonction de savoir-faire dans les domaines de la microtechnologie, de l'interaction champs électriques-cellules et de la biologie cellulaire. Notre laboratoire possédait déjà une expérience sur la manipulation de cellules par champ électrique et la conception de microsystèmes. Cependant, nous n'avions pas à notre disposition l'équipement nécessaire pour développer notre dispositif. Nous avons bénéficié de la centrale technologique universitaire (CTU) d'Orsay qui dispose de tous les appareils nécessaire à l'élaboration d'un microsystème complexe. Concernant les aspects biologiques de cette recherche, j'ai pris l'initiative de m'inscrire à un D.U de biologie médicale à l'IFSBM pour être à même de mieux comprendre ma thématique et ses enjeux. C'est durant cette formation que j'ai rencontré mon tuteur, Mr Lluis Mir, directeur de recherche au CNRS et responsable d'une équipe à l'Institut Gustave Roussy. Son équipe est spécialisée dans l'interaction champ électrique cellule et a développé des applications telles que l'électrochimiothérapie. Cette équipe collabore avec SATIE depuis plusieurs années, nous avons donc mis en place un partenariat sur ce sujet me permettant d'accéder aux matériels biologiques, électroniques et optiques de son laboratoire.

Pour aborder au mieux ces travaux de recherche, nous nous intéresserons dans un premier chapitre à l'immunothérapie du cancer. Pour appuyer ce chapitre, deux annexes permettent de rappeler le fonctionnement de notre système immunitaire (annexe I) et de décrire en détails la maladie cancéreuse (annexe II). Le chapitre I nous permettra de mieux saisir l'intérêt de l'immunothérapie du cancer et tout particulièrement l'utilité de fusionner une cellule cancéreuse avec une cellule dendritique. Dans un second chapitre nous discuterons en détails des microsystèmes et en particulier ceux dédiés à la manipulation cellulaire. Nous verrons aussi comment fabriquer un tel dispositif ce qui nous permettra de passer au troisième chapitre centré sur nos travaux. Dans ce chapitre nous parlerons de la mise au point de nos microdispositifs, en suivant leurs conceptions et leurs fabrications. Enfin, nous finirons sur la présentation des résultats d'expérimentation biologique mettant en évidence les phénomènes de diélectrophorèse et d'électrofusion.

Nous avons eu le souci d'écrire ce rapport de thèse aussi bien pour un lecteur n'ayant que peu de connaissances dans le domaine, qu'au spécialiste recherchant des informations précises sur le domaine de la fusion cellulaire sur puce.

I. Chapitre I : L'immunothérapie du cancer

A. Introduction :

Ce chapitre sur l'immunothérapie associé aux annexes I (système immunitaire) et II (cancer) comporte une soixantaine de pages, ce qui peut sembler au premier abord étrangement long. Mais j'ai fait ce choix pour plusieurs raisons. Tout d'abord, j'ai eu la chance de suivre et de valider un Diplôme Universitaire de Biologie Médicale à l'IFSBM[1]. Il me semblait donc logique de présenter de façon approfondie ces deux thématiques que sont l'immunité et le cancer. J'ai d'autre part constaté qu'il n'existait pas (ou tout du moins je ne l'ai pas trouvé) un document synthétisant la maladie 'cancer' qui soit à la fois compréhensible par le plus grand nombre, tout en ne perdant pas sa véracité scientifique. C'est donc délibérément que j'ai pris le parti de rédiger toute une partie sur le cancer expliquant et sensibilisant le lecteur à cette maladie si complexe, dont les enjeux ne s'arrêtent pas seulement à la soigner. Pourquoi dans une thèse ? Tout simplement parce que la thèse est un document officiel, consultable par tous, et scientifiquement validé. Enfin, je n'ai jamais perdu de vue mon objectif de présenter l'immunothérapie du cancer, mais quoi de mieux pour l'introduire qu'un rappel, certes un peu long, sur le système immunitaire et le cancer ? Ce sont donc toutes ces raisons qui m'ont poussé à rédiger ce chapitre et ces annexes, chapitre et annexes qui ne seront bien sûr pas exhaustifs, mais je l'espère instructifs.

Pour faciliter la lecture de ce document, nous avons placé en annexe les parties décrivant le système immunitaire (Annexe I) et le cancer (Annexe II). Le lecteur pourra ainsi les consulter pour approfondir ces connaissances dans ces différents domaines. Nous commençons donc directement ce chapitre sur un traitement novateur contre le cancer : l'immunothérapie du cancer.

L'immunothérapie du cancer consiste à réactiver le système immunitaire pour lutter contre le cancer. On peut d'ailleurs se demander pourquoi notre système immunitaire ne nous défend pas efficacement contre le cancer ? Tout d'abord, rappelons-nous qu'une cellule cancéreuse est issue d'une cellule de notre corps. Elle est donc quasiment identique à une cellule saine, ce qui rend la différence entre le soi et le non-soi très faible. D'où la question : le système immunitaire voit-il la tumeur comme un corps étranger ou comme du soi ? [18]. De plus, au cours de son développement, la tumeur va mettre en place (par pressions sélectives) des *stratagèmes* pour parer le système immunitaire. Notre système immunitaire est alors mis en défaut. L'avancement de nouvelles thérapeutiques *forçant* le système immunitaire à continuer sa lutte contre le cancer est un espoir.

[1] IFSBM (Institut de Formation Supérieur BioMédicale), formation rattachée à la faculté de médecine Paris XI Orsay.

B. Cancer et système immunitaire, une histoire compliquée

Le système immunitaire, qu'il soit adaptatif ou non, a besoin pour être activé de détecter un antigène. Existe-t-il seulement des antigènes tumoraux, et si oui, quelles cellules sont à même de les détecter ?

1. Antigènes tumoraux ?

Dans l'annexe II, nous avons vu que la cellule cancéreuse se distingue d'une cellule saine par l'apparition de mutations dans son génome. Ces mutations vont donc entraîner un changement dans la synthèse des protéines. Deux phénomènes peuvent alors se produire. Soit, la protéine est mutée, dans ce cas, elle pourra être vue comme un antigène par le système immunitaire. Ce type d'antigène est appelé antigène spécifique de la tumeur (AST). Ces antigènes seront propres à chacun des patients, car ils dépendent des mutations apportées à leur génome. Sinon, la protéine peut être anormalement exprimée, entrainant du coup une présentation antigénique particulière. Ces antigènes sont du soi, et de ce fait ne devraient pas induire de réaction immunitaire. Pourtant, dans certains cas, ces antigènes n'ont aucun rapport avec la cellule dont est issue la tumeur. On peut ainsi retrouver des antigènes testiculaires ou embryonnaires. C'est l'expression aberrante de ces antigènes qui permettra d'enclencher une réaction immunitaire. Ces antigènes ne sont donc pas exclusifs à la cellule cancéreuse, c'est pourquoi on les appelle des antigènes associés à la tumeur (AAT). Enfin, pour les tumeurs induites par un virus oncogène (comme papillomavirus), des antigènes viraux pourront être exprimés. Ces antigènes ne sont pas, à proprement dit, des marqueurs tumoraux, mais ils leurs sont fortement liés. Tous ces antigènes sont présentés via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Cette présentation pourra entrainer une reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T (voir *Figure I-1*).

2. Le système immunitaire contre les tumeurs

L'histoire de la lutte du système immunitaire contre les tumeurs commence à la fin du XIX^{ième} siècle [56]. Le Dr William Coley (1862-1936), chirurgien et chercheur contre le cancer s'intéresse alors au dossier d'un patient souffrant d'un sarcome à la joue. Le sarcome est énorme (la taille d'un œuf), les chirurgiens tentent tout de même de l'exciser. L'ablation

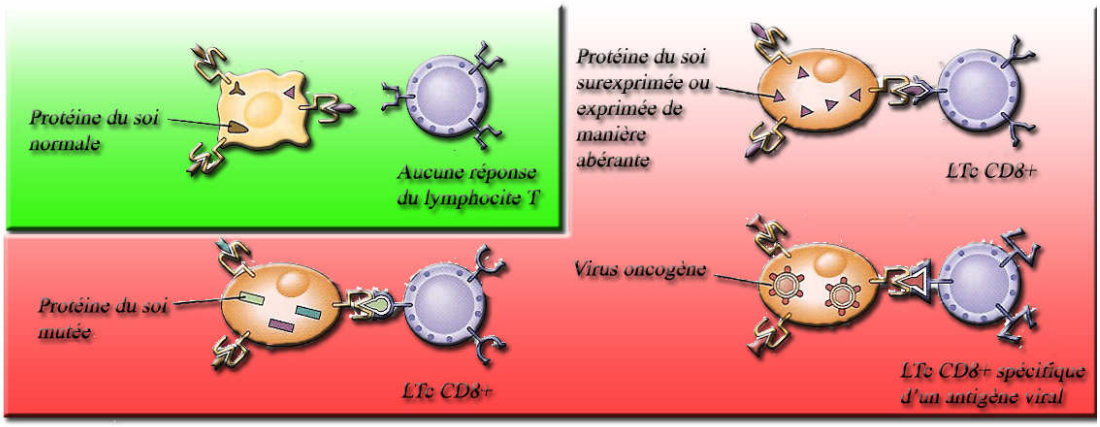

Figure I-1 : Type d'antigènes tumoraux pouvant être reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC)(inspiré de [Abbas][9].

est tellement importante que les chirurgiens n'arrivent pas à refermer la plaie ! Ironie du sort, et c'est pourtant ce qui sauvera par la suite le patient, malgré cette opération, la tumeur progresse et les médecins décident d'une opération de la dernière chance. Malheureusement, l'opération est un échec, car les chirurgiens n'arrivent à enlever qu'une partie de la tumeur. En plus, suite à l'opération la plaie va s'infecter via des bactéries (Streptococcus pyogenes). Le patient fait alors de fortes poussées de fièvre. Étrangement, à chacune de ses poussées, sa tumeur diminue et va même finir par disparaître. Coley voit dans cette guérison extraordinaire un lien entre infection (activation du système immunitaire) et régression de la tumeur. Avant de se lancer dans des tests cliniques, il veut s'assurer que le patient est bien guéri de son cancer et part à sa recherche. Après plusieurs semaines, il finit par le retrouver en pleine forme avec pour seule trace de son cancer, une grosse cicatrice (son opération remontait à 7 ans). Du coup, Coley infecte ses patients (un comble pour un médecin) avec la même souche bactérienne. Les résultats sont mitigés : d'une part, il n'est pas simple de provoquer une infection chez un patient déjà mal en point et certains patients décèdent des suites de l'infection. Par contre, pour les patients ayant une réaction importante, il remarque bien une diminution de la tumeur. À ce moment précis, on ne sait pas qui est le tueur de tumeurs. Est-ce la bactérie qui sécrète une molécule antitumorale ou mieux est-elle « *tumeurophage* » ? Ou est-ce le système immunitaire qui, une fois activé par l'infection bactérienne provoque, comme effet secondaire, une réponse antitumorale ?

La réponse va venir dans le deuxième essai clinique que Coley va lancer. Cette fois-ci, il concocte un vaccin avec deux souches bactériennes mortes (Streptococcus pyogenes et Serratia marcescens) connues maintenant sous le nom de « toxine de Coley ». Cette fois-ci, il n'y a pas de risque d'infection. Par contre, si le vaccin marche, cela prouve que le système immunitaire est à l'origine de la disparition des tumeurs. Premier patient traité, premier succès [57]. Ce patient était pourtant atteint d'un sarcome inopérable et métastatique. Coley continuera ainsi de traiter ses patients avec plus ou moins de succès. Ses conclusions sur cet essai clinique sont assez intéressantes. Il remarque que le phénomène le plus important pour que le patient guérisse est que celui-ci ait une réaction aiguë au vaccin (fièvre). Ensuite, il faut essayer d'injecter directement le vaccin dans les tumeurs, et enfin, répéter ce protocole opératoire pendant 6 mois avec une injection par semaine pour éviter une rechute du patient.

Cette étude est particulièrement intéressante car elle est la première preuve que notre système immunitaire, s'il est *débloqué*, peut agir contre les cancers. Malgré l'intérêt de ses travaux, cette piste thérapeutique sera plus ou moins oubliée au cours du siècle et ne resurgira qu'au XXI^{ième} siècle.

L'histoire continue dans les années 50, quand plusieurs équipes réalisent une expérience très intéressante. Ils prennent une lignée pure de souris (elles sont toutes jumelles ou tous jumeaux, donc pas de rejet de greffe de tissus sains entre eux). Ils attendent [58] ou provoquent [59] un cancer dans une des souris. Ensuite, ils prélèvent la tumeur et la transplantent à plusieurs souris de la même lignée. Ils constatent alors que les tumeurs sont majoritairement rejetées et détruites. Ceci implique deux choses : d'une part, l'existence d'antigènes tumoraux est prouvée, et d'autre part, l'immuno-surveillance antitumorale est née. Ce principe proposé en 1959 par Thomas [60] puis par Burnet [61], soutient que notre système immunitaire surveille en permanence notre corps à la recherche de cellules cancéreuses pour les éliminer. Restait à le prouver chez l'homme. Il était bien sûr impensable de garder le même protocole expérimental. Un premier indice va provenir d'une infection virale chez l'homme : le SIDA. Ce virus a la particularité de s'attaquer aux lymphocytes auxiliaires, bloquant ainsi toute la réaction immunitaire adaptative. Le suivi des patients atteints du SIDA a permis une étude de la prévalence des différents cancers [62, 63]. Comme on peut s'y attendre les risques de cancers liés à une infection virale sont très importants : sarcome de Kaposi (310 fois plus important), lymphome non Hodgkinien (113 fois). Ce type de cancer profite surtout de la prolifération des virus (herpes virus 8, EBV) qui ne sont plus détruits par le système immunitaire. On ne peut pas alors parler de perte de l'immuno-surveillance antitumorale, mais plutôt de perte de la lutte antivirale. Par contre, plusieurs études tendent à montrer une augmentation de cancers n'ayant pas de rapport direct avec le SIDA: ce risque est environ deux fois plus élevé [62, 64]. Mais ce dernier chiffre reste encore difficile à quantifier et demandera des études plus poussées [65]. D'autres patients souffrent aussi d'immunosuppression. C'est le cas des personnes ayant subi une greffe. Pour éviter un rejet de leur greffon, on leur administre des immunosuppresseurs. Pendant 15 ans, une étude a suivi 900 malades. Comme pour le SIDA, on constate une augmentation significative de l'incidence de certains cancers [66].

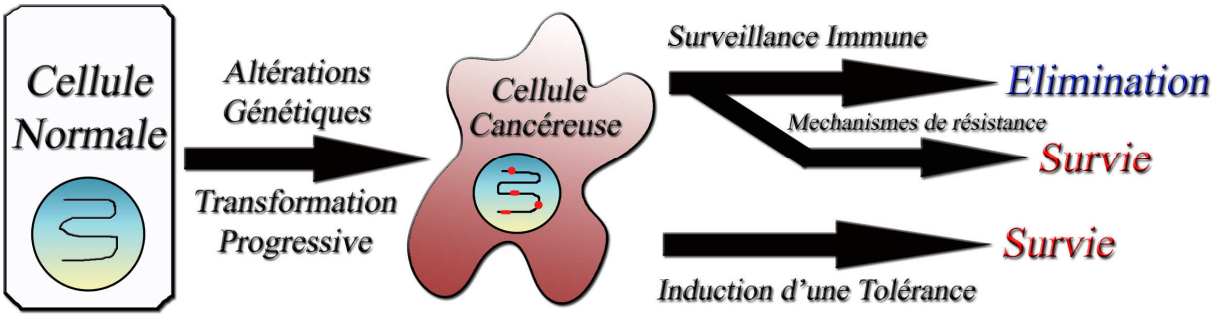

Figure I-2: Implication de l'immuno-surveillance sur l'évolution d'une cellule cancéreuse (inspirée de [Pardoll][18])

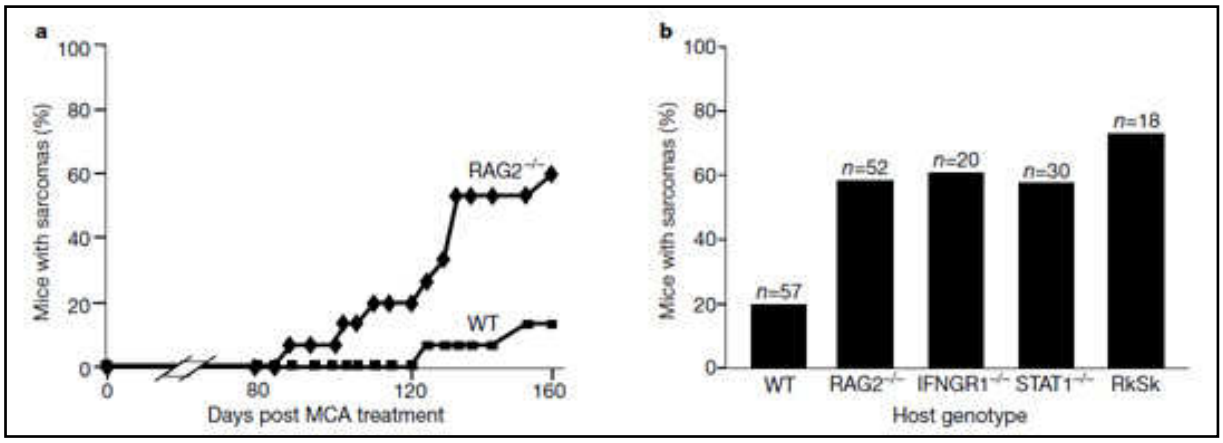

Figure I-3: a) Pourcentage des souris ayant développé un sarcome en fonction des jours écoulés après traitement avec un carcinogène (methylcholanthrene MCA). Comparaison entre souris RAG2-/- et souris sauvages.

b) Pourcentage des souris ayant développé un sarcome après traitement avec un carcinogène (MCA). Comparaison entre souris sauvage, souris RAG2-/-, souris IFNRG-/-, souris STAT1-/-, et souris RAG2-/- STAT-/- (RkSk). [Shankaran][41]

En parallèle de ces études chez l'homme, des travaux sur des souris génétiquement modifiées vont apporter une preuve importante de l'existence d'une lutte antitumorale via le système immunitaire [41, 67]. Les progrès en biogénétique permettent en effet depuis 1989 d'inactiver un gène du génome d'une souris. Cette souris génétiquement modifiée sera dite souris knock-out pour le gène considéré. Les chercheurs vont alors inactiver des gènes intervenant dans les mécanismes de l'immunité. Le knock-out ciblera un récepteur de l'interféron γ (IFNGR1-/-) ou une kinase liée à ce récepteur (STAT-1-/-). Ce blocage de l'activité lié à l'interféron γ va réduire l'immunité innée et adaptative. Suivant le même raisonnement, ils vont aussi inactiver le gène RAG2 qui est nécessaire à la synthèse de l'immunoglobuline et du TCR. Une souris RAG2-/- n'aura donc pas de lymphocytes B et T. L'expérience va consister à injecter un produit chimique carcinogène et comparer l'apparition de tumeurs entre les souris knock-out et les souris sauvages (souris normales). Les résultats sont très intéressants (voir *Figure I-3*), ils montrent en effet une augmentation très importante des tumeurs chez les souris insensibles à l'interféron γ et/ou ne possédant pas de lymphocytes. Le rôle du système immunitaire dans la lutte contre les tumeurs est une nouvelle fois confirmé.

Pourtant, notre système immunitaire échoue parfois à nous protéger contre l'apparition de tumeurs.

3. Échappement des tumeurs à la surveillance du système immunitaire

Pour échapper au système immunitaire, la cellule cancéreuse va développer plusieurs parades. La première tactique va consister à se cacher. Pour cela, les cellules cancéreuses auront tendance à limiter drastiquement l'expression de leurs antigènes. Si les antigènes ne sont pas présents, l'activation des lymphocytes est impossible. Dans le même esprit, la cellule cancéreuse peut bloquer l'expression de la molécule de classe I du CMH, entrainant les

mêmes conséquences que précédemment. Mais en contre partie, elle peut s'exposer à la réaction des cellules NK (Natural Killer) qui détruisent toutes les cellules ne présentant pas ou peu leur CMH de classe I [68]. Pour compliquer encore la lutte antitumorale, les antigènes tumoraux sont principalement du type AAT (Antigène Associé à la Tumeur), donc assimilés à du soi et peu immunogènes [18]. Le problème ne s'arrête pas là. En effet, pour protéger notre corps d'une attaque de notre système immunitaire contre le soi (nous-mêmes), des cellules du système immunitaire se chargent de supprimer toutes les réactions auto-immunes (contre le soi). Ces cellules sont appelées T régulateurs (T_{reg}) [69]. Ainsi, si une réaction immune cible les AAT, elle sera très probablement annihilée par les T_{reg}.

Les cellules cancéreuses ne se contentent pas de se dissimuler, elles attaquent aussi directement le système immunitaire en sécrétant des immunosuppresseurs [70]. L'immunosuppresseur le plus retrouvé dans les tumeurs est la protéine VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Cette protéine est surtout connue pour son effet angiogénique mais elle inhibe aussi les cellules dendritiques en bloquant leur maturation [71], empêchant ainsi la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Le VEGF va aussi recruter des macrophages sur le site tumoral. Cela peut paraître surprenant de recruter des cellules du système immunitaire qui pourraient dans ce cas participer à l'élimination de la tumeur. En fait, la tumeur va utiliser ces macrophages en leur faisant sécréter de puissants immunosuppresseurs comme l'IL-10 ou le TGF-β. Ces immunosuppresseurs vont en plus inhiber les lymphocytes T, en les transformant en T_{reg} [72]. Le *piège* se referme alors sur le système immunitaire.

En conclusion, la cellule tumorale est donc capable de se dissimuler parmi les cellules saines, lui permettant ainsi de se développer *paisiblement* en une tumeur de plus en plus importante. En même temps qu'elle se développe, elle va secréter des poisons visant à bloquer ou tuer le système immunitaire. Elle va aussi recruter de nombreuses cellules : macrophages, granulocytes, cellules dendritiques… Ce ne sera pas pour les détruire, mais pour les faire combattre contre leur propre camp. De cette façon, la tumeur va créer un microenvironnement propice à son développement grâce à l'angiogénèse, et en parallèle, un territoire entièrement hostile au système immunitaire.

C. *Reprogrammer* le système immunitaire pour lutter contre le cancer

Différentes techniques ont été proposées pour réactiver le système immunitaire, mais l'une d'entre elles semble particulièrement intéressante. Celle-ci est basée sur l'utilisation de cellules dendritiques. En effet, ces cellules sont dites cellules professionnelles pour la présentation d'antigènes (CPAg). On peut ainsi espérer relancer la machine immunitaire, spécifiquement contre la tumeur.

1. Stratégie immunitaire pour la lutte antitumorale

Des lymphocytes infiltrant les tumeurs (LIT) ont été découverts en analysant les biopsies de tumeurs. On s'est aperçu que ces lymphocytes étaient sensibles à des antigènes tumoraux et essayaient de lutter contre la tumeur. Pourquoi ne pas prélever alors ces LIT, les mettre en culture pour qu'ils se multiplient, et les réinjecter ensuite au patient ? L'idée était bonne, mais fallait-il encore trouver une molécule pour forcer les LIT à se multiplier. Ceci fut rendu possible à la fin des années 80 avec la découverte des propriétés de l'IL-2. Un essai clinique est lancé en 1988, portant sur 43 patients [26]. Le protocole consiste à prélever une masse tumorale d'environ $1cm^3$ et de récupérer les LIT. Ensuite, en mettant en culture ces LIT avec de l'IL-2, on obtient au bout d'une semaine, plus de 10 milliards de lymphocytes prêts à lutter spécifiquement contre la tumeur ! Il suffit maintenant d'injecter cette population cellulaire et de la doper régulièrement avec de l'IL-2 toutes les 8h pendant 2-3 jours (voir principe *Figure I-4*). Le résultat de cet essai est encourageant car 50% des patients ont vu leur cancer régresser. Hélas, tous les patients ne possèdent pas ou peu de LIT. C'est pourquoi aujourd'hui des équipes de recherche tentent de transformer n'importe quel lymphocyte T en LIT via une thérapie génique [26].

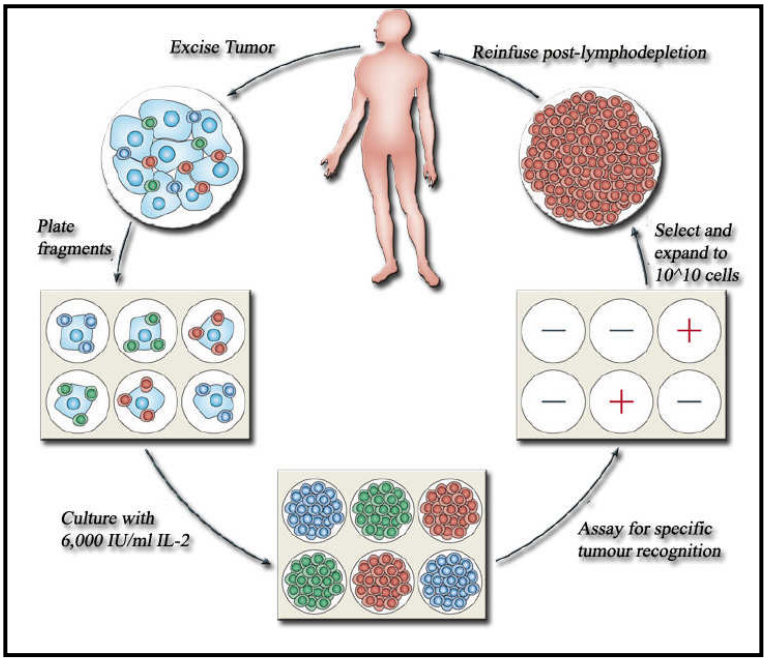

Figure I-4: Principe de la thérapie des lymphocytes infiltrant les tumeurs[Rosenberg][26].

En parallèle de ce traitement, s'est développée une thérapie très prometteuse dite de vaccins anticancéreux. Celle-ci va cibler l'activation de cellules bien particulières : les cellules dendritiques (CDs). Comme nous l'avons vu dans l'annexe I sur l'immunité, ces cellules sont la clef de l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Nous reviendrons plus en détail sur cette famille de cellules par la suite. Le but de cette thérapie est donc d'utiliser ces CPAg professionnels pour présenter les antigènes tumoraux. Cependant, il faut réussir à intégrer l'antigène tumoral dans le métabolisme de présentation antigénique de cette cellule. Pour cela, deux possibilités s'ouvrent à nous : la voie in-vivo ou la voie ex-vivo. Mais avant d'aborder ce sujet, intéressons-nous aux cellules dendritiques.

2. Les cellules dendritiques : une grande famille

Les cellules dendritiques sont découvertes une première fois en 1868 par un jeune étudiant en médecine Paul Langerhans. Après avoir coloré un tissu de peau humain, il observe d'étranges cellules en forme de branches d'arbre ressemblant aux prolongements du corps cellulaire des neurones. Il pense alors discerner des terminaisons nerveuses. Un siècle plus tard, en 1973, Ralf Steinman et Zanvil Cohn distinguent des cellules ayant une forme en étoile dans les organes lymphoïdes. Ils les appelleront cellules dendritiques et viennent sans se rendre compte, de redécouvrir les cellules décrites auparavant par Langerhans. Ces cellules sont spécialisées dans la capture d'antigènes qu'elles métaboliseront pour les présenter en des peptides antigéniques sur leur CMH de classes I et II (voir *Figure I-5*). C'est cette double présentation qui permettra ensuite d'activer les lymphocytes T contre l'antigène exposé. Pour attraper au mieux ces antigènes, les CDs sont dispatchées tout le long des tissus périphériques. Une fois l'antigène métabolisé, elles se métamorphosent pour devenir des CDs matures et migrent via le réseau lymphatique vers les ganglions (*Figure I-5*). C'est ici qu'elles trouveront probablement parmi les dizaines de millions de lymphocytes, des lymphocytes prêts à reconnaître ces peptides antigéniques. Les CDs sont aussi capables d'activer et de stimuler d'autres cellules comme les cellules NK, NKT… [73].

Néanmoins, comme elles peuvent stimuler le système immunitaire, elles sont aussi aptes à l'inhiber en guidant les lymphocytes à se changer en lymphocyte T_{reg}. Pour expliquer un comportement aussi différent, il faut prendre en compte qu'il existe toute une famille de CDs [74]. On peut citer par exemple des CDs dites de Langerhans qui sont particulièrement

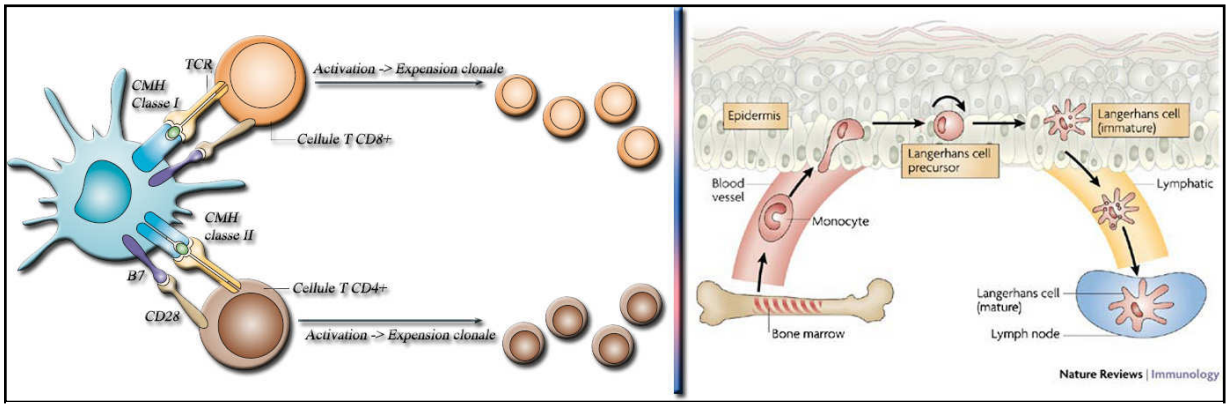

Figure I-5: A gauche : CD présentant l'antigène sur le CMH de classes I et II activant simultanément les T CD4+ et les T CD8+ (inspiré de [Gilboa][13]). A droite : la vie d'une CD évoluant en cellule de Langerhans [Shortman][43].

efficaces pour activer les lymphocytes cytotoxiques. D'autres, par contre, induisent la différenciation des lymphocytes B naïfs en plasmocytes, c'est le cas des CDs interstitielles… Le choix des CDs est donc crucial pour créer un vaccin basé sur leur utilisation. De plus, seuls les CDs matures seront à même d'entraîner l'expansion clonale des lymphocytes, si elles les trouvent. Toutefois pour mettre au point un vaccin, une quantité importante de CDs doit être prélevée sur le patient. Or, ces dernières sont principalement situées dans les tissus, et donc rares dans le sang. Heureusement, des recherches dans les années 90 ont trouvé l'un des précurseurs des CDs : les monocytes. Ceux-ci ont l'avantage d'être présents en quantité dans le sang. De plus, ces travaux ont établi un protocole pour obtenir de ces précurseurs une sous-famille de CDs de Langerhans [75, 76]. Revenons maintenant aux différentes voies proposées pour charger ces CDs, d'antigènes tumoraux.

3. La voie in-vivo

Le principe de la voie in-vivo est d'utiliser au mieux le système immunitaire du patient sans avoir recours à une plateforme de biotechnologie. Le vaccin va consister à mélanger des antigènes tumoraux (AAT ou AST) avec des adjuvants. Ces adjuvants sont là pour exacerber la réaction immunitaire et/ou pour cibler directement les CDs. On peut citer l'utilisation de protéines bactériennes comme la toxine produite par Bordetella pertussis qui cible elle aussi spécifiquement les CDs. En insérant l'ADN de l'antigène à celui de la toxine, on obtient ainsi une protéine qui une fois métabolisée par la CD permet de présenter l'antigène aux lymphocytes T [77]. Une autre technique consiste à fabriquer un adénovirus contenant le code génétique d'un antigène tumoral et de le recouvrir d'anticorps spécifiques aux récepteurs membranaires CD-40. Grâce aux anticorps, l'adénovirus va spécifiquement infecter les CDs et va ainsi induire la production de l'antigène administré. Ceci permettra par la suite de générer une réponse antitumorale des lymphocytes T [78]. Pourtant, ce type de thérapie est compromis par le mauvais état de santé des CDs qui sont mises à mal par le cancer.

4. La voie ex-vivo

Une alternative consiste à charger l'antigène dans les CDs ex vivo. Cette voie étant libérée des contraintes physiologiques du corps humain, elle permet de développer une quasi-infinité de techniques. Quelle que soit la technique utilisée, il faut dans un premier temps récupérer des cellules tumorales et des CDs chez le patient. Ensuite, il faut réussir à trouver un procédé pour présenter au mieux le ou les antigènes tumoraux. Enfin, on réinjectera au patient ces CDs modifiées en espérant que celles-ci induiront une réaction immune antitumorale. Pour réaliser ce protocole, quatre techniques bien différentes ont été mises au point.

Une première technique consiste à mettre en contact des CDs avec des cellules cancéreuses mortes ou des lysats (fragments) de tumeurs. En laissant incuber à 37°C pendant 1 heure cette solution, on récupère au final des CDs chargées avec des cellules cancéreuses. Ces CDs sont ensuite à nouveau incubées pendant 48h avec des lymphocytes naïfs, on obtient ainsi des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) actifs, prêts à lutter contre les cellules cancéreuses [74]. Toutefois, même si cette technique paraît simple à mettre en place, elle est très peu

utilisée. Un autre procédé, beaucoup plus utilisé, consiste à positionner directement l'antigène tumoral sur le CMH sans essayer de le faire métaboliser par la CD. Dans ce cas précis, on utilise un antigène tumoral bien défini. La CD une fois recouverte de cet antigène, peut ainsi induire une réponse spécifique des lymphocytes T. Cette technique a tout de même de nombreux défauts : premièrement, elle ne se concentre que sur un antigène, alors que l'on sait que les cellules cancéreuses changent rapidement les antigènes qu'elles présentent à leur surface. De plus, les antigènes produits sont CMH dépendants, c'est-à-dire qu'ils ne pourront se fixer qu'à une certaine population de CMH. Enfin, ces antigènes semblent avoir du mal à s'accrocher au CMH de class I, ce qui expliquerait leur immunogénicité faible in vivo.

Une troisième technique plus prometteuse consiste à transfecter l'ARN messager provenant de cellules cancéreuses dans la CD. Pour cela, on peut utiliser des liposomes (vésicules formées d'une bicouche lipidique) comme vecteurs [79] ou l'électroporation qui permet de perméabiliser la membrane de la cellule [80]. Cette troisième technique permet, elle aussi la présentation des antigènes sur le CMH de classes I et II et ainsi d'activer les lymphocytes T. Dans la lignée de cette technique a été développée la transfection de gènes [81]. Le but étant cette fois-ci d'insérer le code génétique d'antigènes tumoraux. On peut aussi y incorporer des gènes exprimant des immunomodulateurs (GM-CSF, IL-12…) pour *booster* la réaction immunitaire. La transfection des gènes peut se faire comme précédemment par liposomes, électroporation... ou virale via les adénovirus, les rétrovirus...

Enfin une dernière technique consiste à fusionner des cellules cancéreuses mortes avec une CD. Deux méthodes sont proposées pour fusionner ces cellules. La première est basée sur l'utilisation d'un produit chimique : le polyéthylène glycol (PEG) [82]. L'action du PEG est double : il permet tout d'abord d'accoler les cellules entre elles, puis il va déstabiliser cette zone de contact, entrainant la fusion des cellules [83]. Ce procédé de fusion est très connu car il est utilisé dans la fabrication des hybridomes (Lymphocyte B/myélomes) pour produire des anticorps monoclonaux en grande quantité [84]. La deuxième méthode, apparue plus tard, utilise l'interaction entre les cellules et les champs électriques [1, 85]. Un premier champ alternatif va mettre en contact les cellules entre elles, c'est la diélectrophorèse. Puis de fortes impulsions électriques vont être appliquées pour fusionner les cellules, c'est l'électrofusion. Ces deux techniques ont fait leur preuve pour permettre la présentation aussi bien des antigènes sur le CMH de classes I et II [86, 87].

Mais quelle est la technique la plus efficace ?

5. Considérations sur le choix de la technique pour mener au mieux la présentation des antigènes tumoraux.

Plusieurs travaux montrent que l'électrofusion semble une des voies les plus intéressantes à suivre. Ces travaux comparent l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (LTCs) suite à une présentation d'antigènes tumoraux via des CDs stimulées de différentes manières. Ces diverses techniques sont : des CDs mises en culture soit avec des lysats de tumeur soit avec des cellules tumorales vivantes ou mortes, et enfin des CDs fusionnées avec

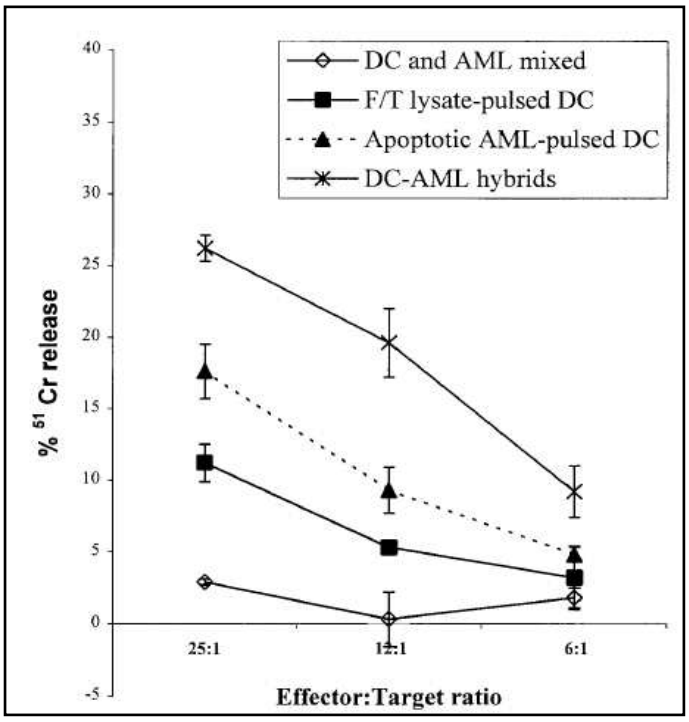

Figure I-6: Réponse des LTCs contre des cellules cancéreuses (blastes leucémiques myéloïdes AML) induits par quatre techniques différentes de chargements de l'antigène dans les CDs. Le ratio LTC/AML est testé dans trois conditions [Galea-Lauri][39] .

des cellules tumorales mortes ou vivantes (PEG ou électrofusion). Analysons ces différentes études en détail.

La première étude réalisée en 2002 est très complète, elle compare en effet toutes les techniques : cellules cancéreuses vivantes ou mortes (apoptotiques), lysats et hybridomes [39]. Notons cependant que l'hybridome CD/Cellule tumorale morte est fusionné à l'aide de PEG. L'expérience consiste tout d'abord, à mettre des LTCs en culture avec des CDs chargées en antigènes tumoraux de différentes manières. Puis, pour prouver que les LTCs sont bien activés, ils sont ensuite mélangés avec des cellules cancéreuses chargées en Cr^{51} radioactif. Si les LTCs reconnaissent des antigènes tumoraux ils détruiront ces cellules et du coup, la concentration de Cr^{51} augmentera dans le surnageant du milieu de culture (voir *Figure I-6*). Les résultats de ces expériences montrent sans ambiguïté que les LTCs les plus actifs sont ceux induits par l'hybridome CD/cellule cancéreuse. Ainsi, l'hybridome est plus actif de ~54% par rapport aux lysats et de ~37% par rapport aux cellules cancéreuses apoptotiques.

Un an plus tard, une expérience du même type va comparer l'activation des LTCs face à des cellules cancéreuses (ici des lymphocytes B leucémiques, ou B-CLL) induites par des CDs chargées via lysats, cellules B-CLL vivantes, ou par électrofusion avec B-CLL vivantes [38]. Cette fois-ci, pour quantifier l'activité des LTCs sur les cellules cancéreuses, Goddard et al utilisent un cytomètre de flux qui va mesurer le ratio de cellules mortes versus cellules vivantes. Comme précédemment, la cytotoxicité sur les cellules cancéreuses est la plus élevée lorsque les LTCs sont induits par un hybridome (*Figure I-8*). Si l'on rapproche ces résultats avec ceux qui précèdent, on retrouve pour un ratio de 25 : 1 une augmentation quasi similaire (~56%) entre hybridomes et lysats.

En 2004, une équipe travaillant sur des cuvettes développées pour l'électrofusion, compare l'activité des CDs chargées en antigènes tumoraux lorsque des LTCs interagissent avec ceux-ci [36]. Pour quantifier la réaction, ils mesurent l'INF-γ qui est produit dans le surnageant du milieu de culture, via une analyse ELISA. Ce milieu de culture est constitué soit du produit de fusion (hybridomes, cellules cancéreuses mortes, CDs) ou de CDs et de cellules cancéreuses mortes ou seulement de CDs ou enfin juste avec des cellules cancéreuses

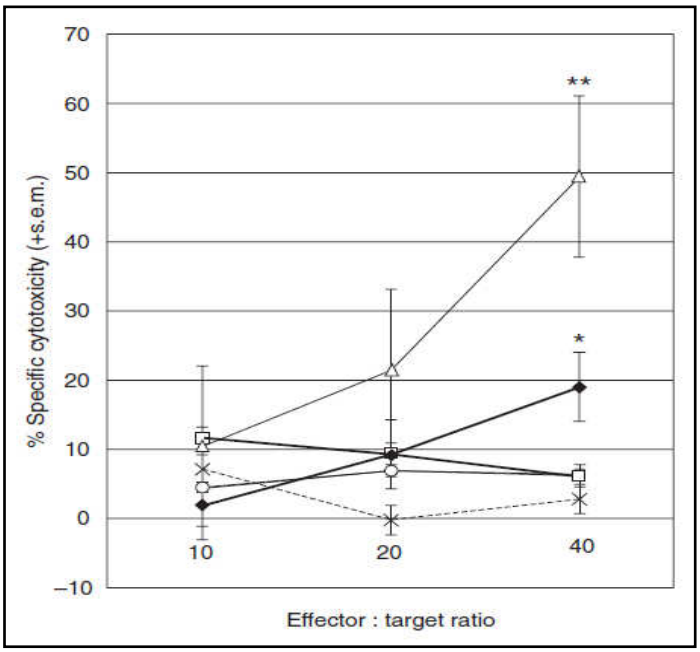

Figure I-8: Comparaison de réactions entre LTCs et B-CLL suite à une induction des LTCs par CDs chargées via : lysats (♦), cellules B-CLL vivantes (×) ou électrofusionnées avec B-CLL (Δ). Contrôle : LTCs mis en culture sans DC mais avec lysats(□) ou sans rien (○). Résultat en fonction de trois ratios différents. *P=0,0037,P=0,013 [Goddard][38].**

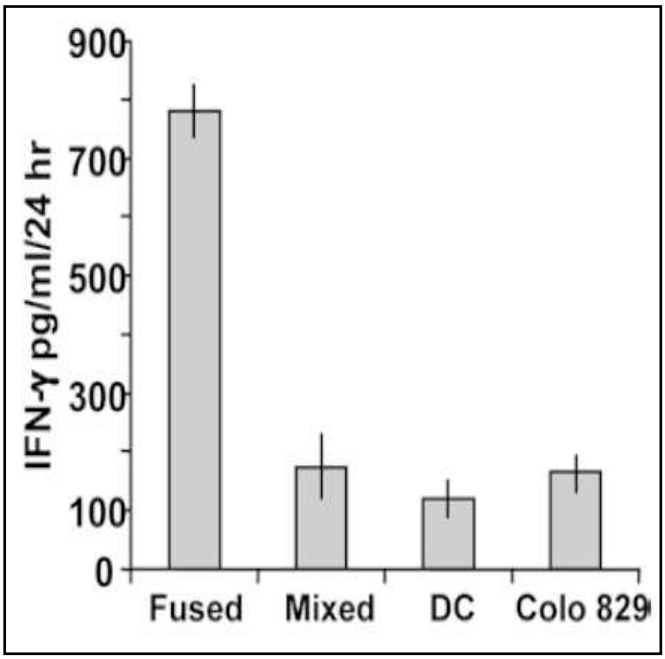

Figure I-7: Quantité d'INF-γ produite lors de l'interaction LTCs avec hybridomes (électrofusion CD/Colo 829 mort) ou avec CDs mixées avec Colo 829 mortes ou avec juste des CDs ou avec simplement des Colo 829 [Trevor][36].

mortes (mélanome Colo 829). Même conclusion qu'auparavant : c'est l'hybridome qui a la réaction immunitaire la plus importante (voir *Figure I-7*). Cette étude analyse aussi la différence de production d'INF-γ des LTCs excités par un hybridome CD mature/Colo 829 et un hybridome CD immature/Colo 829. Les hybridomes formés avec les CDs matures engendrent une expression de l'INF-γ produite par les LTCs trois fois supérieure à celles des CDs immatures.

Nous finirons sur cette étude publiée en 2005 qui a comparé l'efficacité d'un vaccin formé avec un hybridome ou avec une CD pulsée avec des lysats sur des souris [30]. Cette expérience est importante car c'est une étude in-vivo. Toutefois les hybridomes sont obtenus par l'utilisation de PEG. Notons que les hybridomes sont irradiés avant injection alors que les CDs pulsées avec des lysats de tumeurs sont injectées vivantes. L'irradiation des hybridomes permettrait d'éviter leur prolifération. Le vaccin par hybridome s'avère être largement plus efficace pour soigner les souris que le vaccin produit avec des CDs/Lysats (voir *Figure I-9*). Une étude plus récente débouche sur les mêmes résultats [88]. Cette même équipe a confirmé il y a peu, un résultat assez improbable : l'utilisation de CDs allogéniques ou semi-allogéniques dans les hybridomes offre une protection supérieure aux CDs autogéniques [89]. Ces dernières études restent à prouver chez l'homme, mais offrent des perspectives intéressantes car il serait alors possible de prendre des CDs venant de n'importe quel donneur.

Il ne fait aucun doute que la vaccination via un hybridome d'une CD avec une cellule cancéreuse morte soit la voie la plus intéressante dans une stratégie d'immunothérapie du cancer. Par contre, nous manquons de données pour juger de l'efficacité entre un hybridome

irradié et un hybridome à moitié vivant (seule la cellule cancéreuse est irradiée). Lors de cette étude, nous n'avons pas discuté des techniques de transfection d'ARN ou de gènes. Ceci s'explique par l'inexistence d'articles comparant ces deux procédés (hybridome vs transfection ADN/ARN). Il est probable que la divergence des stratégies de ces deux techniques, l'une essayant d'insérer des antigènes et l'autre de les faire synthétiser, explique le manque d'études comparatives.

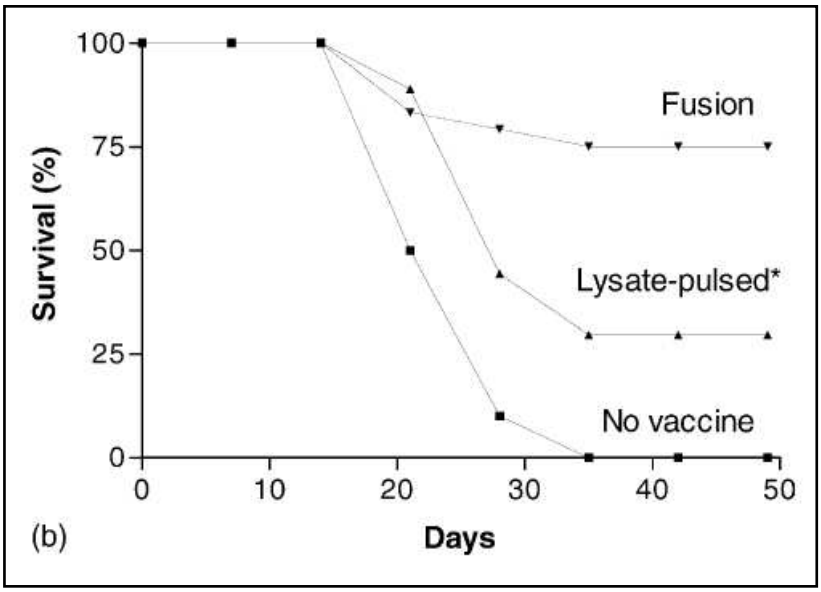

Figure I-9: Taux de survie des souris atteintes d'une tumeur implantée (cancer du colon, CT26) après injection ou non d'un vaccin à base d'hybridomes (Fusion) ou des CDs pulsées par des lysats [Kao][30].

6. Les essais cliniques ?

Les hybridomes formés d'une cellule dendritique et d'une cellule cancéreuse ont montré leur intérêt thérapeutique. Quatre ans après ces premières expérimentations, un premier essai clinique est lancé. Il est rare de trouver un principe thérapeutique qui passe aussi rapidement à l'expérimentation clinique. Malheureusement, les essais cliniques basés sur les vaccins constitués d'hybridomes restent décevants pour l'instant. Toutefois, les connaissances engrangées par les différents essais cliniques permettent d'affiner la recherche dans ce domaine.

Il y a eu à peu près une dizaine d'essais cliniques à base d'hybridomes résultant de la fusion entre une CD et une cellule cancéreuse. On peut citer quatre essais utilisant le PEG [90-93] et trois essais basés sur l'électrofusion [94-96]. Le protocole suivi est assez similaire. La plupart administrent le vaccin en sous-cutané au plus près d'un ganglion et de la tumeur. Les patients reçoivent environ quatre doses de vaccin avec un mois d'intervalle en moyenne. Lors de ces essais, l'une des principales craintes dans cette thérapie était d'entraîner une réaction auto-immune en favorisant la présentation d'antigènes du soi sur le CMH de classe II. Heureusement, tous ces essais rapportent que le traitement est sans effet secondaire. De plus, il a induit chez un grand nombre de patients une réponse du système immunitaire (synthèse d'IFN-γ, d'IL-12…). Enfin, pour certains des patients, une réponse antitumorale

partielle ou exceptionnellement totale a été observée. Lors des essais cliniques, de nombreuses équipes ont manqué de CDs pour vacciner leurs patients. C'est pourquoi elles se sont tournées vers l'utilisation de CDs allogéniques facilement disponibles chez des donneurs sains. Ce choix n'a en rien changé les conclusions faites précédemment. Pour essayer d'améliorer la réponse antitumorale, les dernières études tendent à ajouter des adjuvants à leurs vaccins en particulier en injectant après celui-ci de l'IL-2. Ceci n'a pas pour autant amélioré le pronostic. Comment expliquer une si faible réponse antitumorale ?

Comme rappelé précédemment, la tumeur sait habilement mettre le système immunitaire en défaut en étant peu antigénique et fortement immunosuppressive. Mais ce n'est pas le seul problème, les patients traités dans ces essais cliniques sont aussi très immunodéprimés suite aux multiples radiothérapies et chimiothérapies. D'autre part, une étude a révélé que très peu de CDs (~1%) injectées migrent dans les tissus lymphatiques [97]. Si en plus, l'hybridome est irradié, on peut facilement penser qu'il aura encore plus de mal à migrer. Tous ces éléments peuvent expliquer en partie le faible impact thérapeutique de la vaccination contre la tumeur.

Tout au long des différentes expérimentations, les deux techniques de fusion PEG et électrofusion semblent aussi efficaces [98].

7. PEG ou Electrofusion ?

Le PEG est utilisé maintenant depuis plus de 30 ans. Il est donc bien connu des biologistes, des cliniciens, mais aussi des industriels. Cependant l'utilisation de cette molécule présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, le PEG est particulièrement cytotoxique entraînant un rendement assez faible entre 0,5% et 5%. Pourtant, des équipes annoncent parfois des rendements de l'ordre de 20 à 30% [30]. Ces résultats sont en fait un artéfact de mesure dû au principe du FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting). Cet appareil permet de séparer deux espèces ou plus de cellules selon leur fluorescence. Ainsi, en marquant des cellules en rouge et d'autres en vert on pourra à l'aide de cette machine, séparer les cellules rouges, vertes et jaunes dans des containers différents. Les cellules jaunes (rouge + vert) seront des cellules fusionnées ou des cellules fortement accolées. Or, le PEG a la particularité de coller les cellules entre elles. Il faut donc rester critique face aux informations issues d'un FACS. A ce titre, pour confirmer un rendement de fusion (PEG ou Electrofusion), de nombreuses équipes couplent le FACS à une analyse par microscope à fluorescence [49, 87]. Les problèmes liés à l'utilisation du PEG ne s'arrêtent pas à sa nocivité. Les expériences basées sur son utilisation sont aussi peu reproductibles, compliquant grandement sa standardisation pour une utilisation clinique à grande échelle. Enfin, il est difficile d'adapter une technique de fusion au PEG pour former un hybridome donné, le protocole sera le même pour tous.

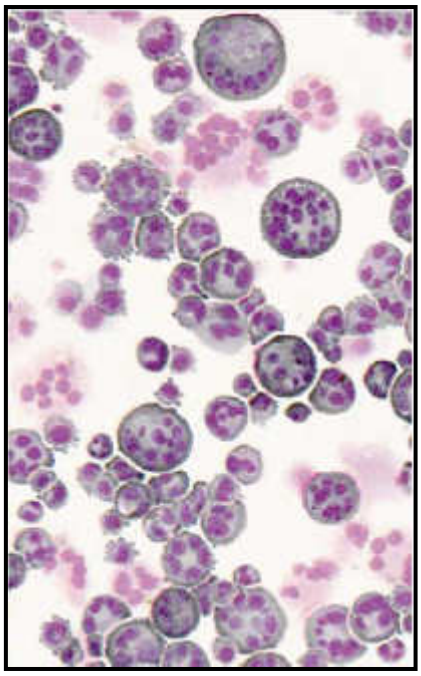

Figure I-10: Hybridomes formés par électrofusion. Les noyaux des cellules sont marqués en violet [Tanaka][23].

L'électrofusion apporte un grand nombre d'avantages par rapport au PEG et se révèle du coup une alternative intéressante. En effet, les rendements sont plus importants, entre 10 et 20%. De plus, cette méthode est facilement standardisée et elle est adaptable aux différentes familles de cellules à fusionner. Son principal désavantage face au PEG est la nécessité d'acheter un nouvel équipement électronique délivrant à la fois un signal électrique alternatif et des pulses électriques programmables de hautes tensions.

Enfin, si l'on regarde les hybridomes formés à l'aide de cette technique d'électrofusion basée sur l'utilisation d'une cuvette macroscopique encadrée par deux électrodes (voir *Figure I-10*). On constate que les hybridomes ainsi constitués sont formés en moyenne d'au moins cinq à huit cellules. On peut se demander si ce type d'hybridomes est réellement viable biologiquement parlant. Il serait donc pertinent de comparer l'activité d'un hybridome produit de la fusion entre deux cellules exclusivement et ces *mastodons* cellulaires. En effet, si une différence notable est mesurée, elle expliquerait en partie la faible action antitumorale des vaccins produits de cette façon puisque, seule une infime partie des hybridomes est le résultat de la fusion entre seulement deux cellules.

L'électrofusion se révèle une voie très intéressante pour fusionner des hybridomes mais elle n'est pas sans défaut comme nous venons de le voir. Pourtant, l'arrivée des microtechnologies pourraient améliorer grandement ces perspectives d'utilisations. En effet, les microsystèmes, de part leur taille, permettent d'espérer un contrôle à l'échelle cellulaire. Ainsi, on peut espérer augmenter sensiblement le rendement d'hybridomes formés de la simple fusion entre une CD et une cellule cancéreuse. Deuxièmement, de part leurs dimensions spatiales réduites, ils seraient un outil d'observation hors pair pour regarder en détail l'évolution de la fusion entre deux cellules.

D. Conclusion

Notre système immunitaire lutte tous les jours contre les cellules cancéreuses. Pourtant, il arrive que certaines cellules cancéreuses passent au travers des mailles du filet. Ces cellules ont pour la plupart développé de nouvelles aptitudes leur permettant de se subtiliser à la surveillance du système immunitaire ou encore, de l'inhiber. Il semble donc pertinent de relancer le système immunitaire contre la tumeur en le forçant à détecter ce qui lui était caché. C'est le principe de l'immunothérapie du cancer. Dans ce cadre, l'utilisation de CDs s'est révélée particulièrement efficace lors de tests in vitro et in vivo chez la souris. Ces CDs sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, qui jouent un rôle clef dans l'activation du système immunitaire adaptatif. Leur utilisation en immunothérapie consiste à leur faire présenter de force ou naturellement des antigènes tumoraux, puis de les injecter aux patients pour stimuler les lymphocytes T contre ces antigènes. De nombreuses études convergent pour dire que la présentation est plus efficace quand on fusionne ces CDs avec des cellules tumorales. C'est sur cette base que des essais cliniques ont été lancés. Leurs résultats n'ont pas donné lieu à une guérison généralisée des patients, mais ont permis de montrer l'innocuité du traitement et une activation des lymphocytes T. Cependant, cette activation n'a pas suffi pour éradiquer les tumeurs. Dernièrement, de nouveaux essais ont été lancés en ajoutant des adjuvants pour stimuler les lymphocytes, mais ces essais se sont montrés infructueux. La mise en œuvre d'une trithérapie basée sur des hybridomes, des stimulants et des anti-immunosuppresseurs est peut être une voie prometteuse. En parallèle, les microtechnologies permettront la production d'hybridomes de meilleure qualité et ouvriront surement des perspectives encore insoupçonnées.

II. Chapitre II : Microsystèmes

A. Introduction

Nous avons fini le chapitre précédent sur le souhait de développer un système qui permettrait d'obtenir avec un grand rendement des hybridomes résultants de la fusion entre une cellule dendritique et une cellule cancéreuse. Pour cela, nous proposons d'utiliser les microtechnologies qui regroupent un ensemble de technologies apparues il y a une quarantaine d'années. Ces technologies sont dérivées de la microélectronique et permettent la conception de MEMS (*Micro Electrical and Mechanical System*[2]).

Il est coutumier de dire que l'histoire des microsystèmes commence en 1959, avec le discours visionnaire de Richard Feynman (1918-1988). Son exposé s'intitule : « *There is plenty of room in the bottom*[3] », le ton est donné [99]. Comme à son habitude, Feynman va tout d'abord sensibiliser son auditoire sur l'intérêt d'aller travailler dans le monde microscopique et nanoscopique. Pour cela, rien de tel qu'un défi, maintenant devenu célèbre, écrire la totalité de l'encyclopédie Britannica sur une tête d'épingle. Comment faire ? Simplement en écrivant des lettres 25 000 fois plus petites et le tour est joué. Mais comment écrire aussi petit ? En se servant d'un faisceau d'électrons ou d'ions fortement focalisés (principe aujourd'hui de la lithographie électronique). Si cette technique n'est pas assez rapide, utiliser le principe du pochoir avec un masque composé de trous en forme de lettre et vaporiser des ions métalliques (principe du *shadow masking*). Comment lire ce texte? En se servant d'un microscope électronique… Dans cet exemple, Feynman suppose que la résolution d'un pixel (ou d'un bit) est d'environ 35 atomes par 35 atomes, soit une surface comprenant approximativement 1000 atomes (10 nm^2). Il fait remarquer aux plus septiques que pour l'ADN, le bit élémentaire n'est formé que de 50 atomes. Si la biologie arrive à faire vingt fois mieux, il paraît donc envisageable de réaliser un tel procédé. D'autant plus, qu'aucune loi physique ne prétend que cela soit impossible.

Pour l'instant, l'univers de Feynman nous projette dans un nanomonde. Mais sa pensée ne s'arrête pas là, il propose aussi (via l'idée d'un ami, Albert R. Hibbs), de fabriquer des micromachines pour soigner et observer l'intérieur de notre corps, le tout commandé à l'extérieur par un chirurgien. Il propose de créer une *micromain outil*. Le principe est le suivant : il suffit de réaliser une main outil la plus petite possible, mais commandable à notre échelle. Puis à l'aide de cette première main, l'utiliser pour concevoir une main outil encore plus petite et ainsi de suite… L'idée peut paraître enfantine, mais encore aujourd'hui et malgré les avancées technologiques, nous n'avons pas encore réussi à concevoir une telle main outil. Feynman finit son exposé en proposant deux prix de 1000$. Le premier prix sera accordé à la première personne qui arrivera à écrire une page d'un livre sur une surface 25 000 fois plus petite. Le deuxième prix reviendra à la première personne qui fabriquera un moteur électrique d'environ $400\mu m^3$. Il s'attend alors à recevoir des prétendants très rapidement. Malheureusement, ces deux records ne seront atteints qu'un an après sa mort, soit

[2] Microsystème Electrique et Mécanique
[3] « Il y a beaucoup de place dans le fond » (comprendre infiniment petit)

30 ans après la conférence. Le premier challenge sera rendu possible avec l'apparition des premiers disques durs basés sur la magnétorésistance en 1989. Le second défi aboutira la même année avec l'équipe de Tai et Muller [100]. Pourquoi tant de temps entre le rêve de Feynman et sa réalisation ?

Malgré l'évidence du discours de Feynman (pour un scientifique d'aujourd'hui), il n'est pas facile de convaincre toute la population scientifique du domaine de basculer dans les micro et les nanotechnologies. D'autant plus que ces nouvelles technologies demandent un équipement moderne et donc des investissements importants. Il faudra attendre une vingtaine d'années et l'avènement des circuits intégrés à base de transistors pour que les MEMS puissent débuter leur lancement. En effet, les MEMS utilisent en grande partie les technologies développées à la conception des transistors : photolithographie, métallisation, oxydation… Ils peuvent donc profiter des installations déjà existantes pour commencer à émerger. Les premiers travaux novateurs apparaissent en 1975 avec Terry. Celui-ci met au point un chromatographe à gaz miniaturisé, basé sur une technologie silicium [101]. Il ne se contente pas de miniaturiser seulement la colonne de séparation, mais aussi la sonde de mesure et la vanne d'injection des gaz. Il intègre ainsi simultanément de la microfluidique, de la microélectronique et de la micromécanique. Cette miniaturisation lui permet d'augmenter la sensibilité et la rapidité de ses mesures. Il vient de concevoir le premier laboratoire sur puce (LOC[4]). Ces travaux vont rester dans l'ombre pendant une dizaine d'années au détriment des MEMS. Ceux-ci vont littéralement profiter de l'explosion de la microélectronique dans les années 1980 avec la fabrication des premières poutres [102], moteurs [100], accéléromètres [103]… Ce déluge de découvertes et d'optimisations des techniques de fabrication va relancer l'attrait des LOCs, et non pas seulement dans la chromatographie, mais aussi pour réaliser des micromélangeurs, des microréacteurs chimiques, des systèmes d'amplification de l'ADN (pour les références voir [3])… Parallèlement, les MEMS vont connaître leurs premières réussites économiques via les détecteurs d'Air Bag et les têtes d'imprimantes à jet d'encre.

Aujourd'hui, les MEMS ont continué leur expansion et représentaient en 2006 un chiffre d'affaires de 7 milliards $. Juste avant la crise économique, on prévoyait encore une augmentation annuelle de 5%, voire 10% en 2010. Depuis les années 90, les MEMS ont beaucoup évolué, et ceux qui n'étaient alors qu'une sous-famille des MEMS sont devenus des thématiques de recherche à part entière. Ainsi, les bio-microsystèmes et par extension les LOCs ont maintenant leurs propres conférences (µTAS…) et leurs journaux (« Lab on a Chip » chez RSC Publishing…). Ceci a pour conséquence directe d'augmenter considérablement le nombre de publications dans le domaine (Figure II-1). De ce fait, il serait trop fastidieux et trop long de présenter un état de l'art complet des bio-microsystèmes. Nous centrerons donc notre recherche bibliographique sur deux types de microsystèmes :

- Ceux permettant de manipuler des cellules et de les placer avec précision,
- Et ceux permettant de fusionner des cellules.

[4] Lab On a Chip

Ensuite, nous verrons un aperçu des différentes techniques de fabrication mises en place pour réaliser ce type de bio-microsystème. Nous allons tout d'abord nous intéresser aux phénomènes ayant lieu à l'échelle micrométrique.

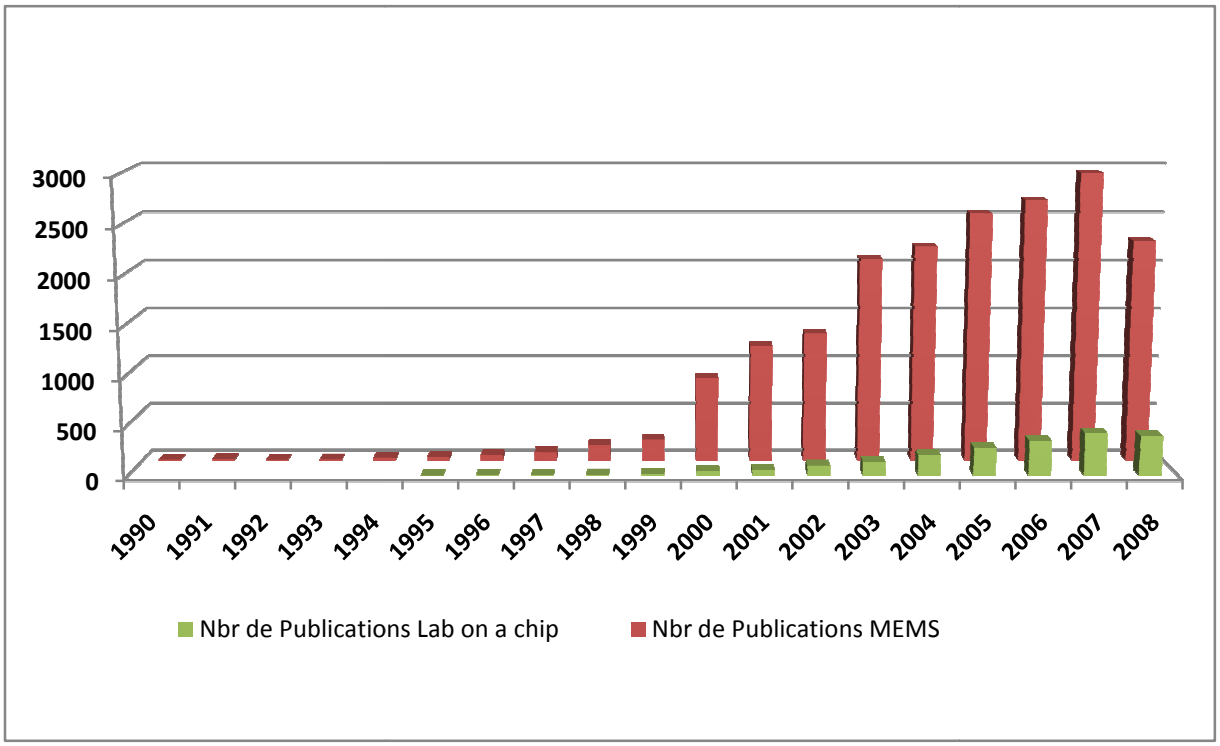

Figure II-1 : Nombre de publications recensées par année comprenant le terme 'MEMS' ou 'Lab on a Chip', issues de ISI Web of Knowledge.

B. Intérêts et enjeux des bio-microsystèmes

1. Introduction

Les bio-microsystèmes font rêver à la fois les chercheurs et les investisseurs, mais peut-être pas pour les mêmes raisons. Il est vrai que les perspectives de recherche semblent infinies ; le domaine étant encore relativement jeune, il est aisé d'avoir une idée novatrice sans que celle-ci soit déjà développée par une autre équipe. En même temps, les perspectives économiques sont considérables, car les applications pourraient révolutionner le milieu médical via des dépistages et des diagnostics plus rapides ainsi que par des nouveaux traitements. Certaines applications ont déjà franchi la barrière du monde réel et sont commercialisées. La plus connue du grand public est sans aucun doute la puce à ADN, qui permet de connaître très rapidement l'expression des gènes exprimés chez un être humain. Il existe évidemment bien d'autres puces, comme celles de la compagnie Biosite (*Figure II-2*). Une de ces puces, basée sur une technologie microfluidique, analyse à l'aide d'une simple goute de sang la présence ou non de protéines synthétisées lors d'une crise cardiaque. Ce diagnostic ne prenant que 15 minutes, il permet au médecin d'adapter très rapidement son traitement suite à l'arrivée d'un patient ayant subi un malaise. Ces puces ne sont pour l'instant que les prémices des futurs LOCs, car elles ont encore besoin d'être couplées à un système d'analyse et de traitement des données.

Si l'on recherche par contre, une puce commercialisée et dédiée aux cellules, on ne trouve qu'une simple puce de la compagnie Agilent. Celle-ci a pour fonction de compter une population de cellules préalablement marquées (principe du cytofluorimètre). Comme précédemment, le niveau d'intégration est limité puisqu'il faut coupler cette puce à un

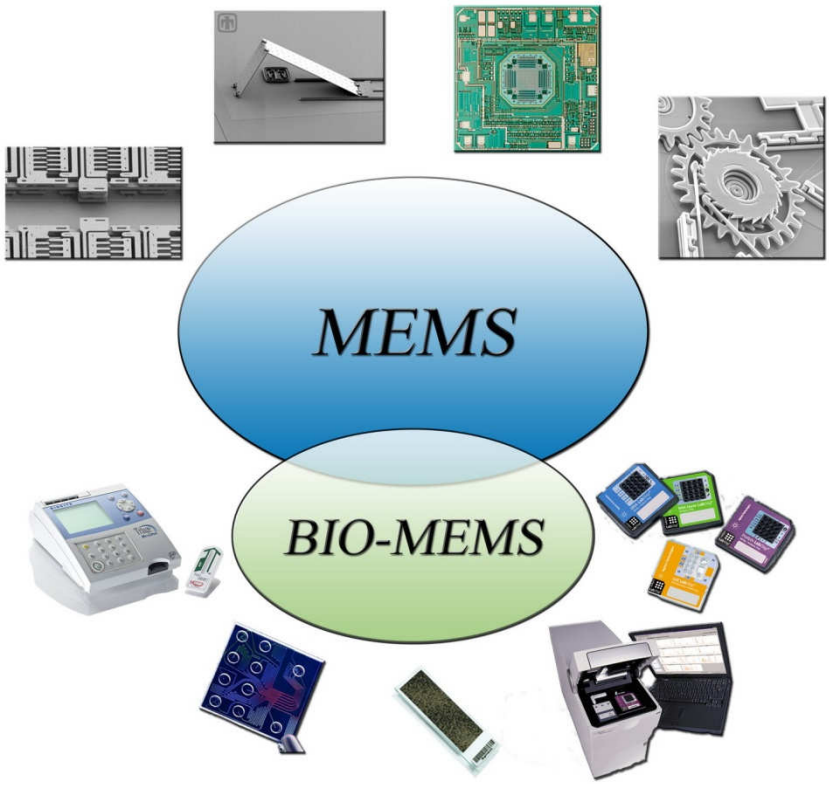

Figure II-2 : En haut, différents exemples d'applications MEMS (accéléromètre, micro-miroir, accéléromètre intégré avec son électronique, et engrenage). En bas, exemple de sous-famille des MEMS : les BIO-MEMS (Puce Biosite et son lecteur, puce microfluidique, puce ADN, puces Agilent avec son lecteur)

système annexe. A l'opposé, lorsque l'on regarde du côté de la recherche, on trouve un grand nombre d'articles sur le sujet. On peut classer ces microsystèmes à cellules en différents domaines d'applications : culture, traitement chimique, traitements physiques (électroporation, électrofusion ou lyse), sélection et enfin analyse [104]. Regardons en détail les avantages de la miniaturisation dans le développement de tels systèmes.

2. Un monde microscopique

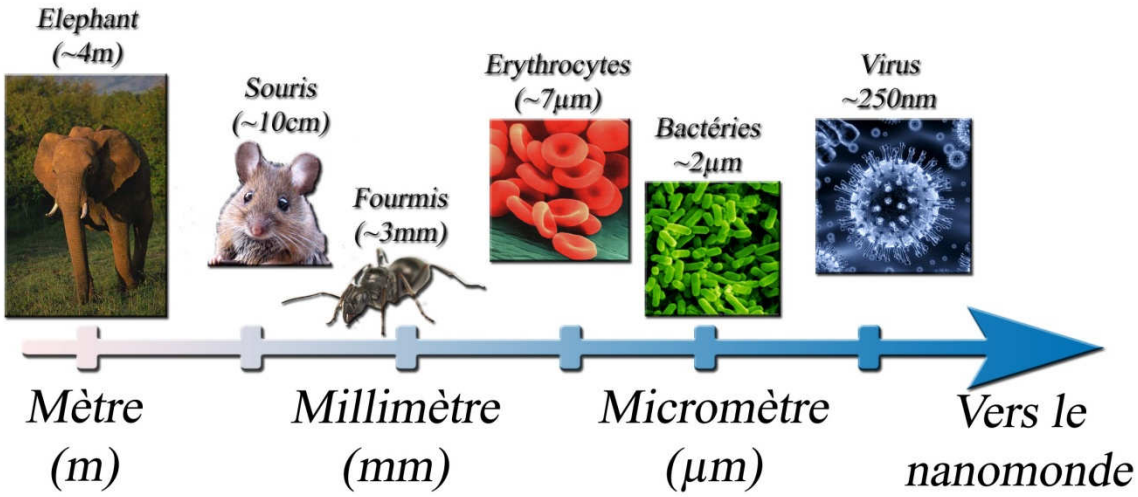

Figure II-3 : Ordre de grandeur de différentes entités biologiques

Le monde microscopique n'est pas si éloigné de notre monde macroscopique (voir Figure II-3). Ainsi si l'on prend un cheveu, son diamètre est de l'ordre de 200µm et pourtant, nous sommes capables de le voir. Il est vrai que le fait qu'il soit très long nous aide à le discerner. Toutefois les lois d'échelles vont grandement influencer les grandeurs physiques, commençons par prendre l'exemple de la gravité.

Si l'on nomme L la longueur caractéristique d'un objet. La masse M de cet objet sera proportionnelle à son volume V, d'où :

$$M \sim V \sim L^3$$

De ce fait, la force de gravité P suivra elle aussi, une loi d'échelle en L^3 :

$$P \sim M \sim L^3$$

Ainsi, une cellule avec un diamètre de 10 µm ressentira une force de gravité 1 milliard de fois plus faible qu'une goutte d'eau ayant un diamètre de 10mm.

D'un autre côté, si l'on s'intéresse à la force de capillarité, c'est-à-dire à la force résultant de l'interaction entre un solide et un liquide, la force de capillarité (F_c) suit la relation suivante pour une tension de surface donnée :

$$F_c \sim L^1$$

D'où, si l'on reprend le même ordre de grandeur que précédemment, on s'aperçoit que la variation de la force de capillarité est cette fois-ci, seulement mille fois plus faible. C'est cette différence de variation entre la force de gravité et la force de capillarité qui explique pourquoi les gerridés (connus sous le nom d'araignées d'eau) arrivent à rester à la surface de l'eau sans couler (Figure II-4), la force de capillarité étant à cette échelle plus forte que la force de gravité. Ainsi, dans un monde micrométrique, si l'on est soumis à deux forces, celle associée à l'exposant le plus faible sera prépondérante (voir Tableau II-1).

Grandeur	Loi d'échelle
Force de Van de Walls intermoléculaire	L^{-7}
Densité de force de Van der Walls entre interfaces	L^{-3}
Temps	L^{0}
Force capillaire	L^{1}
Distance	L^{1}
Vitesse d'écoulement	L^{1}
Puissance thermique transférée par conduction	L^{1}
Volume	L^{3}
Masse	L^{3}
Force de gravité	L^{3}
Force magnétique sous champ extérieur[5]	L^{3}
Force magnétique sans champ extérieur	L^{4}
Puissance électrique motrice	L^{3}
Force centrifuge	L^{4}

Tableau II-1 : Lois d'échelle pour différentes grandeurs physiques [Tabeling][3].

Ce tableau nous indique par exemple qu'une micropoutre sera très peu sensible à la force d'inertie (L^4). Cela signifie que des petites vibrations seront difficilement mesurables, alors qu'un choc très violent engendrera un mouvement de la poutre, facilement mesurable. C'est ce principe qui est utilisé par les détecteurs de choc pour enclencher les Air Bag. Par contre, lors de la fabrication de tels détecteurs, il faut veiller à ce qu'aucune goutte d'eau ne vienne se glisser sous la poutre, sous peine de coller le dispositif et de l'empêcher ainsi de se mouvoir, même en cas de choc violent. Ces dispositifs sont encapsulés sous vide à la fin du procédé de fabrication, principalement pour les protéger de l'humidité.

D'autres forces vont profiter de ce phénomène de miniaturisation, tout particulièrement les forces liées au champ électrique (E). En effet, le champ électrique est égal à la tension appliquée entre deux électrodes, divisée par la distance qui les sépare. Ainsi, l'application d'une tension de 10V entre deux électrodes espacées de 1cm produira un champ $E=10V/cm$. La même tension pratiquée entre deux électrodes, éloignées de seulement 10µm, donnera lieu à un champ de $E=10kV/cm$ (soit mille fois plus). La miniaturisation est donc favorable à l'augmentation du champ électrique pour une tension donnée. Les forces liées aux champs électriques auront donc un rôle à jouer à cette échelle. C'est le cas par exemple de la force d'électrophorèse (F_{EP}) et de la force de diélectrophorèse (F_{DEP}). Ces forces sont respectivement proportionnelles à $F_{EP}\sim VL^{-1}$ et $F_{DEP}\sim V^2L^{-3}$ [27] (nous reviendrons en détail par

Figure II-4 : A gauche, gerridés profitant de la force de capillarité [Wikipedia][4]. Exemples d'écoulement laminaire : au centre glacier Aletsch [4] et à droite micromélangeur [Dertinger][48].

[5] On suppose que la densité de courant produisant le champ magnétique est fixée

la suite sur ces équations).

Nous finirons sur le comportement des écoulements de fluide dans des microcanaux. A l'échelle macroscopique, les fluides ont la possibilité de s'écouler selon deux régimes distincts : le régime laminaire ou le régime turbulent. Pour déterminer si le fluide s'écoule selon tel ou tel régime, on utilise le nombre de Reynolds (R_e) qui est le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité.

$$\boldsymbol{Re} = \frac{\boldsymbol{inertie}}{\boldsymbol{viscosité}} = \frac{\boldsymbol{Lv}}{\boldsymbol{\eta}} \quad (\textit{Équation II-1})$$

Avec, η la viscosité du fluide ($m^2.s^{-1}$), v sa vitesse ($m.s^{-1}$) et L la largeur du canal (m). La frontière entre l'écoulement laminaire et l'écoulement turbulent se situe pour des valeurs de R_e de l'ordre de 2000. Dans le cas de microcanaux, à la vue des très faibles dimensions, le nombre de R_e n'excède pas 10^{-1}. L'écoulement dans les microcanaux est donc, sauf exception de type laminaire [3] (*Figure II-4*). Les flux laminaires ne sont pas l'apanage du monde micrométrique. Ainsi à l'échelle macroscopique, un fluide très visqueux et très lent, par exemple un glacier, aura lui aussi un faible R_e et aura donc un écoulement laminaire (*Figure II-4)*.

À travers ces différents exemples, nous comprenons l'intérêt de miniaturiser un système pour atteindre une échelle, où des forces avant mineures, deviennent prédominantes. Les nouveaux équilibres entre forces doivent être ainsi réexaminés.

3. Opportunités de la miniaturisation et de la parallélisation

Le premier avantage de la miniaturisation est d'interagir localement et donc de commander ou mesurer un phénomène précis. Le deuxième avantage est de pouvoir répéter un très grand nombre de fois un motif donné. Concrètement, lorsque l'on cherche à interagir avec une cellule par exemple, nous allons concevoir une structure de base à son échelle. Ensuite, l'intérêt est le plus souvent de reproduire le phénomène recherché à d'autres cellules avec les mêmes ou différentes conditions. Ainsi, on augmentera les observations et/ou la production de cellules modifiées. Pour réaliser cela, on va donc dupliquer cette structure microscopique des milliers ou des millions de fois selon les besoins et la surface allouée. C'est le principe de la parallélisation. Un autre avantage découle simplement de la miniaturisation est la capacité d'intégrer une multiplicité de fonctions sur la même puce. On conçoit alors un laboratoire en modèle réduit (*Lab On a Chip*).

Ces avantages ont pour conséquence directe de minimiser les coûts de production et d'exploitation. En effet, plus le dispositif est petit, plus on peut en produire sur une surface donnée. Ceci permet d'accélérer la production en grande série et par la même occasion, de réduire le prix à l'unité. De plus, la réduction des échelles diminue fortement la consommation de réactifs et d'énergie. Tout ceci facilite la portabilité du dispositif, autorisant ainsi à faire des tests au plus près de la demande : dans une ambulance, dans des zones difficilement accessible… Pour la recherche, la parallélisation engendre un gain de temps en cumulant le nombre de tests. Enfin, en limitant le nombre de manipulations suite à l'intégration de plusieurs systèmes, on réduit le temps de diagnostic et on améliore la sécurité, en minimisant la manipulation de produits dangereux.

Quelques questions restent en suspend : Notamment la réutilisation de ces dispositifs et leur recyclage.

4. Conclusion

Les microsystèmes ont un potentiel socioéconomique important de part leur faible coût, leur rapidité, leur portabilité, leur sensibilité à l'échelle de l'élément étudié… D'autre part la miniaturisation modifie le rapport entre les forces connu à notre échelle, nous ouvrant ainsi des perspectives intéressantes. Regardons alors comment les chercheurs ont su tirer profit de ces avantages liés aux microtechnologies pour manipuler des cellules.

C. Micromanipulation : déplacer et placer des cellules

1. Introduction

Notre objectif, rappelons-le, est d'obtenir en grande quantité des hybridomes issus de la fusion entre des cellules cancéreuses et des cellules dendritiques. Nous devons donc prendre en compte que nous manipulons des cellules, ce qui implique des précautions d'usage. Ainsi, les cellules devront rester dans un milieu aqueux oxygéné, riche en glucose, avec une osmolarité[6] contrôlée (aux alentours de 300 $mOsm.L^{-1}$), une température avoisinant les 37°C… Pour autant, il est possible de se soustraire à certaines de ces contraintes si elles restent temporaires. Notre défi peut alors se résumer à transporter un grand nombre de cellules de type A et B, et de les placer par binôme A-B en des points précis. Analysons les différents principes physiques utilisables pour atteindre ce but.

2. Utilisation de la microfluidique (forces hydrodynamiques)

Comme nous venons de le voir, les cellules ont besoin d'être dans un milieu liquide adéquat. On peut donc les transporter en utilisant la convection de ce liquide. Étant à l'échelle micrométrique on parle de microfluidique. Les flux sont laminaires à cette échelle, ce qui permet aux microcanaux de prendre n'importe quelle forme, sans risque de générer des turbulences qui risqueraient de gêner l'écoulement des cellules. Notons qu'il est possible de créer des turbulences à l'aide de microcavités ou de microstructures comme des chevrons. L'intérêt de ces structures se trouve principalement dans la conception de micromélangeurs (pour plus d'informations, voir [3]). Pour mettre les cellules en mouvement, nous utilisons essentiellement des pousses seringues, mais depuis quelques années des micropompes sont apparues. Elles ont l'avantage de réduire les volumes morts en minimisant la connectique et par leur petite dimension, aident à la mobilité du système. Ces micropompes sont classées en deux catégories [105, 106]: les pompes mécaniques, dont la plupart fonctionnent sur le principe de déplacement réciproque (*Figure II-5*), et les pompes à flux continus, basées par exemple sur le flux osmotique (nous en reparlerons plus en détail par la suite). Cependant, on notera quelques inconvénients dus principalement à la technicité, limitant leur utilisation aux microsystèmes cherchant une forte intégration (type LOC). Mais la microfluidique ne se

[6] Osmose phénomène de diffusion de molécules et/ou de solvant entre deux liquides de concentrations en soluté différentes à travers une membrane semi-perméable.

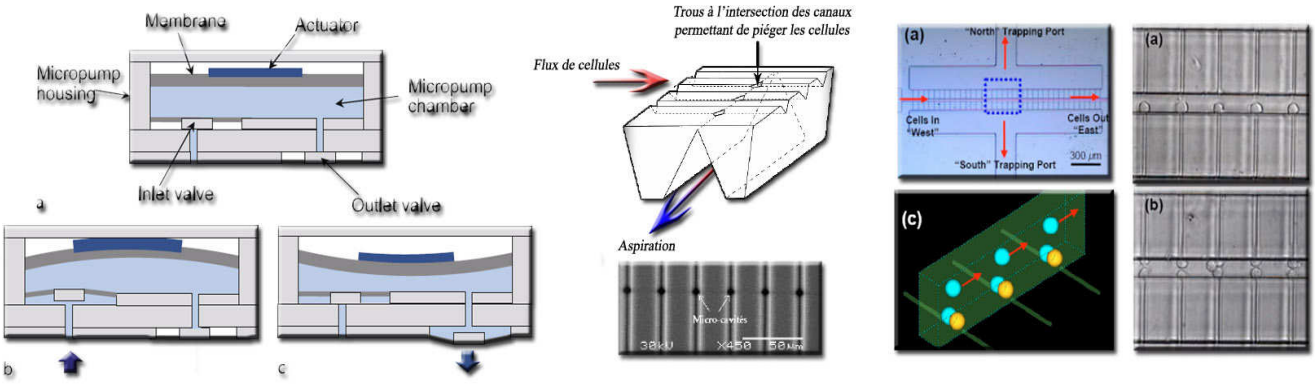

Figure II-5 : À gauche, principe de la pompe à déplacement réciproque [Dongquing][8]. Au centre, principe et image du système composé de microtrous [Tixier][40]. A droite, principe et image du système constitué de microcapillaires pour capturer les cellules [Leea][51].

limite pas seulement à déplacer des cellules, quelques microsystèmes ingénieux proposent différentes techniques pour les placer avec précision.

C'est le cas par exemple des travaux de Tixier-Mita [40] qui va placer dans un premier microcanal une matrice de microtrous reliée à un second microcanal (*Figure II-5*). Lorsque l'on opère une aspiration dans le second canal, les cellules sont alors captées par les microtrous. Ce système, bien qu'astucieux, nécessite une technique complexe de gravure pour obtenir une taille de trou ni trop grande (risque d'avaler la cellule) et ni trop petite (aspiration trop faible). De plus, il s'avère impossible de placer côte à côte deux types cellulaires différents. Une alternative, toujours basée sur l'aspiration, consiste cette fois-ci à attraper les cellules, non pas via des microtrous, mais via des microcapillaires. En plaçant ces microcapillaires de part et d'autre du canal, on peut capturer ainsi des cellules différentes et les mettre en contact, si le canal a la largeur de deux cellules [51] (*Figure II-5*). Ce dispositif développé en PDMS (polydiméthylsiloxane) est facile à réaliser, mais peu compatible avec un réseau d'électrodes, dû à la difficulté d'alignement entre les deux structures. Pourtant, le principe n'en reste pas moins très intéressant.

D'autres études plus récentes se sont focalisées sur l'utilisation du flux pour piéger les cellules[46, 47]. Le principe est de bloquer une cellule en la coinçant avec la force hydrodynamique tout en laissant passer les autres cellules par une autre voie (Figure II-6). Cette technique a l'avantage d'être rapide et fortement parallélisable. Par contre, il semble

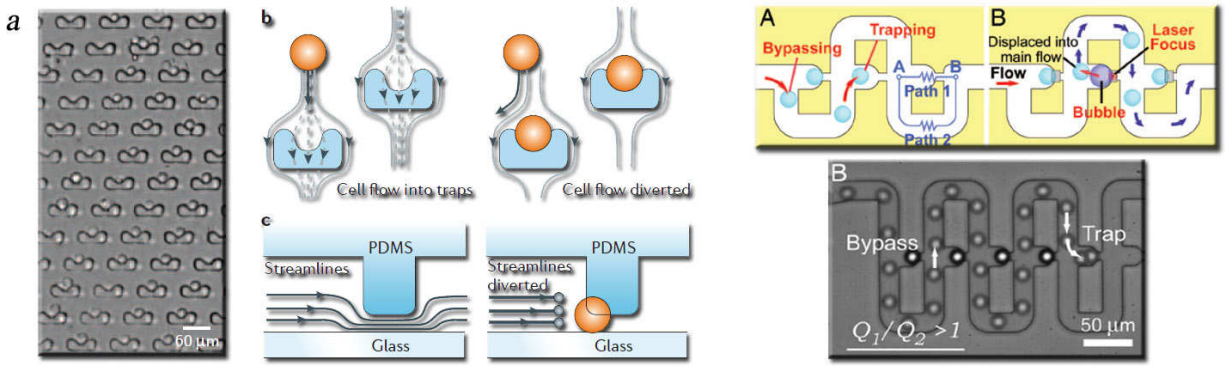

Figure II-6 : Deux techniques pour capturer les cellules à l'aide de la force hydrodynamique. (Rq: à gauche b : vue de haut, c vue de côté).[Manz,Takeuchi] [46, 47]

difficile de placer deux types cellulaires l'un à côté de l'autre.

3. Utilisation de la force mécanique

L'utilisation de la force hydrodynamique repose sur des structures de bases simples. A l'inverse, les microsystèmes basés sur l'emploi de la force mécanique sont plus complexes et font appel par exemple à la microrobotique. Dans ce cas, il s'agit de réaliser une micropince dirigeable de l'extérieur pour manipuler des cellules. Ce concept, n'est pas sans nous rappeler, le rêve de Feynman de fabriquer une micromain outil. Mais sa conception se révèle à bien des égards très difficile. En effet, son élaboration nécessite non pas une seule bonne idée, mais tout un ensemble qui repose sur de nombreux savoirs, dans des domaines aussi variés que la microtechnologie, la chimie ou la physique. Il faut attendre l'année 2000 et les travaux de Jager pour voir apparaitre un mini bras robotisé de seulement 670µm et opérationnel en milieu aqueux [34] (Figure II-7). Celui-ci est constitué d'un microactionneur servant à la fois de *micromuscles* et de *microarticulations*. Ces microactionneurs sont formés d'un polymère actif (polypyrrole) et d'une couche d'or. Lorsqu'un champ électrique est appliqué sur les électrodes d'or, le polymère va se déformer à la suite d'une réaction chimique (oxydation ou réduction selon que le potentiel est positif ou négatif). Cette déformation entraînera alors une expansion ou contraction du polymère. La couche d'or n'étant pas déformable, elle va se courber dans un sens ou dans l'autre, suivant les déformations du polymère. La courbure étant dépendante de l'intensité du champ, il est donc possible de contrôler l'amplitude des mouvements induits par ce *micromuscle*. Le microbras est un assemblage de ces différents microactionneurs reliés entre eux à l'aide d'une structure rigide en BCB (benzocyclobutene). Grâce à ce microbras robotisé, une bille de verre a pu être déplacée sur une distance supérieure à 100 µm et déposée en différents endroits plus ou moins éloignés de la base du bras (voir *Figure II-7*).

Tout aussi spectaculaire, nous pouvons citer la micropince développée par l'équipe de Gracias [37](*Figure II-8*). L'ensemble est constitué d'un empilement de plusieurs matériaux : chrome, cuivre et nickel. Pour rendre mobiles les phalanges des doigts, une couche de polymère est ajoutée entre les jointures. Ce polymère, sous l'effet de la chaleur ou d'un agent

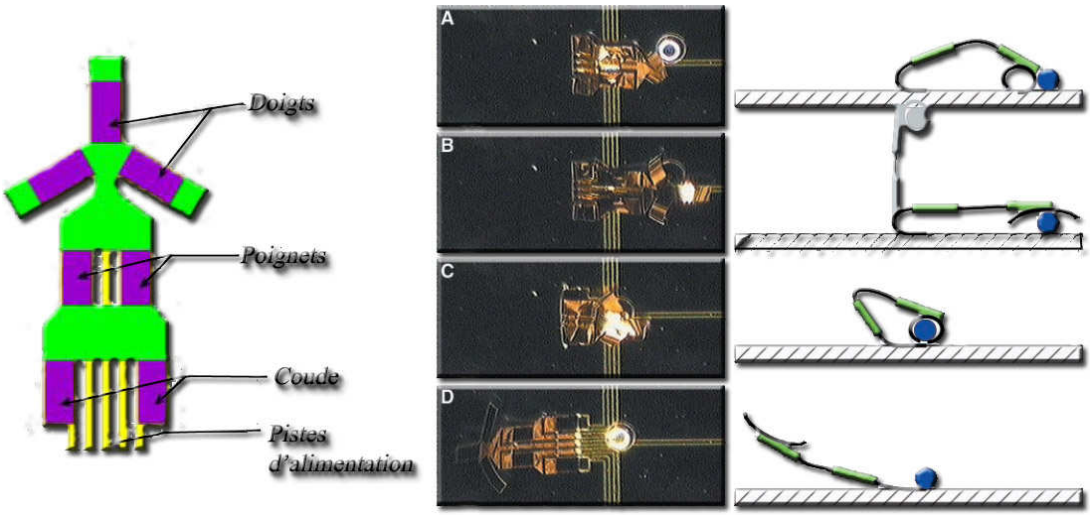

Figure II-7 : À gauche, schéma du microbras robot (violet : polymère, vert : BCB, jaune : Or). Au centre, séquence d'images montrant le transfert de la bille en verre sur une distance de 250µm. A droite, illustration schématique de la séquence [Jager] [34].

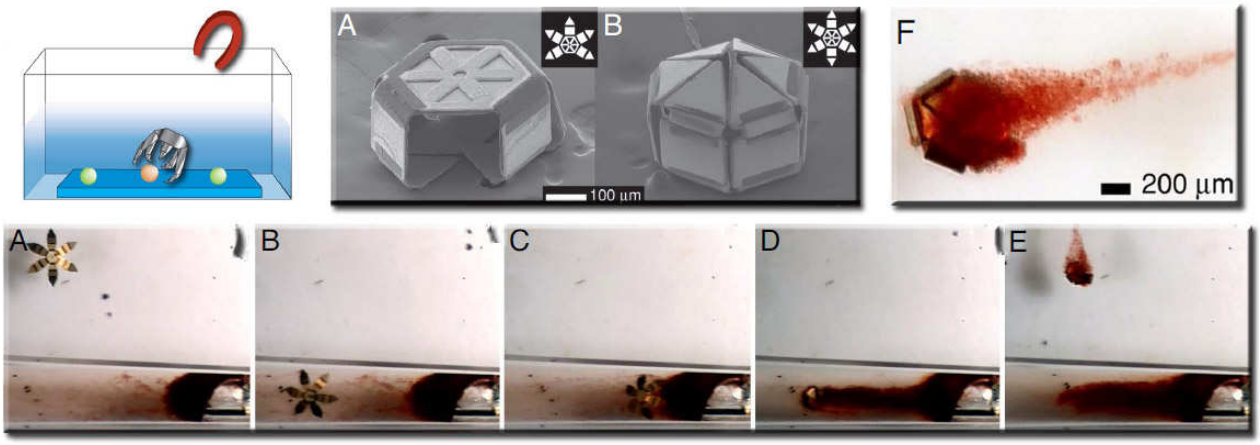

Figure II-8 : En haut à gauche : schéma présentant la manipulation de la micropince à l'aide d'un aimant. En haut au centre, images MEB de dos et de face de la micropince en position fermée. Séquence d'images (A-F) de la capture par la micropince d'un amas de cellules marquées en rouge [Gracias] [37].

chimique, se dilatera et provoquera la fermeture des doigts. Un des éléments métalliques utilisés est le chrome, or celui-ci est un ferromagnétique, ce qui permet dès lors, l'utilisation d'un champ magnétique pour diriger la micropince à distance. En utilisant ce principe, ils arrivent à l'aide d'un aimant, à déplacer leur micropince en milieu aqueux dans n'importe quelle direction. En combinant les deux techniques (aimant et chauffage) ils parviennent tout d'abord à introduire leur micropince dans un tube à essai (préalablement immergé) contenant des cellules. Puis en chauffant à 40°C, la micropince se referme sur elle-même capturant ainsi tout un amas de cellules. Il ne reste plus qu'à sortir la micropince du tube à essai et la mission de prélèvement est achevée.

Ces deux micromains outils, bien que très impressionnantes, restent pour l'instant encore trop grandes pour manipuler efficacement une cellule. De plus, leur manipulation se révèle bien trop fastidieuse pour permettre de placer avec efficacité un très grand nombre de cellules. Néanmoins, nous pouvons espérer que dans un futur proche le développement de ces microrobots nous ouvrira de nouvelles perspectives.

4. Utilisation de pince optique

Dans l'espace, c'est la force de gravité qui prédomine. Pourtant, Johannes Kepler (1571-1630), constate que le soleil exerce une force sur les particules échappées d'une comète qui les pousse dans le sens opposé à la position du soleil. Kepler observe en fait le phénomène de pression radiative, conséquence du bombardement des photons sur un objet. C'est cette force de radiation que les ingénieurs essayent aujourd'hui d'utiliser, pour propulser les sondes dans l'espace à l'aide de voile solaire (*Figure II-9*). Sur terre, employer cette force s'annonce bien difficile au vu des forces de frottement, de gravité… D'autant plus qu'il faut disposer d'une source de photons considérable. Tous ces problèmes sont résolus avec l'avènement du LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) et en se mettant à l'échelle microscopique. C'est ainsi qu'en 1970, Ashkin parvient à dévier une bille en l'éclairant par un faisceau laser [107]. Le principe est un peu différent de celui de la voile solaire, car dans ce cas précis la bille est transparente alors que pour la voile solaire le revêtement est réfléchissant. De cette façon, lorsqu'un rayon lumineux traverse cette bille, il est dévié à son entrée et à sa sortie, ce qui se traduit par une modification de la quantité de

mouvement[7] de lumière, entrainant par compensation une force optique sur la bille. Maintenant, plaçons cette bille dans un gradient d'intensité lumineuse (exemple : spot d'un laser). Les forces optiques n'étant pas égales du fait du gradient, la résultante des forces optiques subies par la bille, entraineront une force de rappel dirigée vers le foyer du faisceau (voir *Figure II-9*). Ainsi, si l'on place au centre d'un spot laser un objet microscopique, on peut déplacer cet objet simplement en bougeant le spot. C'est ce que l'on appelle une pince optique. Dans le cadre de la manipulation de cellules, le laser est restreint à une puissance comprise entre 0,1 et 1W pour une longueur d'onde d'environ 1000nm (infrarouge). Ces précautions permettent de limiter les risques de détérioration thermique ou photochimique. Remarquons que la force produite par de tels faisceaux laser est de l'ordre de 0,5 à 50 piconewtons.

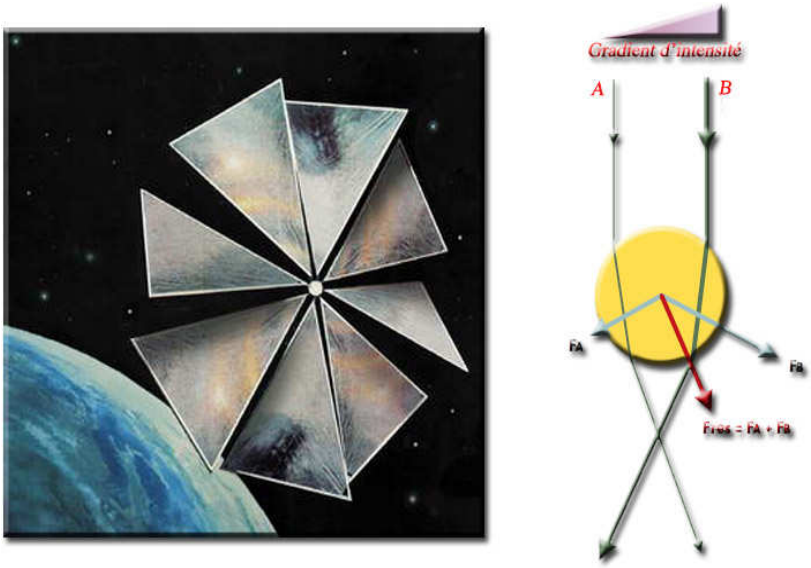

Figure II-9 : Deux techniques utilisant la pression de radiation : à gauche voile solaire et à droite principe de la manipulation par pince optique [Lecarpentier][22].

Ce procédé de pince optique a l'avantage de manipuler les cellules sans aucun lien matériel, préservant ainsi leur intégrité physique. Il peut servir aussi à mesurer la force de propulsion de cellules mobiles comme les spermatozoïdes. Par contre, nous constatons que l'utilisation d'un seul spot laser nous limite grandement pour placer avec précision un nombre important de cellules. Ce problème a été résolu récemment via différentes techniques qui forment une image présentant plusieurs spots à l'aide d'une seule source laser. On peut citer les techniques basées sur les hologrammes [108] ou sur les interférences créées par ondes évanescentes (*Figure II-10*) [33]. Néanmoins, toutes ces techniques nécessitent un équipement complexe, encombrant et couteux, limitant pour l'instant leur utilisation aux laboratoires de recherche.

[7] Pour un photon la quantité de mouvement vaut $p = \frac{h}{\lambda}$, avec h la constante de Planck, et λ la longueur d'onde.

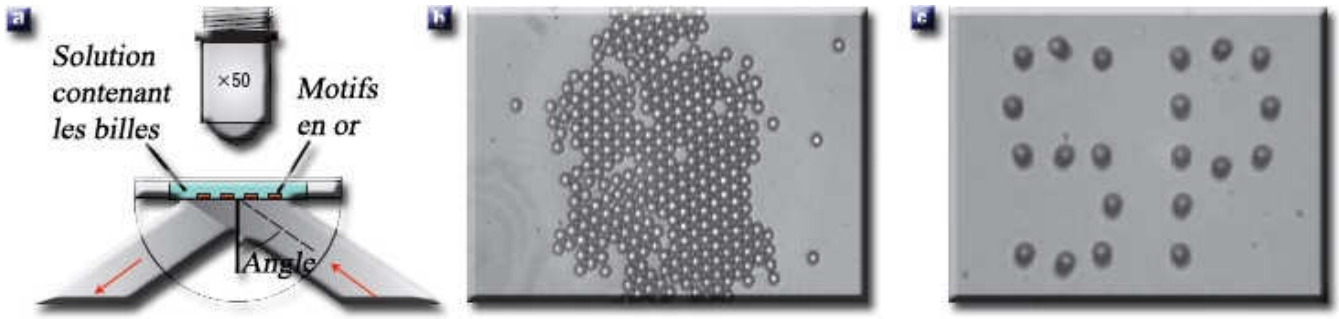

Figure II-10 : Les plasmons de surface induisent une organisation via une surface métallique : a) Schéma du système optique, b) microbilles de polystyrène avant application du laser, c) après application [Quidant][33].

5. Utilisation des Anticorps

Nous avons déjà discuté dans le Chapitre I des anticorps. Ces protéines complexes, rappelons le, sont formées d'une partie constante et d'une partie variable dont la particularité est de reconnaitre un antigène spécifique. Aujourd'hui, nous disposons d'un grand nombre d'anticorps dédiés à des protéines membranaires. Ainsi, il nous suffit d'acheter des anticorps anti-CD80 pour cibler spécifiquement les cellules dendritiques. Mais un anticorps tout seul ne nous sert pas à grand-chose. Il faut donc, soit l'accrocher à un endroit défini pour bloquer la cellule cible, soit lui greffer un objet pour pouvoir le capter. Nous nous intéresserons tout d'abord aux techniques pour fonctionnaliser une surface avec des anticorps. Puis nous verrons en détail une technique couplant champ magnétique et anticorps attachés à une particule magnétique.

a) Fonctionnalisation de surface via des anticorps pour immobiliser des cellules

Deux problèmes se posent à nous : il nous faut délimiter une zone précise et greffer des anticorps à cet endroit. Cependant, un anticorps ne s'accroche pas naturellement, sauf s'il y trouve son antigène spécifique. Or, nous voulons à tout prix préserver ce fragment de l'anticorps pour l'utiliser à fixer les cellules cibles. C'est donc par le fragment constant que nous devons accrocher l'anticorps. Pour cela, la surface doit être fonctionnalisée pour permettre le greffage de ce fragment. Plusieurs voies s'offrent à nous pour les immobiliser. La première technique consiste simplement à laisser les anticorps s'adsorber sur une surface de polystyrène. Mais les anticorps ainsi attachés ne sont pas assez bien maintenus pour retenir une cellule. C'est pourquoi, une alternative a été proposée en liant par voie chimique l'anticorps à la surface. Bora et al proposent ainsi de recouvrir une couche de polystyrène par du FNAB[8] et de l'activer par une exposition aux ultraviolets[109]. Cette activation permet de modifier le FNAB pour constituer une liaison chimique avec l'anticorps. Plus intéressante, la technique développée par Wang et Jin utilise un substrat de verre ou de silice (matériaux largement employés en microtechnologie) recouvert d'APTES[9][110, 111]. L'APTES, via une réaction chimique, va fortement se lier à la surface, puis en ajoutant un agent chimique (du glutaraldehyde), il est modifié et devient sensible au groupe aminé des anticorps.

[8] 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzene
[9] 3-aminopropyltriethoxysilane

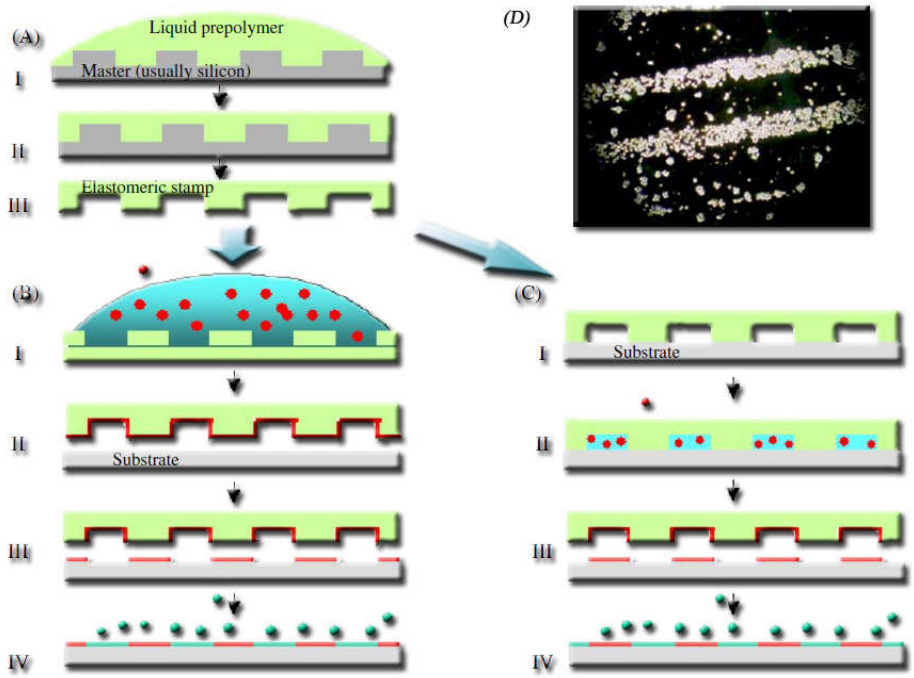

Figure II-11 : Schéma représentant la technique par µCP (B) et µFLP (C). (A) Conception d'un tampon par micromoulage. (B)-I Le tampon est encré avec la solution contenant les molécules choisies. Puis les molécules sont transférées en le tamponnant sur le substrat (B-II&III). La surface est enfin recouverte d'une couche de passivation (B-IV). (C) Le tampon est d'abord appliqué sur le substrat (C-I), puis on injecte la solution contenant les molécules (C-II). Après absorption des molécules par le substrat on retire le tampon (C-III) et on passive la surface restante (C-IV). En (D), immobilisation de cellules KG-1 par des anticorps anti-CD34 précédemment placés via des bandes de surfaces fonctionnalisées par µCP d'APTES [Textora][42].

Nous avons à notre disposition différents procédés pour fixer efficacement des anticorps, mais il nous reste encore à localiser ces zones fonctionnalisées. Pour le FNAB, l'usage de la photolithographie semble une voie intéressante. Par contre, pour l'APTES l'emploi de la technique de lithographie, dite douce, semble plus appropriée (*Figure II-11*) [42]. Celle-ci est basée sur le principe du tampon ou d'impression par microcontact (µCP : microcontact printing). Le procédé consiste à fabriquer un tampon en polymère, le plus souvent en PDMS, puis à *l'encrer* dans la solution de son choix. Le tampon s'imprègne alors d'une fine couche qui est ensuite transférée en tamponnant la surface désirée. Ce procédé peut à l'inverse être utilisé en employant le tampon pour couvrir la surface et injecter cette fois-ci la solution entre les interstices (µFLP : microfluidic patterning). En appliquant cette méthode de µCP combiné à celle de l'APTES, il est alors possible de retenir à un endroit précis un type particulier de cellules[112](*Figure II-11*). Enfin, pour relâcher les cellules ainsi fixées, il suffit d'administrer une solution acide pendant un très court instant. On peut tout de même constater que l'alignement entre un réseau d'électrodes et le tampon sera une étape assez difficile à réaliser avec précision.

b) Anticorps greffés à des particules magnétiques

L'usage de la force magnétique pour interagir sur les cellules se révèle peu intéressant car, à l'exception de cellules comme les érythrocytes qui sont riches en fer, la majorité des cellules ont une faible sensibilité à cette force. Pour renforcer significativement le contraste magnétique d'une famille de cellules par rapport aux autres cellules et au milieu, on marque celle-ci par un anticorps qui lui est propre, couplé à une particule magnétique.

Rappelons que la force magnétique (F_{mag}) exercée sur une particule de volume V suit la relation suivante :

$$\boldsymbol{F_{mag}} = \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{2\mu_0}} \Delta\boldsymbol{\chi}\, \boldsymbol{V}.\boldsymbol{\nabla B}^2 \text{ (}\textit{Équation II-2}\text{)}$$

Où $\Delta\chi$ représente l'écart de susceptibilité magnétique respectif entre la particule et son milieu de suspension, μ_0 la perméabilité magnétique du vide et B l'intensité du champ magnétique. À la vue de l'équation, nous avons résolu le problème de la susceptibilité magnétique à l'aide des anticorps, mais pas celui de la génération d'un champ magnétique. À l'échelle microscopique, nous avons vu que la force magnétique n'est pas prépondérante (voir Tableau II-1). Il faut donc appliquer un champ magnétique élevé pour induire une force apte à résister au flux présent dans les microcanaux. Pour cela, la plupart des microsystèmes sont couplés à des électroaimants situés à l'extérieur, qui fournissent un champ intense tout en évitant de le surchauffer. Le champ induit par les électroaimants est en général uniforme et ne permet donc pas de placer les particules magnétiques à un endroit précis. Pour créer une cartographie de champ favorable à des emplacements bien définis, des micro-ilots magnétiques sont ajoutés lors de la conception du microsystème.

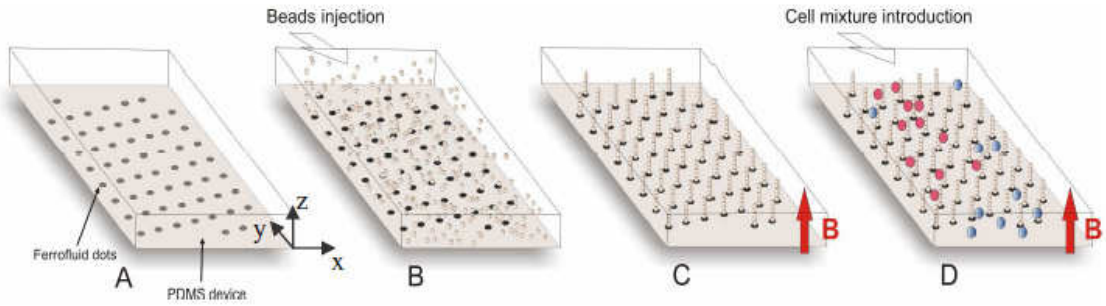

Figure II-12: Schéma illustrant la capture des cellules par une matrice de colonnes de billes magnétiques recouvertes d'anticorps. [Viovy][21]

Les applications des particules magnétiques dans les microsystèmes sont très nombreuses [113, 114], mais les travaux couplant particules magnétiques et cellules sont beaucoup plus rares. La plupart des systèmes ainsi développés, servent principalement à trier des cellules d'une solution aqueuse comme du sang. On peut citer d'ailleurs les travaux de Saias et al [21] qui utilisent un dispositif composé de microplots ferromagnétiques. Ceux-ci, sous l'action d'un champ magnétique extérieur vont constituer des colonnes de billes magnétiques qui sont elles-mêmes tapissées d'anticorps pour ainsi capturer spécifiquement des cellules cancéreuses (voir *Figure II-12*). Pourtant, un tel système a besoin d'électroaimants limitant sa portabilité. C'est pourquoi certaines équipes de recherche tentent d'intégrer des microbobines à leur système. Malgré les nombreuses difficultés (échauffement et champ magnétique faible), des études montrent qu'en optimisant la forme des microbobines et en les isolant du milieu, on peut tout de même réussir à déplacer et placer des particules magnétiques, tout en réduisant la surchauffe [115]. Il reste encore à prouver que cette technique fonctionne avec des cellules, plus fragiles et plus difficiles à capturer (force de trainée plus importante).

Notons pour finir, qu'une équipe a récemment montré la possibilité de capturer des cellules à l'aide de la force magnétique en se passant d'anticorps et de billes magnétiques. Pour cela, ils augmentent la susceptibilité magnétique ($\Delta\chi$) entre le milieu et les cellules en chargeant le milieu d'acide de Gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic (Gd-DTPA). Les cellules sont alors sensibles à la magnétophorèse négative (($\Delta\chi$<0) et peuvent être ainsi placées en un endroit précis en utilisant une matrice de microaimants [116].

6. Utilisation de l'électroosmose

Lorsqu'un fluide entre en contact avec les parois des canaux, une double couche électrique peut se former. Si l'on applique un champ électrique, on produit alors un flux électroosmotique. Ce flux permettra seulement de déplacer des cellules et non de les placer, sauf si on y ajoute des structures piégeant les cellules (voir chapitre utilisation de la microfluidique). Lors de mon séjour au Japon, j'ai eu à manipuler des biopuces basées sur l'utilisation de cet effet.

a) Théorie

La première mise en évidence du flux osmotique revient à Reuss en 1809 [117]. Il remarque en effet que sous l'influence d'un champ électrique, l'eau migre à travers une cloison d'argile poreuse. Ce phénomène résulte de l'interaction entre l'électrolyte (liquide contenant des ions dissous) et les parois des canaux, qui a pour conséquence d'induire des charges à l'interface solide/liquide. Cette couche électrique peut avoir pour origine différents événements : adsorption d'ions, dissociation de groupe d'ions, séparation de charges… Le résultat est que la surface va se charger positivement ou négativement ce qui produira via la force Coulombienne, l'attraction de contre-ions au niveau du liquide. Cette couche de contre-ions est divisée en deux parties : une qui est directement accolée à la surface, dite couche de Stern et une autre couche qui est diffuse et riche en contre-ions, résultant d'un équilibre entre l'agitation thermique et les forces électriques (voir Figure II-13). Cette dernière ne mesure en

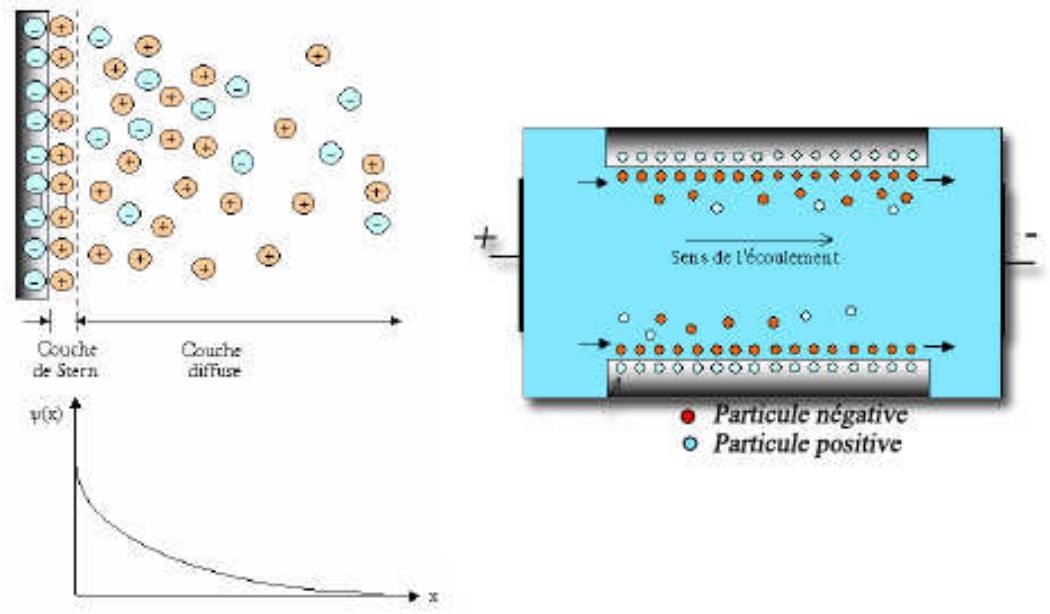

Figure II-13 : A gauche, schéma de la double couche et potentiel électrique qui lui est lié. A droite principe du flux électroosmotique en appliquant un champ qui met en mouvement la double couche[Frenea-Robin][20].

général que quelques nanomètres. Cette double couche induit donc une inhomogénéité électrique au niveau de l'interface, générant un potentiel local. Le modèle de Gouy-Chapman décrit ce potentiel Ψ, qui suit une loi en décroissance exponentielle suivant la distance x de la paroi [3]:

$$\boldsymbol{\Psi(x) = \zeta e^{-x/\lambda}}$$

Où ζ est le potentiel en x=0 et λ la longueur de Debye-Huckel définie par :

$$\boldsymbol{\lambda = \sqrt{\frac{D\epsilon}{\sigma}}}$$

Avec ε et σ respectivement la permittivité et la conductivité du milieu. Enfin, D est le coefficient de diffusion moléculaire des espèces chargées considérées. On peut remarquer que dès que l'on s'éloigne de la paroi d'une longueur supérieure à λ, le potentiel devient pratiquement nul. Si l'on applique un champ électrique parallèle aux parois des canaux présentant cette double couche, sous l'effet des forces de Coulomb induites par le champ électrique, la double couche chargée électriquement va se mettre en mouvement, entrainant à son tour le reste du fluide sous l'action des forces visqueuses (*Figure II-13*).

A l'aide des équations de Stockes appliquées à des microcanaux avec un petit nombre de Reynolds et en supposant que la double couche est très fine, nous pouvons considérer que la vitesse du fluide v_{EOF} soumise à l'effet électro-osmotique a pour expression :

$$\boldsymbol{v_{EOF} = -\frac{\epsilon\zeta}{\eta} E_z} \text{ (}\textit{Équation II-3}\text{)}$$

Où η est la viscosité du milieu et E_z le champ électrique selon la direction de l'écoulement. On s'aperçoit que la vitesse est constante à l'intérieur du canal, c'est pourquoi cet écoulement est appelé écoulement bouchon (voir *Figure II-14*), à la différence de l'écoulement généré par une différence de pression qui, lui, a un profil de vitesse parabolique (écoulement de Poiseuille).

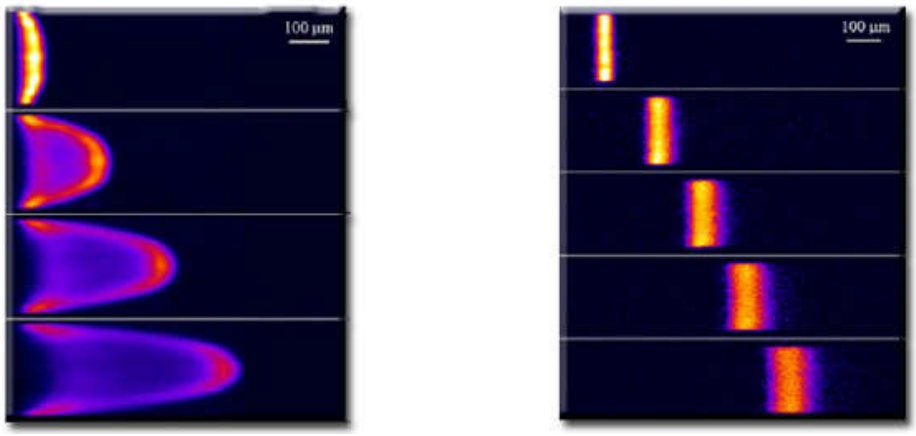

Figure II-14 : A gauche, écoulement généré par pression. A droite, écoulement induit par électroosmose (le profil de vitesse est constant) [Santiago][10].

b) Pratique

Si le flux électroosmotique (EOF[10]) a peu d'intérêt à l'échelle macroscopique, il se révèle par contre être un excellent candidat aux dimensions microscopiques. Cependant, pour bien fonctionner, l'EOF nécessite un champ électrique élevé. Or, ce champ va induire par effet Joule un échauffement important. On se retrouve alors obligé de réduire ses performances pour ne pas endommager les échantillons biologiques. D'où l'intervention de la miniaturisation qui réduit ainsi l'échauffement par effet Joule dans le canal en le dissipant efficacement à l'extérieur (voir Tableau II-1).

C'est en couplant ces nombreux avantages : écoulement bouchon (dispersion longitudinale limitée) et champ électrique intense (pouvoir séparateur et vitesse élevés) que les premiers micro-séparateurs par électrophorèse capillaire (µCE[11]) apparaissent dans les années 90. Les µCE sont doublement gagnants en adoptant l'EOF, car celui-ci met non seulement en mouvement toute la solution, mais aussi les charges électriques sous l'effet du champ. Certaines des charges se déplaceront dans le sens d'écoulement du flux osmotique alors que les charges de signes opposés iront à son encontre. La vitesse d'une particule dans un µCE sera donc la somme des vitesses induites par le flux électroosmotique et celles dues à sa charge. En utilisant ce principe, on peut séparer efficacement différents types de particules selon leurs charges et/ou leurs tailles. La détection se fait à la fin du canal pour laisser le temps aux particules de se séparer. Pour cela on couple souvent l'échantillon à un marqueur fluorescent pour repérer son passage. Le résultat est un graphe temporel avec plusieurs pics révélant la présence de différentes espèces ayant une mobilité distincte (voir *Figure II-15*). Si les expériences sont faites dans les mêmes conditions, on peut précalibrer l'appareil et en déduire ainsi la nature des différents pics mesurés.

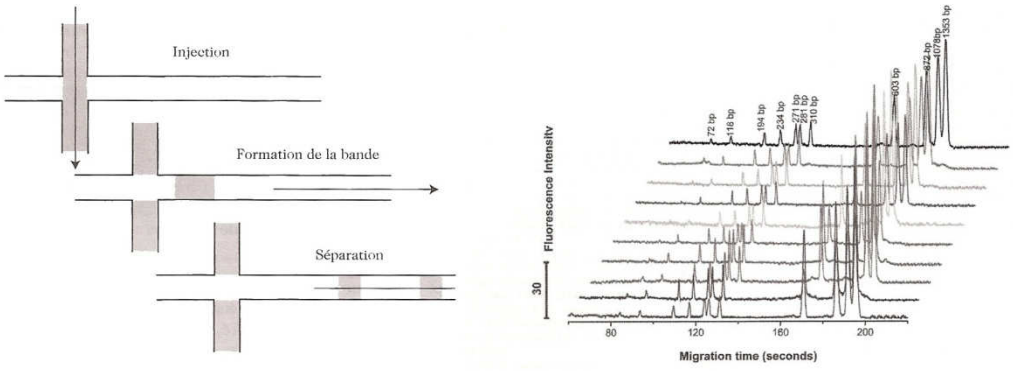

Figure II-15 : A gauche, schéma du principe d'électrophorèse dans µCE[3]. A droite, électrophérogramme d'ADN d'un µCE équipé de 10 colonnes séparatives, d'où les 10 courbes [Baba][52, 54].

Durant mon séjour au Japon dans le cadre de l'école Doctorale Franco-japonaise, j'ai rejoint l'équipe du Professeur Yoshinobu Baba. Celui-ci est responsable de trois laboratoires situés à Takamatsu, Tokushima et Nagoya. Pour ma part, j'ai travaillé au laboratoire de chimie appliquée de Nagoya. Cette équipe recherche activement différentes méthodes pour améliorer les µCE, en particulier ceux dédiés à l'électrophorèse de Protéines [118] et d'ADN

[10] Electroosmotic Flow
[11] Microchip Capillary Electrophoreis

[119, 120]. J'ai donc été formé et sensibilisé à l'intérêt de recourir à ce type de microsystème. Le meilleur exemple a été lors d'une expérience d'électrophorèse d'ADN avec d'un coté, une technique macroscopique et de l'autre un µCE. L'analyse à l'aide du microsystème a pris 10 minutes avec des résultats directement exploitables sur ordinateur alors que l'expérience macroscopique sur gel d'agarose a nécessité plusieurs heures et l'usage de produits toxiques (bromure d'éthidium…). De plus, elle ne permettait pas de disposer directement de résultats numériquement exploitables.

Si l'EOF est principalement dédié à de petites particules : ADN, protéines… qu'en est-il pour les cellules ? Son utilisation reste pour l'instant concentrée au tri cellulaire. Nous pouvons d'ailleurs citer le travail toujours d'actualité de l'équipe de Quake qui a conçu un µFACS (microfabricated Fluorescence-Activated Cell Sorter) [121].

Si la mise en place d'un EOF est relativement simple (il suffit de placer des électrodes aux extrémités des canaux) son contrôle est bien plus difficile. La moindre contamination des surfaces peut complètement changer la répartition des charges dans la double couche et du coup, peut limiter ou même inverser le flux. De plus, malgré la miniaturisation, l'échauffement peut devenir problématique d'autant plus quand le corps biologique utilisé est une cellule.

7. Conclusion

Cette étude ne recouvre bien sûr pas l'ensemble des techniques de manipulation de cellules, mais sûrement les plus répandues. Nous pouvons par ailleurs citer l'usage plus anecdotique des ultrasons [122] ou encore, le principe tout récent, de déplacement de cellules à l'aide de moteur biomoléculaire [123].

Mais si l'on resitue ces travaux dans le cadre de notre projet, nous avons du faire un choix quand au principe physique à mettre en œuvre pour la manipulation de cellules. Les pinces optiques nécessitent un équipement coûteux et important (banc optique, laser…). Les microrobots exigent une forte technicité et s'annoncent difficiles à commander lorsqu'ils sont nombreux. Le placement par anticorps semble prometteur, mais les forces mises en jeux restent faibles, entrainant une difficulté à capter les cellules et à les maintenir. Enfin, l'alignement entre le réseau d'électrodes et les anticorps semble peu aisé. L'association anticorps/particule magnétique nécessite d'élaborer toute une technique de piégeage basée sur le magnétisme, pour revenir en fin de compte à l'électrique pour l'électrofusion. Il paraît donc plus simple de s'en tenir à une technique purement électrique. Reste enfin l'utilisation de la microfluidique qui, par sa simplicité d'élaboration, apparaît très prometteuse. Toutefois, quelques difficultés demeurent, comme l'alignement avec les électrodes et le routage des canaux qui, dans le cas d'une forte parallélisation, peuvent se révéler difficiles.

À la vue des différentes exigences, c'est l'utilisation de la force de diélectrophorèse qui nous a paru être le meilleur compromis. Mais ce n'est pas pour autant que certains des principes présentés ci-dessus ne pourront être exploités conjointement avec elle.

D. Micromanipulation de cellules par la force électrique

1. Introduction

Dans cette partie nous considérerons successivement le comportement des cellules soumises à un champ électrique continu, puis à un champ électrique alternatif. Nous approximerons la cellule à une simple sphère constituée d'une membrane isolante et remplie d'un milieu conducteur. Cette vision schématique simplifiée suffira pour appréhender la majorité des phénomènes évoqués (voir *Figure II-16*).

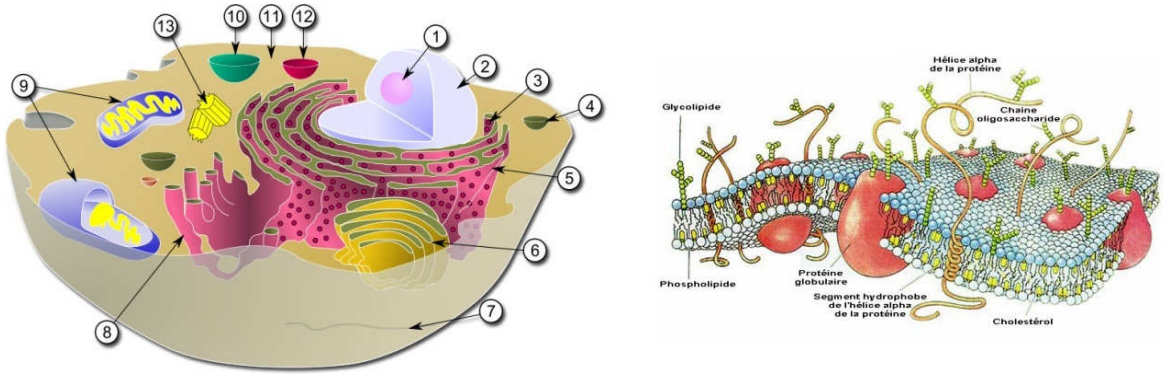

Figure II-16 : A gauche, organisation d'une cellule animale eucaryote: 1.Nucléole, 2.Noyau, 3. Ribosome, 4.Vésicule, 5.Réticulum endoplasmique rugueux, 6.Appareil de Golgi, 7.Microtubule, 8.Réticulum endoplasmique lisse, 9.Mitochondrie, 10.Vacuole, 11.Cytoplasme, 12. Lysosome, 13.Centrosome. A droite, image d'une section d'une membrane cellulaire [4].

2. Comportement d'une cellule soumise à un champ électrique

a) Cas d'un champ électrique continu ou de très basses fréquences (f<1kHz)

Intéressons nous tout d'abord à la membrane de la cellule. Celle-ci est recouverte de glycocalyx qui est un ensemble de molécules composées de glycoprotéines et de glycolipides. Ces molécules s'ionisent et se chargent négativement. Ces charges attirent alors les ions positifs contenus dans la solution induisant un gradient de contre-ions dans la solution à proximité de la membrane. Ajoutons que les glycocalyx ne sont pas imperméables, ce qui permet à certains contre-ions à pénétrer à l'intérieur de cette couche, d'où une distribution de potentiel bien plus complexe que dans le cas de l'électroosmose (voir *Figure II-17*).

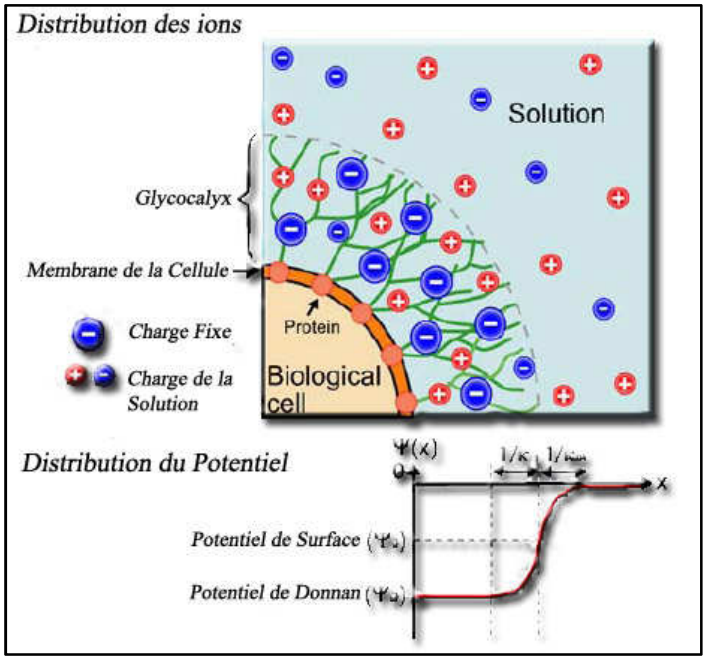

Figure II-17 : Schéma de la distribution des ions et du potentiel d'une cellule plongée dans une solution aqueuse [Ichiki][29].

L'apparition de cette zone chargée va rendre la cellule sensible à un champ électrique. En effet, étant chargée globalement négativement, elle sera attirée par la force de Coulomb vers l'électrode chargée positivement (Anode). Rappelons que la force de Coulomb suit la relation suivante :

$$\vec{F} = q\vec{E} \quad (\textit{Équation II-4})$$

Où q est la charge nette de l'objet et $\vec{E}$ le champ électrique appliqué. En combinant la force de Coulomb et la force de trainée visqueuse, on obtient alors dans une première approximation la même vitesse que celle induite par le flux électroosmotique ($\boldsymbol{v_{EOF} = -\frac{\epsilon\zeta}{\eta}E_z}$ (*Équation II-3*). En réalité, l'équation est plus complexe du fait de la distribution de potentiel plus complexe (voir [29]). Pour donner un ordre d'idée, en appliquant un champ de 10V/cm, une cellule biologique ira typiquement à une vitesse de $v_{\text{électrophorèse}}$=10 µm/s [124].

b) Cas d'un champ électrique alternatif

Dans le cas où la cellule avec sa couche de contre-ions est plongée dans un champ alternant très rapidement, la cellule n'a plus alors le temps de se diriger vers une électrode ou une autre. Elle reste donc immobile. Pourtant cela ne veut pas dire que la cellule n'est plus capable d'interagir avec de tel champ électrique. D'autres phénomènes y restent sensibles, c'est le cas par exemple des atomes constituant la cellule.

Sous l'action d'un champ électrique, le nuage d'électrons se déforme légèrement en direction de l'anode et inversement le noyau se déplace vers la cathode (*Figure II-18*). On parle alors de polarisation électronique. Ce déplacement des charges sous l'effet d'un champ électrique conduit à séparer les barycentres des charges positives et négatives d'une certaine distance. Cette séparation des barycentres forme alors un dipôle. Ce dipôle se caractérise par

son moment dipolaire ($\vec{m}$). Pour un atome constitué de *n* électrons (-q) et de *n* protons (+q), ou plus simplement de *n* petits dipôles on aura :

$$\vec{m}_{atome} = nq\vec{d}$$

Où q est la charge élémentaire, et $\vec{d}$, la distance entre les barycentres des charges positives et négatives. Pour un matériau constitué de *N* atomes soumis à un champ électrique, son moment dipolaire est la somme des moments dipolaires de tous ses atomes soit :

$$\vec{m}_{matériau} = \sum_{N} \vec{m}_{atome}$$

Cette équation nous permet de constater qu'un matériau, même diélectrique, interagit avec le champ électrique en se polarisant. De plus, on constate que plus le champ est important plus l'écart entre les pôles est grand, donc en première approximation on supposera que le moment dipolaire est proportionnel au champ. Selon la nature de l'atome, et par extension du matériau, la sensibilité au champ électrique est différente. C'est ce que l'on nomme la susceptibilité électrique du matériau (χ). Tout ceci nous donne la relation suivante [16]:

$$\vec{m}_{matériau} = \chi_{materiau}\varepsilon_0\vec{E}$$

Avec ε_0 la permittivité diélectrique du vide et $\vec{E}$, le champ électrique appliqué. On parle aussi de permittivité relative pour un matériau, celle-ci vaut :

$$\varepsilon_r = (1 + \chi)$$

Le modèle est valable pour un atome ou une molécule. Mais la polarisation se fera aussi à l'échelle atomique, d'où le nom de polarisation atomique. Les distances mises en jeu sont plus importantes impliquant un moment dipolaire plus grand. Notons que certaines molécules, comme l'eau possèdent un moment dipolaire permanent (*Figure II-18*). Dans ce cas, en plus des polarisations électronique et atomique, le champ électrique provoque une orientation des dipôles dans la direction du champ. Cette polarisation est appelée polarisation d'orientation et elle est très dépendante de l'agitation thermique. Enfin, à une échelle plus

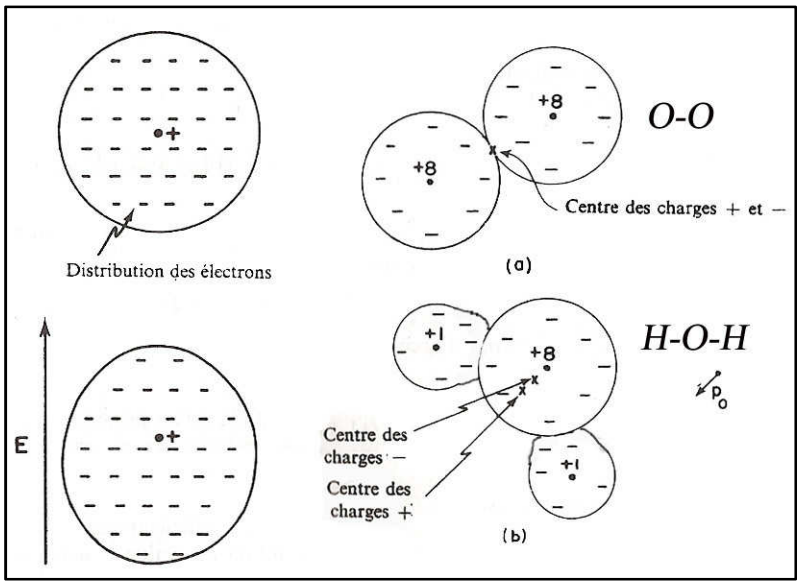

Figure II-18 : A gauche, la distribution d'électrons d'un atome placé dans un champ électrique est déplacée par rapport au noyau. A droite, (a) molécule d'oxygène avec un moment dipolaire nul. (b) La molécule d'eau a un moment dipolaire permanent p_0 (inspiré de [Feynman] [16].

importante, typiquement celle de l'objet, le déplacement des charges libres dans l'ensemble du matériau entraînera aussi une polarisation.

Nous finirons sur le constat suivant : tous ces phénomènes de polarisation se déroulent à des échelles différentes entraînant une inertie et un moment dipolaire distincts. Ainsi, un grand dipôle a un moment dipolaire très fort tout comme son inertie, ce qui a pour conséquence de le rendre prépondérant en basses fréquences, mais moindre en hautes fréquences, voire inexistant en très haute fréquence. Pour une fréquence donnée, nous sommes donc en présence de plusieurs types de polarisation plus ou moins importants, mais dont les effets se cumulent.

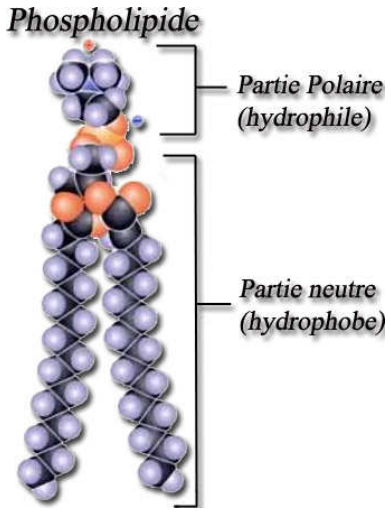

Figure II-19 : Représentation d'un phospholipide [Wishaw][2].

Considérons maintenant le cas d'une cellule. Nous trouvons tout d'abord, la membrane cellulaire qui assure la séparation entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Celle-ci est constituée essentiellement d'une bicouche de phospholipides. Ces phospholipides sont des longues molécules ayant une partie polaire et une partie apolaire (*Figure II-19*). La membrane se comporte alors comme un isolant comportant des fuites (dues principalement aux canaux protéiques). Sous l'effet d'un champ électrique, la membrane ressent les polarisations d'orientation, atomique et électronique. Si nous continuons, nous trouvons le milieu intracellulaire composé du cytoplasme et du noyau. Le cytoplasme est formé du cytosol (eau, ions, protéines…) et d'organites cellulaires (ribosomes, vacuoles, mitochondries…). Sous l'action d'un champ, nous aurons cette fois-ci, une polarisation induite par les charges libres que sont les ions (Na^+, K^+, Cl^-…), une polarisation d'orientation principalement due aux molécules d'eau, des polarisations atomiques et électronique. En résumé, en sommant tous ces effets de polarisation, la cellule se comporte comme un dipôle en présence d'un champ électrique.

Si la cellule est plongée dans un champ électrique alternatif et uniforme, les pôles positifs et négatifs sont autant attirés par la force de Coulomb dans le sens de la cathode que dans le sens de l'anode, respectivement. La cellule est donc une fois de plus immobile. En revanche, si le champ n'est pas uniforme, c'est-à-dire s'il existe un gradient de champ, l'équilibre des forces n'est plus respecté. Ainsi, une des forces exercées sur un des pôles est plus forte que l'autre, entraînant le déplacement du dipôle en direction de la force prépondérante. C'est ce que l'on appelle la force de diélectrophorèse. Comme nous pouvons le constater, cette force dépend des variations du champ électrique et des caractéristiques du dipôle. Ce qui peut se traduire par l'expression suivante [20, 125]:

$$\overrightarrow{F_{dep}} = \vec{m} \cdot \nabla\vec{E} \quad (\textit{Équation II-5})$$

Où $\vec{m}$ est le moment dipolaire de la particule et $\nabla\vec{E}$, le gradient du champ électrique. Nous pouvons constater que si le dipôle formé par la cellule n'est pas orienté le long des

lignes de champ, une force de rappel le replacera dans le sens du champ, c'est le principe de l'électrorotation [126]. Intéressons-nous maintenant plus en détail à cette force de diélectrophorèse.

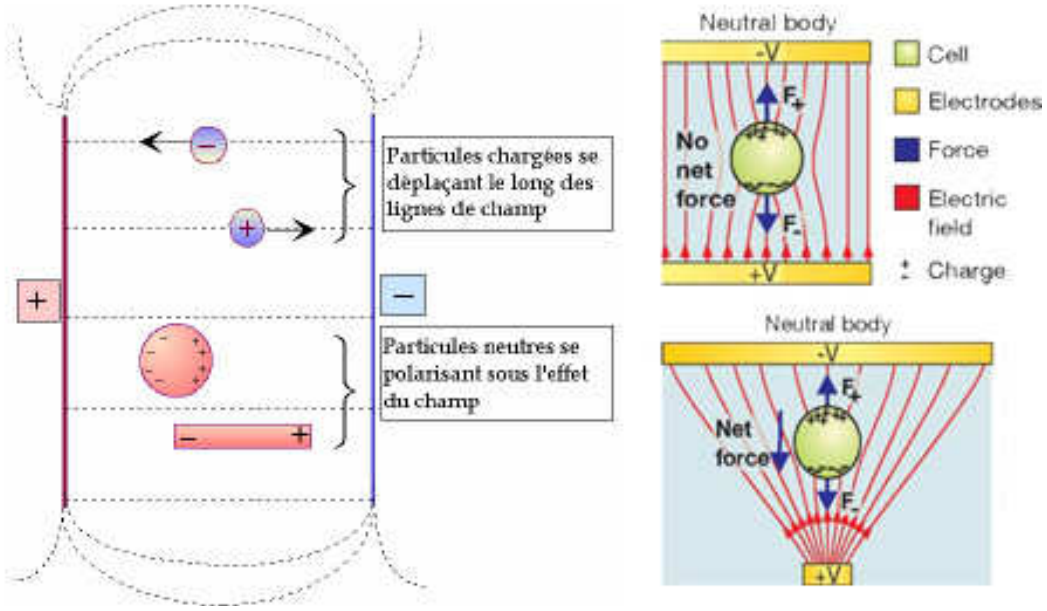

Figure II-20 : A gauche, Action d'un champ électrique uniforme et continu sur des particules chargées et neutres [Frenea-Robin][20]. A droite, Effet d'un champ électrique uniforme ou non sur une cellule supposée neutre électriquement [Voldman][27].

c) La force de diélectrophorèse

Les premières études relatant un effet diélectrophorétique remontent à 1927, avec les expériences de Muth. Celui-ci constate la formation de colliers de perles de particules, suite à l'application d'un champ électrique de hautes fréquences[127]. Une dizaine d'années plus tard, Liebesny observe lui aussi ce même phénomène, mais cette fois-ci sur des érythrocytes [128]. Pourtant, il faudra attendre les travaux de Pohl en 1951, pour qu'un nom soit donné à ce type de phénomène. Il décide d'employer le terme de diélectrophorèse, pour désigner le déplacement d'un objet neutre suite à l'application d'un champ électrique non uniforme[129]. Le mot combine le mot grec *–phoresis* (mouvement) et le préfixe *diélectro-* qui renvoie au principe de polarisation d'un diélectrique sous l'action d'un champ électrique.

Précédemment, nous avons vu que la force liée à la diélectrophorèse dépendait du moment dipolaire de l'objet étudié et du gradient du champ électrique (*Équation III-5*). Or, dans le cas d'une cellule, il semble impossible de déterminer avec précision son moment dipolaire à la vue de sa complexité (forme irrégulière, constituants nombreux…). Pourtant, rien ne nous empêche de simplifier le problème pour essayer de comprendre au mieux le comportement d'une cellule sous l'action d'un champ électrique. En partant de ce principe, nous allons dorénavant assimiler une cellule à un objet sphérique diélectrique présentant des pertes. A l'aide de ce modèle simplifié, nous pouvons en déduire le moment dipolaire d'une cellule de rayon *r*, sous un champ électrique *E*, et immergée dans un milieu de permittivité ε_m [20, 125]:

$$\vec{m} = 4\pi\epsilon_m K(\varepsilon_p^*, \varepsilon_m^*) r^3 \vec{E} \quad \textit{(Équation II-6)}$$

avec $K(\varepsilon_p^*, \varepsilon_m^*) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} = K(\omega)$ (*Équation II-7*)

$K(\varepsilon_p^*, \varepsilon_m^*)$ est connu sous le nom de facteur de Clausius-Mossotti (C-M), il fait intervenir les permittivités complexes respectives de la particule et du milieu, ε_p^* *et* ε_m^* :

$$\begin{cases} \varepsilon_p^* = \varepsilon_p - j\dfrac{\sigma_p}{\omega} \\ \varepsilon_m^* = \varepsilon_m - j\dfrac{\sigma_m}{\omega} \end{cases}$$

Où ε_p et ε_m sont respectivement les constants diélectriques de la particule et de son milieu de suspension, et σ_p et σ_m leur conductivité respective.

Nous connaissons maintenant une approximation du moment dipolaire, ce qui nous permet en injectant l'*Équation III-6* dans l'*Équation III-5*, d'en déduire l'expression de la moyenne temporelle de la force de diélectrophorèse. Pour l'instant, nous limitons la non uniformité du champ à une variation d'amplitude d'où :

$$\langle \overrightarrow{F_{DEP}}(t) \rangle = 2\pi\varepsilon_m r^3 Re[K(\omega)] \cdot \nabla E_{eff}^2 \quad (\textit{Équation II-8})$$

Où *Re* définit la partie réelle. Cette équation nous apporte un grand nombre d'informations. Tout d'abord, nous constatons que le champ électrique intervient au carré dans l'expression, donc l'orientation de la force de diélectrophorèse ne dépend pas de la polarisation des électrodes. Par contre, c'est le signe de la partie réelle du critère de C-M qui indiquera le sens de déplacement. Ainsi, lorsque Re[K(ω)]>0, la force guide la cellule vers les gradients de champ montants, c'est-à-dire vers les maxima de champ électrique. Nous sommes dans ce cas précis en présence de la force de diélectrophorèse positive (DEPp). A l'inverse, quand Re[K(ω)]<0, la cellule est dirigée vers les minima de champ sous l'influence de la diélectrophorèse négative (DEPn) (voir Figure II-21). Enfin, notons qu'à la vue de l'*Équation I-7*, la partie réelle du critère de C-M Re[K(ω)], ne varie qu'entre +1 et -0,5 (ε_m=0 ou ε_p=0).

Pour saisir au mieux comment varie le facteur de C-M, calculons-le à partir du cas concret d'une cellule (lymphoblaste T Jurkat) immergée dans une solution faiblement

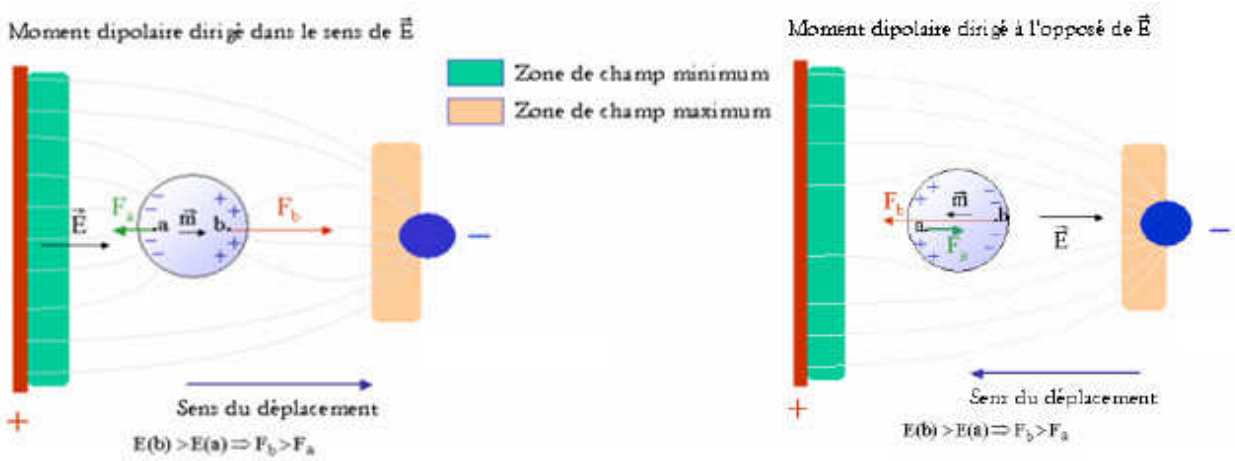

Figure II-21 : A gauche, diélectrophorèse positive entraîne la cellule vers les maxima de champ. Ceci est dû au gradient de champ couplé au fait que la cellule soit plus polarisable que son milieu environnant. A droite, diélectrophorèse négative. Cette fois-ci, la cellule est moins polarisable que le milieu, la non uniformité du champ électrique pousse la cellule vers les minima de champ [Frenea-Robin][20].

conductrice et dans une autre, fortement conductrice (voir *Figure II-22*). Premièrement, nous nous apercevons que celui-ci varie en fonction de la fréquence. Si nous nous rappelons des différents phénomènes de polarisation touchant la cellule (abordés dans le sous-chapitre précédent), nous comprenons que leur contribution sera différente selon la fréquence. Pour illustrer nos propos, ajoutons la définition de la conductivité complexe qui s'appréhende mieux que la permittivité complexe :

$$\sigma^* = \sigma + j\omega\varepsilon\varepsilon_0$$

Où σ est la conductivité, ω la pulsation (2πf) et ε la permittivité. Si nous appliquons cette équation à la membrane de la cellule qui se comporte comme un diélectrique ayant de faibles pertes (conductivité réduite), nous constatons que cette conductivité complexe en basses fréquences est très faible. La membrane se comporte alors comme une barrière limitant fortement la polarisation du milieu intracellulaire. A l'inverse, le milieu extérieur à la cellule n'expose pour sa part qu'une résistance relativement faible. Le champ électrique reste donc en basses fréquences principalement cantonné au milieu extracellulaire. On dit alors que le milieu est plus polarisable que la cellule, entraînant un critère de C-M négatif, d'où une force de diélectrophorèse négative.

Si désormais, nous augmentons la fréquence, la membrane devient progressivement perméable au champ électrique. Ceci a pour conséquence d'augmenter l'action du champ sur le milieu intracellulaire. Des lors, si le milieu intracellulaire est plus conducteur que le milieu extracellulaire, alors le champ électrique se propagera de préférence dans la cellule. Dans ce cas, la cellule est plus polarisable que le milieu, ce qui a pour conséquence de la pousser vers le maximum de champ via la DEPp. Au contraire, si la cellule se révèle moins conductrice que le milieu, dans ce cas, le champ restera essentiellement cantonné au milieu. La cellule est donc repoussée vers les minima de champ par la DEPn.

Si nous continuons à accroître fortement la fréquence, la permittivité devient

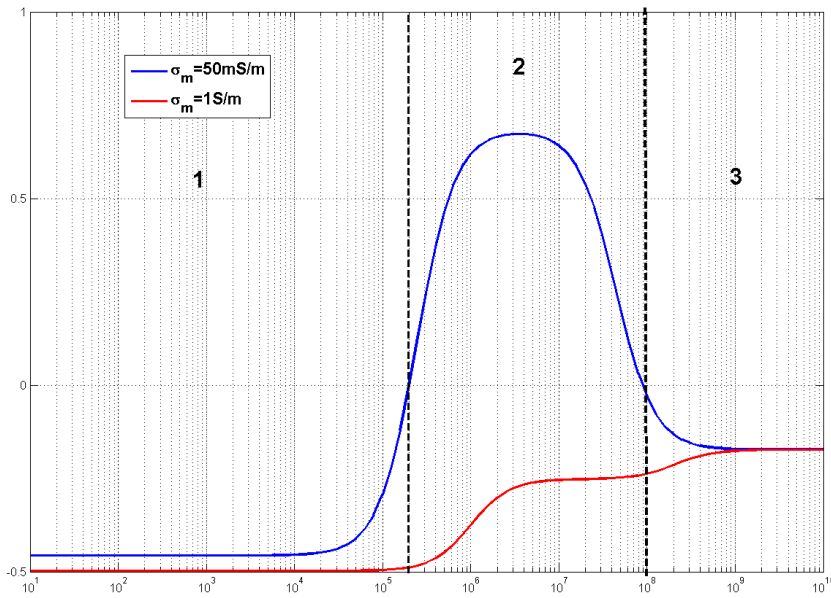

Figure II [illegible]2]) plongée dans un milieu faiblement conducteur (50mS/cm) et fortement (1S/cm). Dans la zone 1, la membrane isole la cellule du champ électrique, d'où DEPn. Dans la zone 2, la membrane se polarise permettant au champ de voir le cytoplasme, si celui-ci est plus conducteur que le milieu alors DEPp sinon DEPn. Enfin dans la zone 3, c'est la permittivité qui s'impose or le milieu a une permittivité plus importante que la cellule d'où DEPn.

prépondérante dans l'expression de la conductivité complexe. Or, le milieu a une permittivité (~eau) bien plus élevée que celle de la cellule constituée d'eau mais aussi de protéines et autres grosses molécules moins polarisables. C'est pourquoi le milieu redevient plus polarisable que la cellule, laissant à nouveau la force de DEPn dominer.

Cette étude sur la variation du critère de C-M permet de constater qu'il est possible de déplacer à notre guise une cellule vers une zone de champ maximum ou minimum, simplement en faisant varier la fréquence (le milieu étant supposé faiblement conducteur). Ceci implique, dans le cas où nous maitrisons la cartographie de champ, que nous sommes capables de placer des cellules à un endroit précis. Nous remarquons aussi que le facteur de C-M dépend des paramètres propres à la cellule. D'où, une réaction différente à la fréquence du champ pour chaque type de cellules. Il semble donc possible de trier les cellules en jouant sur leur critère de C-M distinct. Enfin, si nous souhaitons utiliser la DEPp, il nous faudra recourir à un milieu peu conducteur et/ou de faible permittivité. Ajuster la conductivité d'un milieu s'avère relativement simple, étant donné qu'il suffit d'adapter la concentration en ions de la solution. Jouer sur la permittivité est plus difficile, car il faut recourir à l'utilisation de molécules possédant un moment dipolaire élevé.

d) Électrorotation et Diélectrophorèse à onde progressive

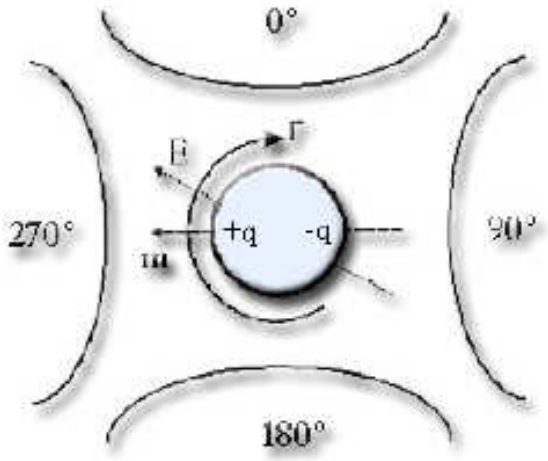

Figure II-23 : Principe de positionnement de quatre électrodes pour former un champ tournant et induire l'électrorotation de la cellule [Frenea-Robin][20].

Pour déduire la force de diélectrophorèse, nous avons imposé que seule pouvait varier l'amplitude du champ (*Équation I-8*). A l'inverse, nous pouvons cette fois-ci laisser l'amplitude constante, mais faire osciller la phase du champ électrique, c'est à dire induire un champ tournant. Pour mettre en place une telle technique, on utilise en général un système de quatre électrodes déphasées l'une de l'autre de 90° [130]. Si l'on place une particule au centre de ces électrodes, celle-ci va tout d'abord se polariser sous l'action du champ électrique, puis son dipôle induit va tourner en suivant celui du champ tournant. Si le phénomène s'arrêtait là, nous ne verrions pas la cellule tourner car seul le dipôle serait en mouvement. En réalité, la rotation du dipôle est en retard par rapport à celle du champ, du fait de son inertie. Ce déphasage entre le dipôle et le champ génère un couple sur la particule, l'amenant à tourner

sur elle-même. C'est le principe de l'électrorotation (ROT). Ce couple peut s'exprimer si nous gardons les mêmes conditions que pour la force de DEP de la façon suivante :

$$\vec{\Gamma} = -4\pi r^3 Im[K(\omega)]E_0^2\vec{k}$$

Où *Im[K(ω)]* désigne la partie imaginaire du critère de CM et le vecteur $\vec{k}$ indique que la rotation s'effectue autour le l'axe perpendiculaire au plan des électrodes. En couplant cette équation à la force de friction due à la trainée de la cellule, on obtient sa vitesse de rotation [125]:

$$\Omega(\omega) = -\frac{\varepsilon_m Im[K(\omega)]E^2}{2\eta}$$

Avec η la viscosité du fluide. Quand *Im[K(ω)]*>0, la cellule et le champ tournent en sens contraire. Inversement, lorsque *Im[K(ω)]*<0, la rotation de la cellule se fait dans le même sens que celui du champ.

De manière similaire une onde sinusoïdale progressive suivant un axe linéaire entraine la particule diélectrique. Comme précédemment, nous allons utiliser un réseau d'électrodes dont le champ appliqué est déphasé de 90°. Mais cette fois-ci, le réseau d'électrodes est disposé en rangées pour former une onde électrique se propageant le long des électrodes. Ainsi, si l'on place une particule dans ce champ elle va, comme pour l'électrorotation, se polariser, mais avec un certain retard entrainant son déplacement dans la direction de l'onde. La particule est alors sous l'emprise de la force de diélectrophorèse à ondes progressives (tw-DEP : *traveling-wave dielectrophoresis*). Pour connaitre l'expression de cette force il faut d'abord partir de la force de diélectrophorèse généralisée :

$$\langle\vec{F}(t)\rangle = 2\pi r^3\{Re[K(\omega)]\cdot\nabla E_{eff}^2 + Im[K(\omega)]\cdot(E_{x0}^2\cdot\nabla\varphi_x + E_{y0}^2\cdot\nabla\varphi_y + E_{z0}^2\cdot\nabla\varphi_z)\}$$

Que nous simplifierons, en appliquant un déphasage dans une seule direction de l'espace, en conservant une amplitude de champ constante et en posant la longueur d'onde égale à la distance entre deux électrodes de même phase ($\nabla\varphi = -\frac{2\pi}{\lambda}$). On obtient alors [131]:

$$\langle\vec{F}_{tw-DEP}(t)\rangle = -\frac{4\pi^2\varepsilon_m r^3 Im[K(\omega)]E^2}{\lambda}\vec{\imath}$$

Encore une fois, c'est le critère de CM qui par son signe définit le sens de déplacement de la particule. Si *Im[K(ω)]>0*, la particule se déplace dans le sens du gradient de phase. A l'inverse, quand *Im[K(ω)]<0*, la particule suit le trajet de l'onde électrique. Avant de nous intéresser aux applications de ces trois forces regardons l'impact de ces forces à l'échelle microscopique.

3. Rapport de force à l'échelle microscopique

Nous avons déjà discuté de l'intérêt de se placer à l'échelle microscopique. En particulier pour les applications basées sur l'utilisation du champ électrique (augmentation de la force, voir « Un monde microscopique »). Mais à quelle vitesse une particule peut être mise en mouvement sous l'application d'un champ non uniforme ?

Plaçons une cellule dans un microcanal soumise à un champ électrique non uniforme. Cette cellule subit la force de diélectrophorèse (F_{DEP}) qui en la déplaçant induit une force de trainée visqueuse (F_{Drag}). Son mouvement est donc régi par l'équation suivante :

$$m\frac{d\vec{v}}{dt} \approx 0 = \overrightarrow{F_{DEP}} - \overrightarrow{F_{Drag}} \quad (\textit{Équation II-9})$$

Où *m* est la masse de la cellule et *V*, sa vitesse (on suppose que la vitesse s'établit très rapidement d'où l'approximation dans l'équation). La force de trainée est donnée par la loi de Stokes s'appliquant à une sphère possédant une vitesse *v* et immergée dans un fluide visqueux à faible nombre de Reynolds [3]:

$$\overrightarrow{F_{Drag}} = 6\pi r\eta\vec{v} \ (\textit{Équation II-10})$$

Avec η la viscosité du fluide et r, le rayon de la cellule. En injectant l'*Équation III-10* dans l'*Équation III-9*, on obtient ainsi la vitesse de la cellule (v_{cell}) :

$$V_{cell} = \frac{r^2\varepsilon_m Re[K(\omega)]\nabla E_{eff}^2}{3\eta}$$

En prenant des valeurs de viscosité et de permittivité du milieu égales à celle de l'eau, en supposant que les variations de champ sont de l'ordre du kV/cm et en choisissant une cellule de rayon de 5µm et ayant pour partie réelle de son facteur de C-M égale a 0,6 (DEPp), on arrive à l'approximation suivante :

$$v_{cell} = \frac{(25\times10^{-12})\times(80\times8{,}84\times10^{-12})\times(0{,}6)\times(10^{10})}{3\times(10^{-6})} \approx 10^{-4}\ m/s$$

$$\text{Soit } v_{cell} \approx 100\ \mu m/s$$

Cette vitesse est typiquement de l'ordre de grandeur des vitesses d'écoulement des fluides observés dans des microcanaux. On peut donc envisager de marier les techniques basées sur le flux hydrodynamique et celles utilisant les forces de diélectrophorèse.

Comme nous venons de le voir, l'utilisation d'un champ électrique s'avère être très prometteuse. Mais un autre phénomène vient se greffer à son usage qui, lui, est peu désirable : c'est l'effet Joule. En effet, le passage de courant dans la solution entraîne un échauffement, dû à la résistivité de la solution. Or les cellules sont très sensibles à l'élévation de température. Ainsi une hausse de température supérieure à 4°C de la température physiologique entraîne rapidement la mort des cellules de mammifères. Sans monter jusqu'à cet extrême, une élévation de la température active une famille de protéines appelées protéines de choc thermique (*Heat Shock Proteins*)[132]. En s'activant, elles vont maintenir ou restaurer la structure des autres protéines touchées par l'élévation de la température. Leur activation correspond à un stress cellulaire. Pour évaluer l'élévation de température suite à l'application d'un champ électrique, plaçons-nous à l'échelle d'un microsystème, où la diffusion thermique domine. Nous obtenons alors l'ordre de grandeur de l'élévation de température dû à l'effet Joule [133]:

$$\Delta T \sim \frac{\sigma U^2}{2k}$$

Avec k la conductibilité thermique de la solution, U l'amplitude du signal sinusoïdal appliquée et σ la conductivité du milieu. Dans le cadre de nos expérimentations, nous limitons la conductivité à 10 $mS.m^{-1}$ et l'amplitude à 7V. D'où, en considérant la conductibilité thermique égale à celle de l'eau (k=0,6 $J.m^{-1}.s^{-1}.K^{-1}$) nous avons :

$$\Delta T \sim 0{,}4°C$$

Grâce à la faible conductivité de la solution, on limite ainsi drastiquement l'augmentation de température par effet Joule et par la même occasion le stress des cellules.

4. Application au déplacement et au placement cellulaire

Cela fait plus d'une vingtaine d'années que la diélectrophorèse sous toutes ses formes est insérée dans des dispositifs micrométriques. Dans le cadre de la manipulation cellulaire, trois voies se sont dégagées : le tri, le placement et le déplacement. La première application va jouer sur le phénotype électrique des cellules pour les différencier. En effet, les paramètres électriques de la cellule interagissent directement sur le critère de CM, entrainant pour une fréquence donnée, un signe et/ou une amplitude de la partie Re[K(ω)] différents entre deux familles de cellules. Cette technique, bien que très intéressante, ne nous concerne pas directement, car dans le cadre de notre travail, nous supposons que les cellules sont déjà triées. Pour plus d'informations sur ce domaine de la DEP, on se reportera aux références suivantes[20, 27, 134] (*Figure II-24*). Dans le cadre de notre projet nous nous intéressons donc au déplacement et au placement de cellules.

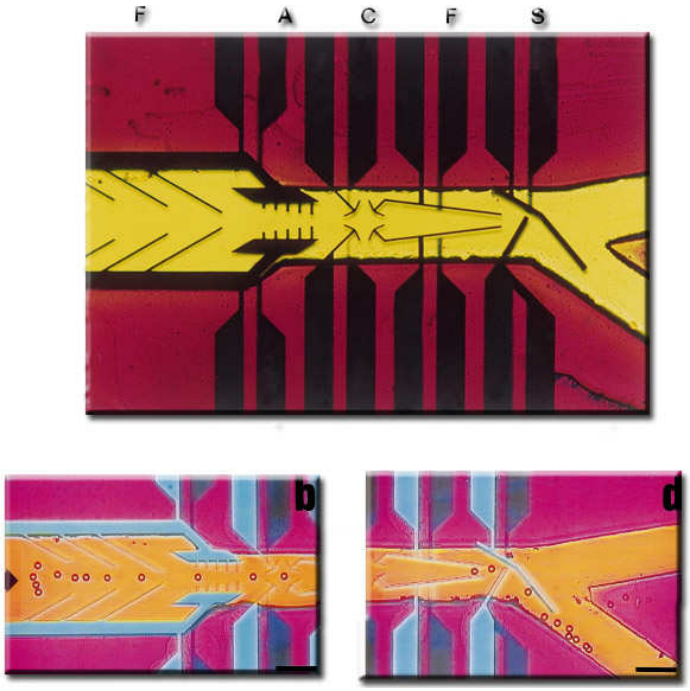

Figure II-24 : Photos d'un micro-cytomètre de flux composé de deux niveaux de réseaux d'électrodes planes. En haut, les lettres représentent la fonction du dispositif du réseau d'électrodes : F(Focalise), A(Aligne), C(Cage ou piège), S (Sépare). En bas, détails sur le microsystème en action avec des billes en latex [Fuhr].

a) Déplacer des cellules par DEP

À la vue des différentes techniques exposées précédemment, la diélectrophorèse à ondes progressives (tw-DEP) paraît la plus adaptée pour transporter des cellules sur une longue distance. Pour cela, on réalise une série d'électrodes interdigitées pour induire une force de translation qui entraîne ainsi les cellules. Pour optimiser l'écoulement des cellules, certaines équipes couplent la tw-DEP avec la DEPn pour permettre la lévitation des cellules.

Une autre technique plus complexe propose un système constitué d'un double réseau d'électrodes placé l'un au-dessus de l'autre et perpendiculairement l'un à l'autre. Ce dispositif forme en regardant à travers, une sorte de grille. En appliquant un champ alternatif entre les deux réseaux, on forme alors une cartographie de champ localisant les maxima de champ aux

intersections. En jouant sur la fréquence, ils peuvent ainsi piéger ou déplacer une cellule de maillage en maillage.

L'utilisation de la DEP pour le déplacement cellulaire reste encore marginale. Ceci s'explique principalement par la nécessité de mettre en place un grand réseau d'électrodes et parfois par un couplage à une électronique non triviale. Son usage est plutôt recommandé quand on cherche une intégration ultime du système (optique d'un laboratoire sur puce), et/ou lorsque l'on essaye de se passer de procédés mécaniques.

b) Placer des cellules par DEP à l'aide d'électrodes interdigitées

Il existe aujourd'hui un grand nombre de techniques pour piéger des cellules à l'aide de la diélectrophorèse. Nous allons commencer par le principe le plus simple qui consiste à placer deux peignes d'électrodes en regard l'un de l'autre [135]. Ce type de réseau d'électrodes est facile à fabriquer et nous permet d'appréhender avec simplicité la notion de cartographie de champ. Comme nous pouvons le voir sur la *Figure II-25*, une simulation de la cartographie de champ nous donne un bon aperçu de la disposition des cellules sous l'action de la DEPp ou DEPn.

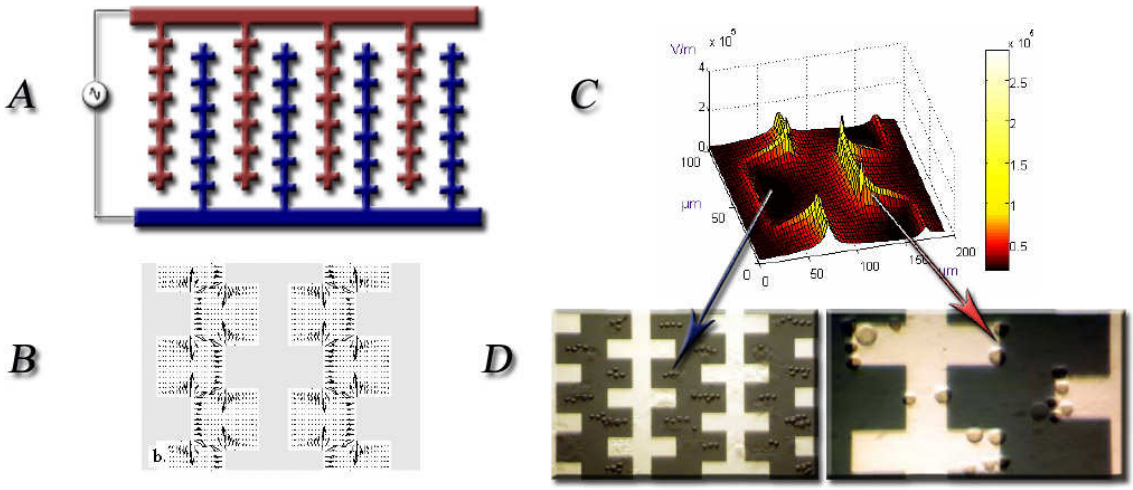

Figure II-25 : A) Schéma de principe d'un système à électrodes interdigitées. B) Vecteur correspondant à -∇(E²), dont dépend la force de diélectrophorèse (modélisation). C) Cartographie du champ électrique en 3D (simulation). D) Lien entre la simulation et l'expérimentation. Ici, mise en évidence de la DEPp aux maxima de champ (au bout des électrodes), et de la DEPn entre les électrodes [Frenea-Robin][20].

À l'aide de ce système, on peut donc capturer à un endroit spécifique un paquet de cellules, mais malheureusement pas une cellule isolée. C'est pour pallier ce problème que des dispositifs à quatre électrodes ou quadripôles ont été mis au point. En appliquant le même potentiel à l'électrode faisant face, on arrive ainsi à former une zone de champ nul au centre du quadripôle. Si les électrodes sont suffisamment rapprochées l'une de l'autre, on forme alors à l'aide de la DEPn une cage pouvant contenir une seule cellule [136]. Cependant, ce principe de capture de cellules ne résiste pas bien à l'action d'un flux hydrodynamique, car on ne peut pas augmenter inconsidérément la tension pour accroître la force de saisie. Comment expliquer une telle situation ?

En fait, plus on élève la tension, plus le champ augmente au fond du piège poussant la cellule vers le haut : elle lévite. La lévitation implique une diminution de la force de capture, ce qui rend la cellule plus facilement détachable par le flux [137] (*Figure II-26*). Pour pallier ce problème, la solution la plus simple consiste à élargir la distance inter électrodes. Un tel choix diminue la finesse du piège, mais en ajoutant une microcuvette de la taille d'une cellule, il est possible de retenir spécifiquement une seule cellule [50] (*Figure II-26*). Beaucoup plus compliqué à mettre en place, mais tout aussi efficace, la conception d'électrodes épaisses permet de former un champ intense en hauteur, augmentant la force de saisie[138] (*Figure II-26*). Un autre choix, plus subtil, repose sur la fabrication d'une géométrie d'électrodes bien particulière qui induit un réel puits de minima de champ [139] (*Figure II-26*), limitant ainsi drastiquement les effets de sustentation.

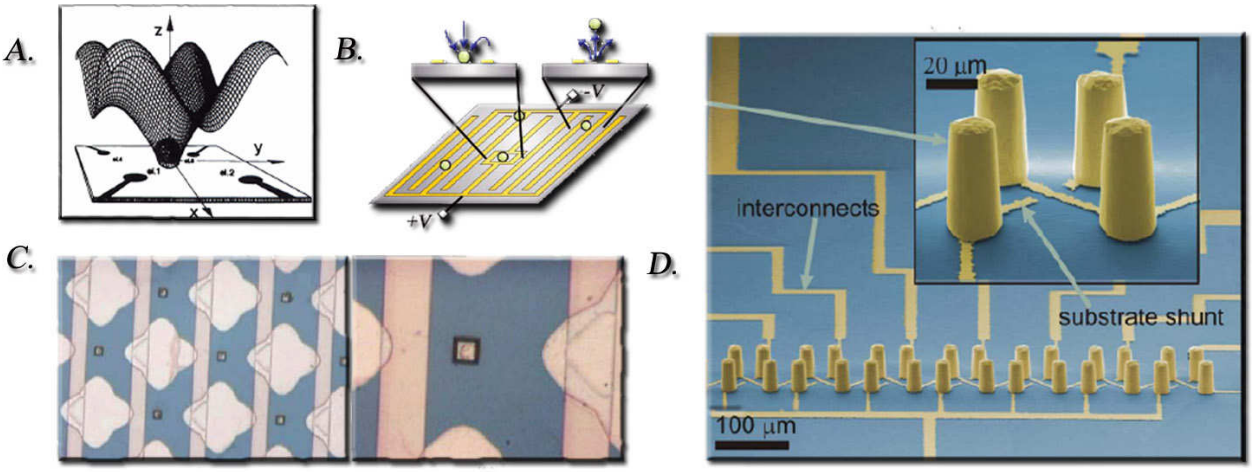

Figure II-26 : A) Illustration de la distribution de la force de DEPn induite par quatre électrodes planaires. La composante en z compense la force de sédimentation entraînant la lévitation de la cellule [Fuhr][19]. B) Géométrie d'électrodes planaires permettant de limiter l'effet de lévitation [Voldman][50]. C) Couplage de la force de DEPn induite par quatre électrodes avec une cuvette pour recueillir la cellule. D) Électrodes épaisses pour s'affranchir de la lévitation de la cellule [Voldman].

Toutes ces technologies dont nous venons de parler sont basées sur la DEPn. La DEPp est effectivement dans ce cas difficile à exploiter, car le maximum de champ se situe toujours au niveau des électrodes. C'est pourquoi, certains dispositifs se sont tournés vers des réseaux d'électrodes à deux niveaux, dits en trois dimensions (3D).

c) Placer des cellules à l'aide de réseaux d'électrodes en 3D

Les premiers réseaux d'électrodes en 3D ont été développés pour pallier le problème de lévitation lors de l'utilisation de la DEPn avec un réseau 2D [140]. Le dispositif consiste à placer de nouveau quatre électrodes, mais cette fois-ci sur la partie supérieure (voir *Figure II-27*). Si la hauteur séparant les deux réseaux n'est pas trop grande, on génère alors un champ électrique intense en 3D. La capture des cellules est donc meilleure, mais la difficulté technique est, du coup, augmentée. En effet, il faut aligner avec précision les deux réseaux d'électrodes lors de la fabrication. Ce type d'architecture reste plutôt dédié à la capture d'une cellule pour l'étudier. Lorsque l'on souhaite placer un grand nombre de cellules avec précision, ce sont de préférence des systèmes basés sur la DEPp qui sont utilisés. Pour cela, la technique réside dans le placement d'une électrode possédant une surface importante et d'une contre électrode recouverte d'un isolant sauf en certains endroits bien précis. Cette ouverture

sur la contre électrode permet de concentrer tout le champ électrique en un point précis, d'où la présence d'un maxima de champ local. En appliquant un champ alternatif de hautes fréquences, on génère ainsi un déplacement de la cellule par DEPp vers cette ouverture [141, 142] (voir *Figure II-27*). Cette technique est sûrement l'une des plus intéressantes que nous avons vue jusqu'à présent. Toutefois, sa fabrication demande un nombre d'étapes importantes.

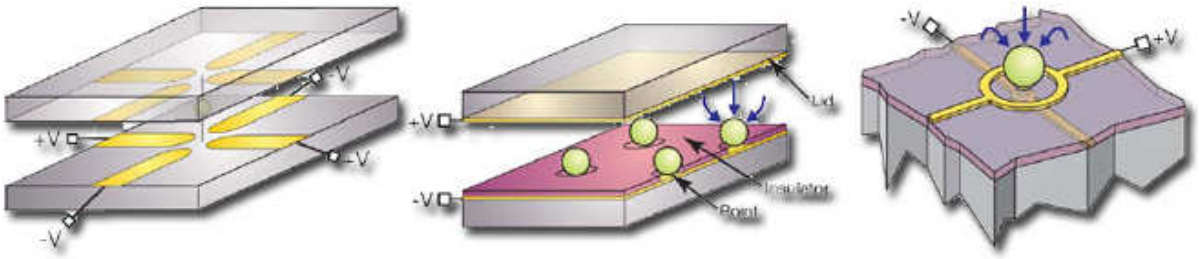

Figure II-27 : Trois principes différents de réseaux d'électrodes 3D pour capturer des cellules par DEP [Voldman][27].

d) Placer des cellules via des structures isolantes

Cette technique repose sur une idée simple qui consiste à placer des structures isolantes pour modifier la cartographie de champ. Ce changement de la répartition du champ provoque un gradient qui peut être exploité par la force de DEP. Malgré sa simplicité de conception, cette méthode reste cantonnée à quelques travaux. Pourtant, deux électrodes rectilignes mises en vis-à-vis et couplées à une paroi isolante entrouverte en son centre suffisent pour capturer efficacement une ou deux cellules en un point précis [143] (Figure II-28). D'autres travaux plus récents ont permis de capturer des bactéries à l'aide de la DEPp en plaçant simplement une matrice de plot isolant [144] (Figure II-28). Les études dans le

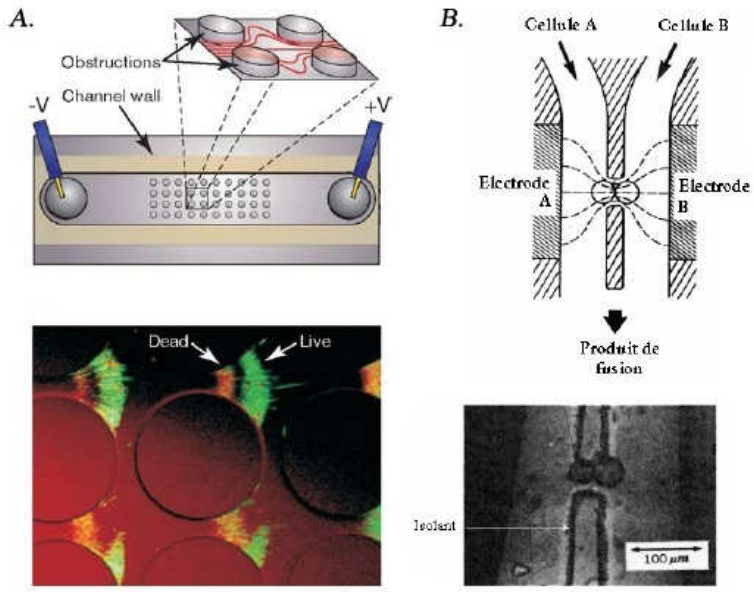

Figure II-28 : A) Schéma et photo du microsystème pour piéger des bactéries à l'aide de plot isolant. Remarquons que les électrodes ne sont pas intégrées au dispositif. B) Schéma et photo du microsystème permettant de capter deux cellules par DEPp pour ensuite les fusionner [Fintschenko].

domaine du placement cellulaire étant assez rares, citons celles utilisées assez astucieusement dans le tri cellulaire [145, 146].

5. Conclusion

Cette courte étude nous permet maintenant de mieux appréhender la réaction d'une cellule sous l'action d'un champ électrique continu ou non et uniforme ou non. Nous avons commencé avec l'électrophorèse, mais l'expérience nous montre que son emploi est difficile, en particulier à cause des effets électrochimiques. C'est plus précisément, les phénomènes de diélectrophorèse positive et négative qui nous semblent les plus prometteurs pour notre application. La DEP par ondes progressives demeure complexe à mettre en place et reste pour l'instant limitée au déplacement et au tri cellulaire. Par contre, utiliser en tandem la force de DEP et la force hydrodynamique est envisageable et prometteur. Quant à l'électrorotation, elle est principalement utilisée pour le moment à la caractérisation électrique des cellules, en étudiant leur spectre de rotation. En ce qui concerne les applications de la DEP, l'utilisation d'électrodes 3D et de structures isolantes paraissent les plus intéressantes pour le placement précis d'un grand nombre de cellules. Par contre, le choix entre DEPp ou DEPn ne peut encore être tranché à la lumière de nos spécifications. C'est au cours du paragraphe suivant, portant sur l'électrofusion, que l'une des forces nous apparaîtra comme étant la plus favorable.

Si jusqu'à présent nous avons privilégié des techniques qui préservaient l'intégrité de la cellule, nous allons aborder cette fois-ci, un procédé qui altère un couple de cellules et plus particulièrement leur membrane. Il s'agit de l'électrofusion.

E. Électrofusion

1. Introduction

L'électrofusion entre deux membranes lipidiques a été décrite en 1982 par Zimmerman[147]. Toutefois, la fusion entre deux membranes lipidiques est un phénomène se produisant à l'état naturel sans l'aide d'un champ électrique, il est même primordial à notre survie. En effet, sans lui, la grande majorité de l'information transmise par nos neurones serait tout simplement impossible. Rappelons que les neurones sont interconnectés entre eux par des synapses. Il existe deux types de synapses : les synapses électriques et chimiques[148]. Le premier se caractérise par le passage direct du courant ionique entre neurones. Celui-ci reste restreint à certains réseaux de neurones nécessitant une réponse rapide et une bonne synchronisation. Le second, représentant la majorité de nos interconnections neuronales, est basé sur la libération de neurotransmetteurs. Mais avant d'être libérés, nos neurotransmetteurs sont piégés dans de petites vésicules contenues à l'intérieur du neurone. Pour être expulsées à l'extérieur, les vésicules, sous l'action du flux nerveux, vont fusionner avec la membrane cellulaire et ainsi les relâcher. Cette fusion est rendue possible par des protéines fusogènes de la famille des SNARES[149] (voir *Figure II-29*). Mais nos cellules ne sont pas les seules à maîtriser cette technique. Une petite entité biologique en a même fait sa spécialité : les virus. À l'aide de glycoprotéines des virus, comme ceux de la grippe ou du SIDA, arrivent à fusionner avec nos cellules et à injecter leur génome[150]. Malheureusement pour nous, les cellules que nous tentons de fusionner n'ont pas cette capacité à fusionner entre-elle, ce qui nous oblige à forcer leur rencontre et leur fusion. Nous avons dans le chapitre précédent, discuté des techniques pour placer avec précision des cellules. Il nous reste maintenant à voir les différentes possibilités pour les fusionner. Lors du chapitre I, nous avons conclu que l'électrofusion semble être une des voies les plus prometteuses pour l'immunothérapie du cancer. C'est pourquoi nous allons concentrer ce paragraphe sur ce procédé.

Pour appréhender au mieux l'électrofusion, nous essayerons tout d'abord de comprendre les mécanismes biologiques mis en cause. Puis, nous étudierons les différentes techniques macroscopiques et microscopiques développées pour fusionner des cellules.

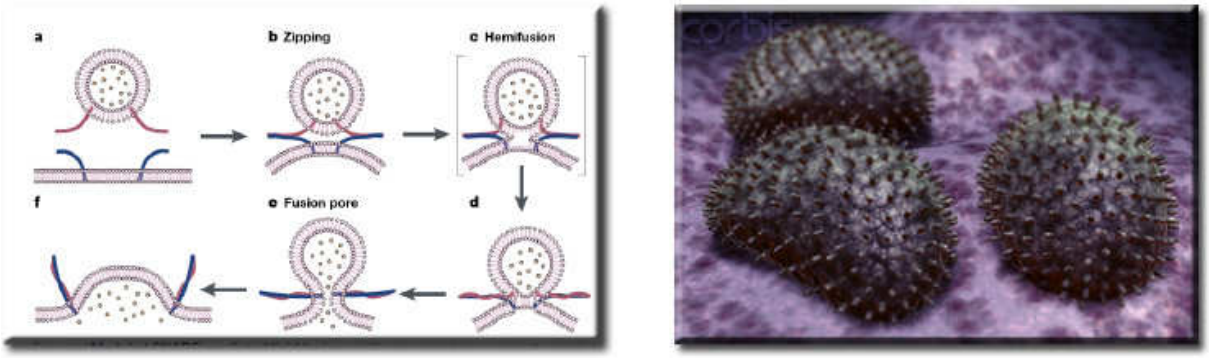

Figure II-29 : A gauche, principe de fusion d'une vésicule avec la membrane, grâce aux protéines SNARE [Scheller]. A droite, image stylisée de virus influenza prêts à fusionner avec la surface d'une cellule.

2. Une vision simplifié de l'électrofusion

Prenons une cellule contenant dans son cytoplasme un marqueur fluorescent comme la calcéine. Si nous appliquons un champ électrique intense (~500 V/cm) pendant un court instant (~100 µs), nous pouvons constater que la cellule perd de sa fluorescence. Si nous augmentons l'amplitude du champ (>2kV/cm), nous observons la destruction de la cellule. Ce phénomène observé pour la première fois il y a 50 ans se dénomme l'électroporation. Le terme *électro* fait référence à l'application d'un champ électrique et *poration* renvoie au phénomène induit par le pulse électrique, c'est-à-dire à la formation de pores. L'idée est la suivante : le pic de champ provoque une telle différence de potentiel entre la surface interne et externe de la membrane, que des pores se formeraient aux endroits les plus exposés. Ces pores laissant passer l'eau et les ions, permettraient ainsi de diminuer l'énergie électrostatique accumulée de part et d'autre de la membrane. Le facteur clef de l'électroporation est donc la différence de potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_E$) induit par le pic de champ électrique. Celui-ci peut s'exprimer d'une façon simple, en supposant que la membrane de la cellule est sphérique et se comporte comme un diélectrique sans perte, ainsi [151]:

$$\Delta\Psi_E = -1{,}5 \times r \times E \times \cos\theta \quad (\textit{Équation II-11})$$

Où *E* est la force du champ électrique, *r* le rayon de la cellule et θ l'angle entre la direction du champ électrique et la normale de la surface de la cellule au point étudié. Précédemment nous avons vu que la cellule possède un potentiel transmembranaire au repos ($\Delta\Psi_0$). On en déduit ainsi la différence de potentiel transmembranaire totale :

$$\Delta\Psi_T = \Delta\Psi_0 + \Delta\Psi_E$$

$\Delta\Psi_0$ ayant la même valeur tout le long de la cellule (~+/-50 mV), la $\Delta\Psi_T$ sera plus importante du côté de la cellule faisant face à l'anode que celle faisant face à la cathode. A la vue de ces équations et du phénomène d'électroporation, il existe donc une valeur de différence de potentiel membranaire critique ($\Delta\Psi_{Tc}$), où se forme un premier pore (*Figure II-31*). A la suite de nombreuses expériences, cette valeur a été évaluée à environ 0,2-0,3V et cela, quelque soit le type de cellule [152]. A la vue de ce résultat, on en conclut que l'électroporation de la cellule est d'autant plus importante que le champ est élevé et que la cellule est volumineuse.

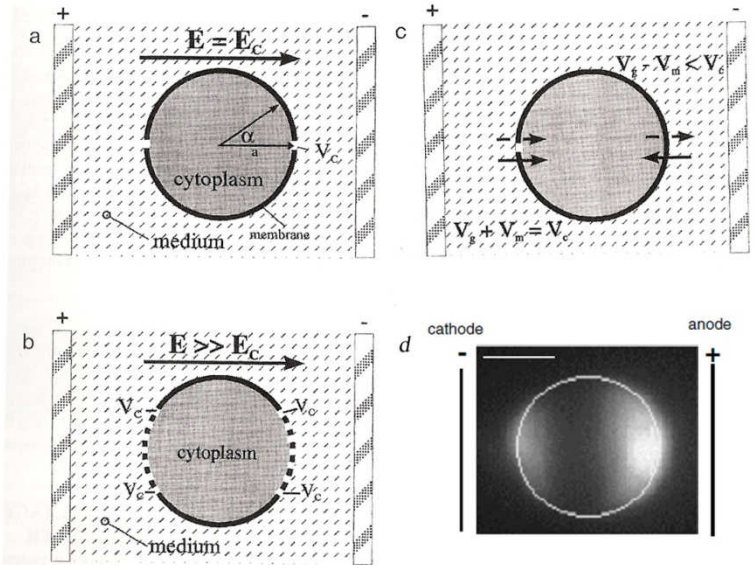

Figure II-31 : Diagramme schématique de l'électroporation d'une cellule (a,b,c)[Zimermann][1]. A) Pour que les premiers pores se forment, il faut dépasser la valeur d'intensité de champ critique Ec. B) Plus le champ est intense, plus les pores se forment loin de l'équateur de la cellule. C) En prenant en compte le potentiel transmembranaire de la cellule au repos (V_m) on s'aperçoit que le champ est plus intense côté anode (les potentiels sont dans le même sens). D) Mise en évidence de l'asymétrie de l'électroporation de la membrane à l'aide d'un marqueur fluorescent (iodure de propidium) [Rols][52].

La perméabilisation de la membrane permet aussi la pénétration de molécules à l'intérieur de la cellule. Cette technique est ainsi largement employée pour introduire de l'ADN dans le cadre de la thérapie génique [153]. Elle a donné lieu également, à la mise en place d'une nouvelle thérapie anticancéreuse : l'électrochimiothérapie. Celle-ci est basée sur l'injection, à l'aide de l'électroporation, d'un puissant poison (bleomycin) directement dans le cytoplasme des cellules cancéreuses [154]. Si nous soumettons maintenant, un couple de cellules à un champ électrique intense (>1kV/cm), nous allons électroporer leur membrane sur une importante surface. Si ces cellules sont accolées nous pouvons observer leur fusion (*Figure II-30*). C'est ce que l'on nomme l'électrofusion. Ce phénomène est dépendant des mêmes paramètres que ceux de l'électroporation en y ajoutant l'élément indispensable : un contact entre les cellules.

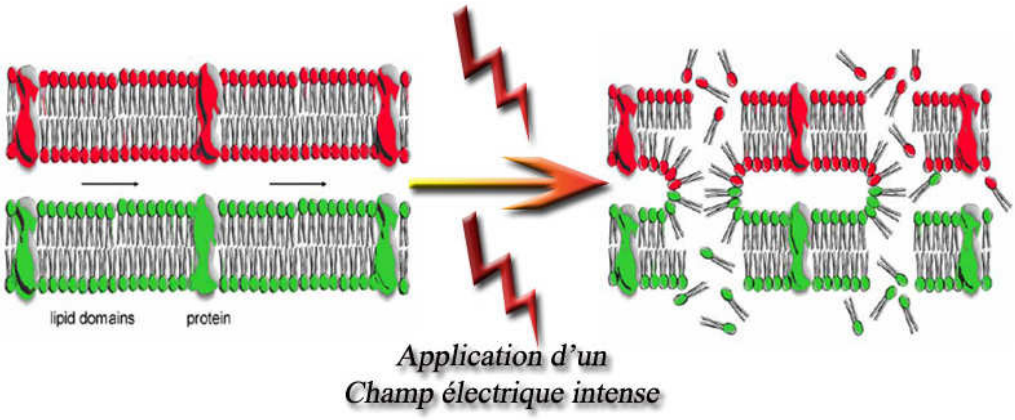

Figure II-30 : A gauche, schéma représentant deux membranes cellulaires (rouge et verte). A droite, suite à l'application d'un champ électrique les membranes sont partiellement détruites, ce qui permet la fusion (inspiré de [Schaper][25]).

3. Une vision de l'électrofusion un peu plus proche de la réalité

La théorie de l'électroporation que nous venons d'aborder a l'avantage d'être simple à appréhender : le champ électrique forme des trous au niveau de la membrane ce qui induit un flux entre les milieux extracellulaire et intracellulaire. Cependant, ces pores n'ont jusqu'à présent jamais été observés, d'où une remise en question de cette théorie. Peut-on alors expliquer ce phénomène de transport au travers de la membrane sans la notion de pores ? Pour certaines équipes, cela semble plausible, même si le phénomène n'est pas encore bien compris [52]. Pour d'autres, seule la théorie des pores reste valable pour expliquer les résultats expérimentaux [155]. A la vue de ces divergences d'interprétation, il paraît plus convenable de modifier le nom électroporation en électroperméabilisation. Ce terme étant dans tous les cas, physiquement juste.

Si les différentes équipes sont en désaccord sur ce qui provoque la perméabilisation de la membrane, il existe un certain consensus sur les différentes étapes de ce phénomène. On peut ainsi le décrire en cinq phases [156]:

- Déclenchement de la perméabilisation de la membrane suite à l'application d'un champ électrique critique qui augmente considérablement le potentiel transmembranaire (échelle de temps : µs).
- Expansion du phénomène tant que le champ électrique est maintenu supérieur à la valeur critique. La membrane est alors perméable aux macromolécules (échelle de temps : entre µs et ms).
- Stabilisation, dès que l'intensité du champ est inférieure à celle de l'étape 1. La membrane se réorganise très rapidement mais reste perméable aux petites molécules (échelle de temps : ms).
- Récupération, les fuites sont *colmatées* lentement (échelle de temps : s).
- Effet mémoire, la membrane ne fuit plus mais ses propriétés structurales prennent plus de temps à se stabiliser (échelle de temps : h).

Dans le cadre de l'électrofusion, la fusion entre les cellules peut se produire durant l'étape 2, 3 ou 4. En effet, des expériences montrent que des cellules préalablement électroporées, puis mises en contact, fusionnent [157]. Après la fusion le temps de récupération est encore plus long, en particulier avec la réorganisation du cytosquelette (échelle de temps : h).

Revenons maintenant aux phénomènes de perméabilisation. Si l'observation ne permet pas de mettre en évidence des pores, le calcul fournit aujourd'hui un outil intéressant pour modéliser les effets d'un champ électrique intense sur une membrane cellulaire. Elle ouvre ainsi de nouvelles hypothèses pour expliquer ce phénomène:

- Lorsque l'on veut électroporer une cellule, la différence de potentiel transmembranaire doit être d'environ 0,2 V. Or, la membrane ne mesure que 5nm ce qui génère un champ électrique de plus de 10 MV/m (proche des valeurs de champ se produisant lors d'un éclair). Ce champ intense va donc exercer une force de pression sur la barrière lipidique de la membrane. Ce phénomène d'électrocompression amènerait les deux couches lipidiques à se

resserrer l'une contre l'autre. Cette déstabilisation provoquerait une perturbation importante dans l'empilement des lipides et favoriserait ainsi directement ou indirectement sa perméabilisation.

- Une autre conséquence de l'hyperpolarité serait la pénétration de molécule d'eau dans les couches lipidiques (hydratation de la membrane) qui pourrait même aller jusqu'à la formation de canaux d'eau. Ces résultats sont issus de différentes simulations qui fixent toutefois comme condition des champs électriques bien trop élevés (E~0,4V/nm) [158-160]. De tels champs appliqués sur des cellules réelles, les détruiraient.
- Une autre théorie s'appuie sur le phénomène de réorientation des lipides, plus connu sous le nom de flip-flop. Ce phénomène est caractérisé par le passage d'un lipide d'une couche à l'autre. Des simulations [161] et surtout des expérimentations [162] rapportent une augmentation significative de ce phénomène suite à l'électroperméabilisation de la membrane. On peut de ce fait imaginer que, si un grand nombre de lipides se retournent, ils pourront telle une roue à aubes, entrainer des molécules à travers la membrane.

Il existe encore de nombreuses autres théories : comme la réorientation des têtes polaires, la formation de micelles [163], ou encore l'intervention de protéines membranaires dans le processus… Il reste donc encore une large zone d'ombre sur la perméabilisation de la membrane, mais les microsystèmes joueront peut être un rôle en permettant une meilleure observation. Pour l'électrofusion, le phénomène est encore très mal compris. On sait juste que la perméabilisation permet la mise en contact des cellules et qu'elle doit être d'une intensité bien supérieure à celle de l'électroperméabilisation [164]. Si la théorie de l'électrofusion reste encore à élucider, son application a été mise en place par de nombreux systèmes.

4. Dispositif macroscopique pour l'électrofusion

Au cours du 1er chapitre, nous avons abordé les travaux de différentes équipes ayant utilisé l'électrofusion. Toutes ces études étaient basées sur un appareillage macroscopique et suivaient des protocoles expérimentaux différents. Analysons donc ces techniques en détail.

a) Appareillage et protocole expérimental

La grande majorité des biologistes ou cliniciens amenés à faire de l'électrofusion ont à leur disposition des équipements permettant d'électroporer des cellules. Ces dispositifs commerciaux comprennent une cuvette en plastique et deux parois métalliques constituant les électrodes (généralement en aluminium) (*Figure II-32*). Ces cuvettes sont ensuite connectées à un générateur qui délivre, via les électrodes, des pulses de tension. Dans le cadre de l'électrofusion, l'appareillage électronique est modifié pour fournir un champ alternatif de faible tension. Certaines cuvettes ont toutefois été optimisées pour l'électrofusion, comme celles développées par Zimmermann. Celles-ci sont constituées de deux fils de platine bobinés l'un en face de l'autre, de telle sorte que l'espace inter-électrodes soit de 200µm. La solution est contenu dans l'espace inter-électrodes (*Figure II-32*).

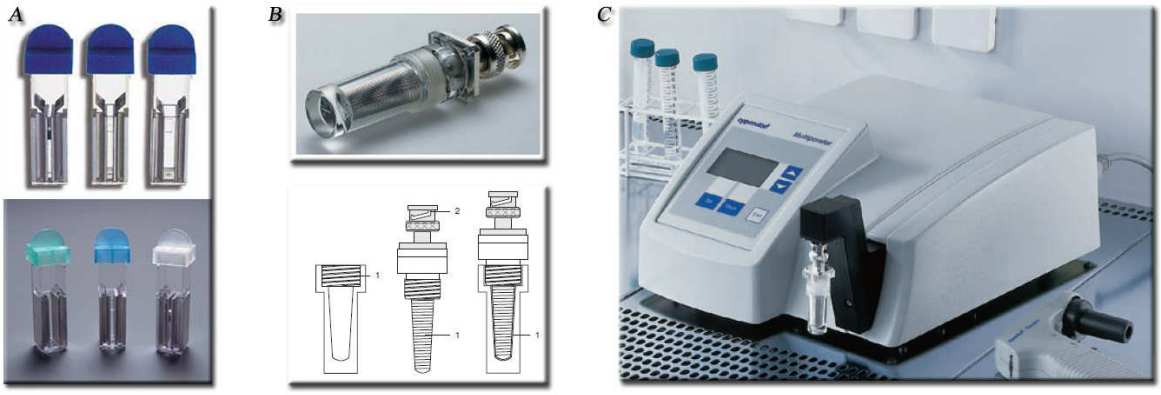

Figure II-32 : A) Cuvettes constituées d'électrodes, utilisées pour électroporer ou électrofusionner. B) Cuvette optimisée pour l'électrofusion et schéma du principe de fonctionnement. C) Multiporateur permettant de délivrer le champ électrique dans une cuvette standard ou optimisée (société Eppendorf).

Si la plupart des équipes se servent d'un équipement similaire, le choix du protocole expérimental est lui plus disparate. La grande majorité suit tout de même une démarche similaire, seuls les paramètres électriques changent. La première étape consiste à accoler les cellules entre elles. Pour cela, on applique un faible champ électrique souvent alternatif, qui sous l'action du dipôle induit, va attirer les cellules entre elles, formant alors « des colliers de perles ». La seconde étape réside dans l'application de forts pics de tension pour provoquer la fusion des cellules. Enfin, pour garder les cellules en position il est conseillé de soumettre à nouveau les cellules à un faible champ électrique alternatif durant un court moment.

Auteur	Année	Milieu de Fusion	Cellules /ml	Alignement	Fusion	Post-Fusion
Scott-Taylor et al.[85]	2000	Isotonique, 0,3M de sucrose, NaCl	$1,5.10^6$	DC, 100V/cm, 5s	600V/cm	5 min repos
Parkhurst et al.[165]	2003	5% glucose, 0,1mM Ca, 0,5mM Mg, 0,3% BSA	1.10^7	AC, 150V/cm, 10s	1,2kV/cm, 25µs, 1 pulse	5 min repos
Trevor et al.[166]	2004	Isotonique, sorbitol, milieu commercial	2.10^7	AC, 100V/cm, 30s	2kV/cm, 40µs, 4 pulses	AC, 112V/cm, 55s
Zimmermann et al.[49]	2006	Hypotonique, 75mM Sorbitol, 0,1mM Ca, 0,5mM Mg.	2.10^6	AC, 900V/cm, 2Mhz, 20s	1,5kV/cm, 40µs, 3 pulses	AC, 500V/cm, 30s, puis 10 min repos

Tableau II-2 : Comparaison de quatre protocoles suivis pour électrofusionner des cellules cancéreuses et des cellules dendritiques.

Le *Tableau II-2* recense différents travaux de recherche ayant réussi à fusionner des cellules dendritiques avec des cellules cancéreuses. On remarque que le protocole est optimisé au fur et à mesure des années, en particulier durant la phase d'alignement. L'usage d'une tension continue est rapidement écarté. Son emploi est en effet nocif pour les cellules, entrainant des réactions électrochimiques au niveau des électrodes [27]. Aujourd'hui, ce sont les travaux de Zimmermann qui font référence, avec un rendement de fusion d'environ 20% (mesure FACS et analyse au microscope). Mais, un bon résultat ne s'explique pas que par un choix judicieux des paramètres électriques, il est aussi dû en partie aux propriétés du milieu. Regardons alors ce qui fait un bon milieu d'électrofusion.

b) Choix du milieu d'électrofusion

Pour élaborer au mieux le milieu cellulaire destiné à l'électrofusion, analysons les principales contraintes. Premièrement, nos travaux sont basés sur l'emploi de champs électriques qui sont pendant de courts instants très intenses (électrofusion). Deuxièmement, nous devons préserver la viabilité cellulaire. De ce fait, l'usage de champs électriques nous oblige à limiter la concentration en ions de la solution pour diminuer au maximum la conductivité et ainsi réduire l'augmentation de la température par effet Joule (voir II.D.3). De plus, dans le cadre de la DEPp, il nous faut un milieu moins conducteur que celui du cytoplasme de la cellule (~0,4S.m^{-1}). Cette réduction de la concentration en ions a pour conséquence de rendre la solution hypotonique. À titre d'exemple, une cellule présente dans une telle solution éclate rapidement sous la pression osmotique (voir *Figure II-33*).

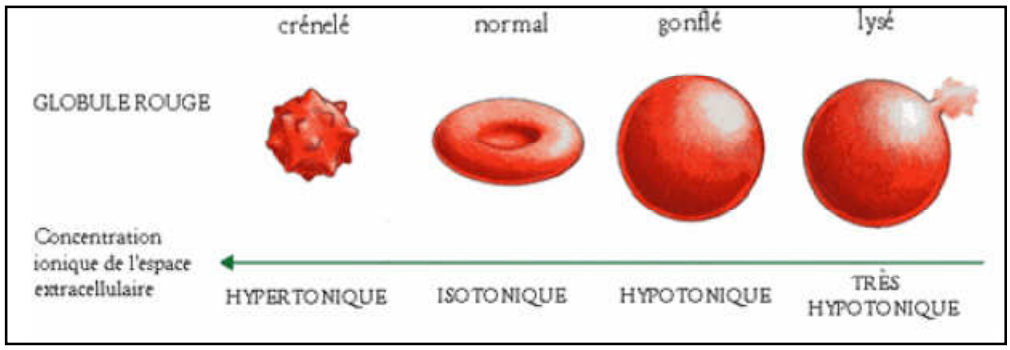

Figure II-33 : Réponse d'un globule rouge soumis à différentes concentrations ioniques du milieu extracellulaire [Watson][6].

Le phénomène mis en jeu est en fait lié à l'équilibre hydrique dans la cellule. C'est-à-dire que la membrane se comporte comme une barrière semi-perméable séparant deux solutions de concentrations différentes. Dans ce cas, ces solutions exercent sur la membrane une pression proportionnelle à leur concentration. Afin d'équilibrer cette pression, un flux d'eau du milieu hypotonique vers le milieu hypertonique va se produire à travers la membrane. Lorsque la concentration entre les deux milieux est identique, on obtient des milieux dits isotoniques. Une cellule immergée dans une solution hypertonique aura donc tendance à se rétracter suite à la sortie de l'eau et inversement à gonfler en présence d'un milieu hypotonique. Dans les cas extrêmes de solutions très hypertoniques (eau de mer) ou très hypotoniques (eau distillée) la cellule sera détruite. C'est donc pour ces raisons que nous devons rétablir une osmolarité suffisante pour que les cellules survivent (~300mOsm/l, qui se lit Miliosmoles/litre). La solution consiste à introduire dans le milieu une molécule perméable à la membrane cellulaire, non conductrice et non toxique pour les cellules. Le choix se porte très souvent sur l'emploi de sucre (glucose, sorbitol…) soluble et peu coûteux. Ainsi, en se reportant au *Tableau II-2*, on constate que la concentration en ions ne représente en général que 0,6mM (millimolaire = millimole/litre), soit une osmolarité avoisinant 2mOsm/l. En ajoutant simplement une concentration d'environ 300mM de sucrose, on retrouve une solution isotonique pour les cellules.

Un autre facteur important pour les cellules est le pH (potentiel Hydrogène) de la solution. Celui-ci doit être conservé proche de 7,4. Pour garder cette valeur constante dans le temps, on peut avoir recours à un tampon constitué d'un acide faible et de sa base conjuguée.

Une fois notre solution apte à recevoir des cellules, il est possible d'optimiser certains éléments pour améliorer le rendement de fusion. Ainsi, l'utilisation de cations comme le Mg^{2+} et le Ca^{2+} facilite la fusion et la *cicatrisation* des cellules. De même, l'ajout d'albumine (très grosse protéine) aide à augmenter le rendement de fusion, sans en connaître encore la raison [1]. Il est aussi recommandé de garder une température du milieu entre 20 et 30°C. Enfin, nous avons vu à l'*Équation III-11*que plus la cellule a un rayon important, plus il est facile de la perméabiliser. Elle est aussi plus sensible à la DEP (voir *Équation III-8*). En partant de ce constat, il peut être intéressant de faire grossir la cellule. La technique consiste alors à modifier le milieu isotonique en un milieu hypotonique. La cellule va ainsi gonfler. Mais, si l'on utilise simplement du saccharose, la cellule va au bout de quelques minutes reprendre sa forme initiale (comme en milieu isotonique) en activant ses canaux. Pour pallier ce phénomène, il suffit d'utiliser du Sorbitol [49]. Celui-ci étant plus petit, il passe plus facilement à travers les canaux de la membrane et compense ainsi le reflux généré par ces mêmes canaux. Les cellules ainsi gonflées ont leur cytosquelette dissous et ont donc une forme plus sphérique et une surface lisse, ce qui facilite ainsi le contact entre les cellules. Ce type de milieu engendre un stress cellulaire, il est donc conseillé de limiter le temps d'immersion à 30 minutes.

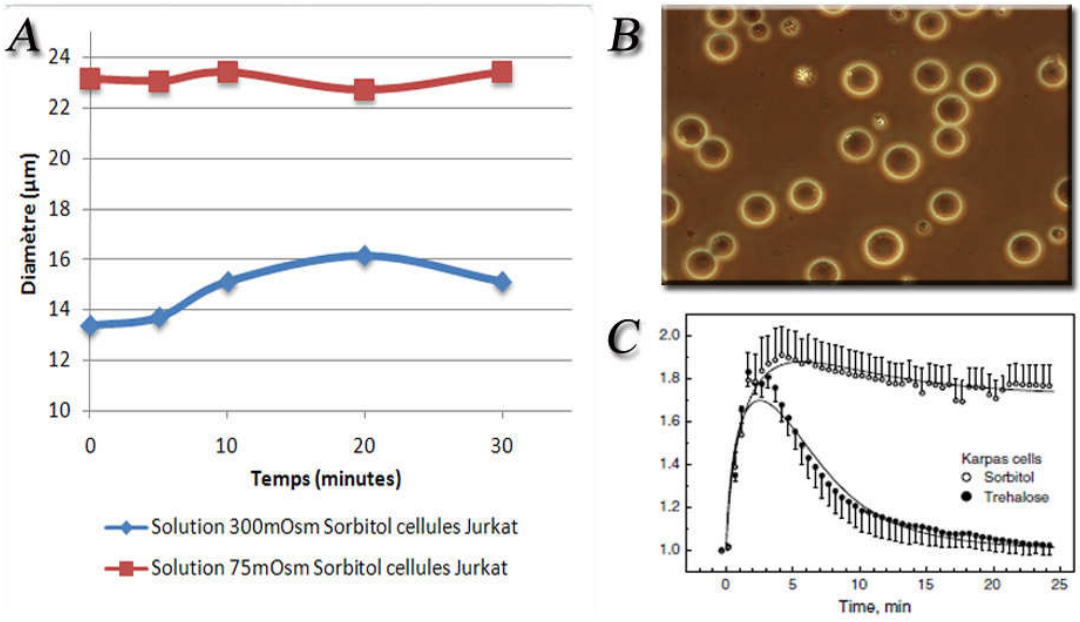

Figure II-34 : A) Effet d'une solution hypotonique versus isotonique à base de sorbitol sur le diamètre de cellules Jurkat. B) Cellules Jurkat immergées dans une solution de sorbitol de 75mOsm. C) Évolution du volume relatif de cellules Karpas en fonction du temps sous Sorbitol et sous Trehalose [Zimermann][49].

5. Dispositif microscopique pour l'électrofusion

Les dispositifs macroscopiques ont l'avantage d'être faciles à mettre en place et sont déjà commercialisés. Pourtant, leur rendement reste assez faible (<20%) et les hybridomes ainsi obtenus, comprennent souvent bien plus de deux cellules, limitant probablement leur activité biologique (voir chapitre I). Nous avons vu dans les chapitres précédents que les dispositifs microscopiques ont la capacité de contrôler avec finesse le déplacement et le placement de cellules. Toutefois, les microsystèmes développés pour fusionner avec précision et en grande quantité deux types cellulaires distincts sont plutôt rares. Les premiers sont apparus au début des années 90, mais sont restés peu exploités jusqu'aux années 2000. On note toutefois un regain d'intérêt depuis trois ans pour cette thématique.

Le nombre de dispositifs étant limité nous allons tous les aborder, en les classant par groupes de techniques similaires.

a) Dispositif à électrodes interdigitées

A ma connaissance le plus ancien document relatant la conception d'un microsystème pour l'électrofusion (voir *Figure II-35*) est un brevet datant de 1988 déposé par la société Du Pont de Nemours [167]. Celui-ci décrit un dispositif équipé d'électrodes fines interdigitées, couplées à un canal microfluidique. Le processus est assez simple : on introduit une mixture comprenant les deux espèces cellulaires à fusionner via le canal, puis à l'aide de la DEPp, on bloque et on positionne les cellules. Ensuite, un pulse de tension est envoyé pour fusionner les cellules (~2kV/cm, 12µs). Trois exemples à la fin du document relatent la réussite de l'emploi d'un tel système pour la production d'hybridomes dédiés à la synthèse d'anticorps. Ce dispositif est assez archaïque, mais préfigure déjà les futurs microsystèmes, en couplant fluidique et DEP.

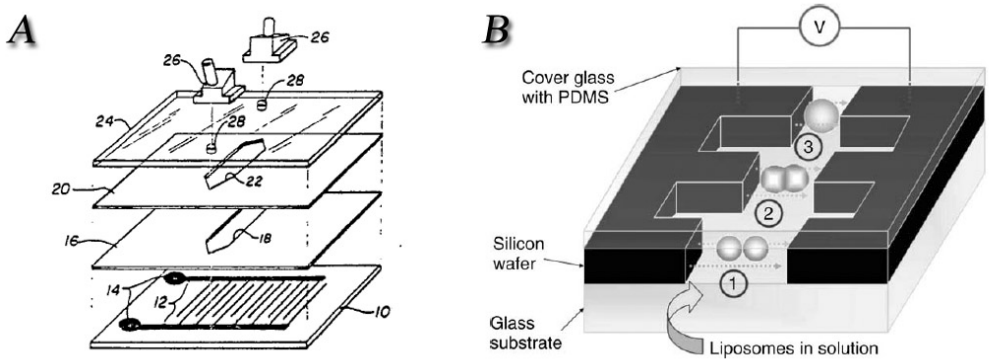

Figure II-35 : A) Schéma des différentes couches du système développé par Du Pont de Nemours. B) Schéma de principe du dispositif conçu par Tresset et al.

Il faudra attendre 2004 et les travaux de Tresset et al, pour retrouver un système et un protocole comparables [168]. Ce dispositif a été tout de même, optimisé en étant équipé d'électrodes épaisses en silicium fortement dopées (champ uniforme dans l'espace) et d'un design d'électrodes favorisant un champ électrique intense dans un espace plus localisé. Cependant, leurs travaux se limitent à la fusion de liposomes, bien plus faciles à fusionner que des cellules de mammifères. On ne peut donc comparer leur rendement de fusion avec ceux observés dans les dispositifs macroscopiques. Trois ans plus tard, une équipe chinoise a repris ces travaux en métallisant cette fois-ci les électrodes épaisses de silicium pour améliorer leur

conductivité [169]. Leurs résultats sont malheureusement focalisés sur la fusion de cellules végétales (protoplastes de mésophile de concombre) et donc non exploitables pour les comparer avec les résultats précédents.

b) Dispositif à base de structures isolantes

A ma connaissance un seul dispositif représente cette catégorie. Il a été développé à la fin des années 80 par Washizu et al [143] (voir *Figure II-36*). Nous en avons déjà discuté durant l'étude sur la DEP (D.4.d)). Son design est intéressant sur plus d'un point. Tout d'abord, l'emploi de structures isolantes permet de former une cartographie de champ favorable à la capture par DEPp d'une cellule en une position bien précise. Ensuite, ces mêmes structures font office de parois, permettant de délimiter deux canaux. Ainsi, en injectant un type cellulaire précis dans chacun des canaux et en soumettant ces cellules à la DEPp, le dispositif permet la mise en contact de deux cellules distinctes. Remarquons qu'en utilisant la DEPp, les cellules se placent dans une zone de maximum de champ, donc particulièrement favorable à l'électrofusion. Il suffit donc maintenant d'appliquer un pic de tension pour provoquer la fusion des deux cellules ainsi piégées. Ce microsystème est cependant limité par un nombre de fusions d'une centaine par jour, donc incompatible avec un traitement clinique nécessitant au moins 10^4 hybridomes (On suppose que les hybridomes issues de la fusion entre seulement deux cellules seront plus actifs, sinon il faut compter au moins 10^6 hybridomes). Toutefois, nous verrons par la suite comment résoudre ce problème en parallélisant simplement cette structure.

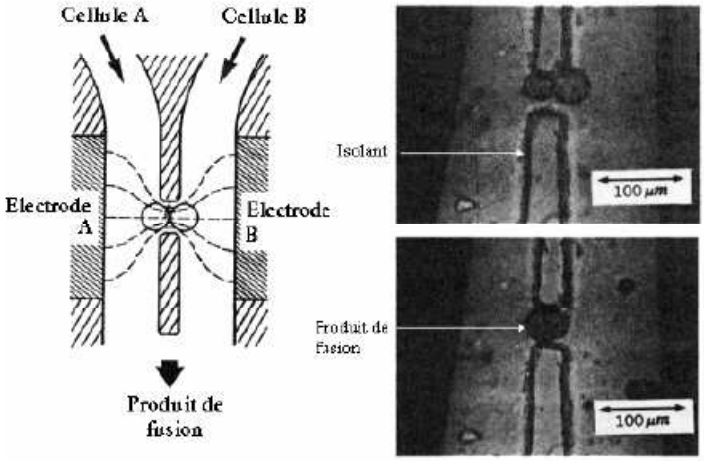

Figure II-36 : Principe et photos du dispositif développé par Washizu et al pour fusionner avec précision deux types cellulaires différents.

c) Dispositif basé sur la fonctionnalisation de surface par anticorps

Ces travaux reposent sur le travail d'une étudiante en thèse de l'université de Bremen [112]. Son thème de recherche est identique au mien, tout en étant focalisé sur l'immunothérapie du cancer du sein. Elle a donc développé plusieurs microsystèmes dans le but d'électrofusionner des cellules dendritiques avec des cellules cancéreuses de sein. L'un de ces principaux dispositifs est conçu de la façon suivante (voir *Figure II-37*):

- Une première étape consiste à fabriquer de simples électrodes planes séparées d'une centaine de micromètres.
- Ensuite, à l'aide de la technique d'impression par microcontact (voir II.C.5.a), elle fonctionnalise cet espace interélectrode en formant des bandes d'une dizaine de micromètres pour y greffer des anticorps spécifiques d'un type cellulaire.
- Puis, elle injecte les cellules qui interagissent avec les anticorps. Elle obtient alors des lignes de cellules d'une même famille.
- elle injecte ensuite le deuxième type de cellules qui viennent alors remplir les interstices. Elle crée ainsi des lignes de cellules distinctes.
- Enfin, elle applique le protocole électrique standard : DEPp (alignement et mise en contact des cellules) et électrofusion.

Malheureusement, lors de ses recherches sur le meilleur paramètre électrique de fusion entre une cellule cancéreuse du sein et une cellule dendritique, elle a constaté que l'écart d'intensité de champ entre les deux types cellulaires était trop important : 1.8kV/cm pour les cellules cancéreuses et 8,5kV/cm pour les cellules dendritiques. Du coup, le champ permettant la fusion des cellules dendritiques est beaucoup trop intense pour laisser les cellules cancéreuses encore en vie. Elle n'a donc pas réussi à obtenir d'hybridomes viables.

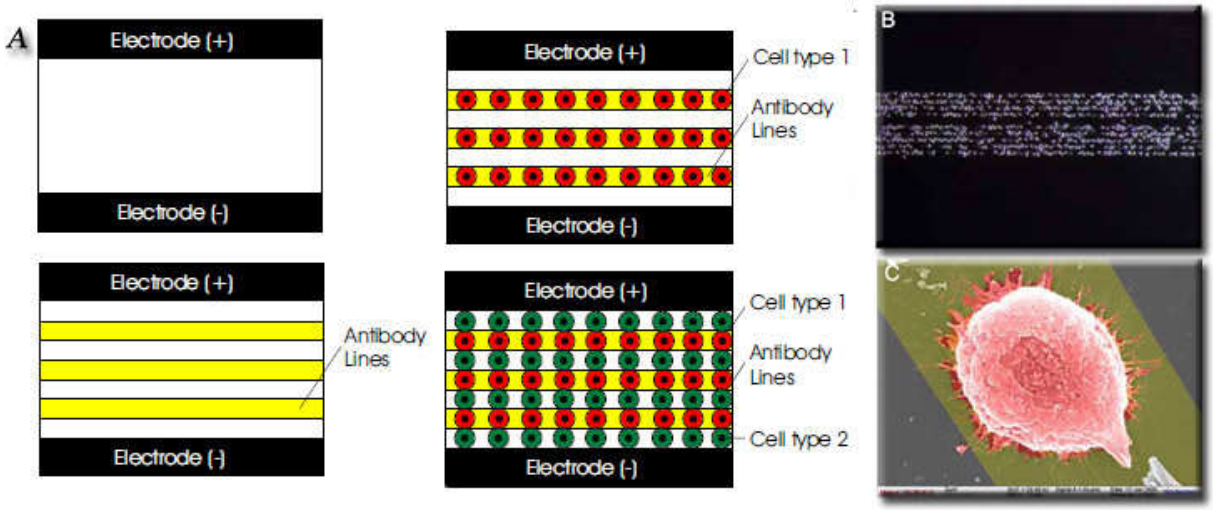

Figure II-37 : Immobilisation et arrangement de cellules par fonctionnalisation de surface avec des anticorps pour générer par électrofusion des hybridomes. A) Schéma de principe du système B) capture d'une famille de cellules arrangées sur des lignes parallèles. C) Image MEB d'une cellule capturée par des anticorps [Schaper].

d) Dispositif microfluidique

Il y a encore peu, je n'aurais pas abordé cette méthode pour fusionner des cellules. Mais cela était sans compter sur les tout derniers travaux de l'équipe du professeur Voldman publié en février 2009, pendant l'écriture de ce chapitre [170]. Le dispositif élaboré est une optimisation de celui développé pour capturer en grand nombre des cellules uniques (voir C.2). Le principe du piège est cette fois-ci un peu plus complexe, mais reste relativement simple à mettre en œuvre (voir *Figure II-38*). Les résultats obtenus sont remarquables : ils arrivent à former dans plus de 70% des cas, un couple de cellules issues de familles cellulaires différentes et cela à grande échelle (environ 1000 pièges). Leur étude ne s'arrête pas là, leur

système pouvant être équipé d'électrodes, ils comparent la fusion par PEG à l'électrofusion (voir *Figure II-38*). Le constat est identique aux conclusions abordées au cours du chapitre I, le rendement par électrofusion est meilleur que celui par PEG (au moins 2 fois supérieur, selon leurs travaux). Cependant, dans un cas seulement le PEG est recommandé : lorsque la taille des cellules à fusionner est trop différente (en concordance avec les travaux précédents). Remarquons que dans le cas de l'électrofusion, ils récupèrent plus de 50% d'hybridomes parmi toute la population cellulaire (*voir Figure II-38*), soit plus que le rendement théorique maximum dans le cas de l'utilisation d'une cuvette. Ce rendement peut même monter jusqu'à 90% si l'on ne prend en compte que les couples de cellules ! Enfin, durant leur expérimentation d'électrofusion, ils utilisent le milieu mis au point par Zimmermann (voir *Tableau II-2*) et un protocole électrique assez proche (même générateur de pulses société Eppendorf).

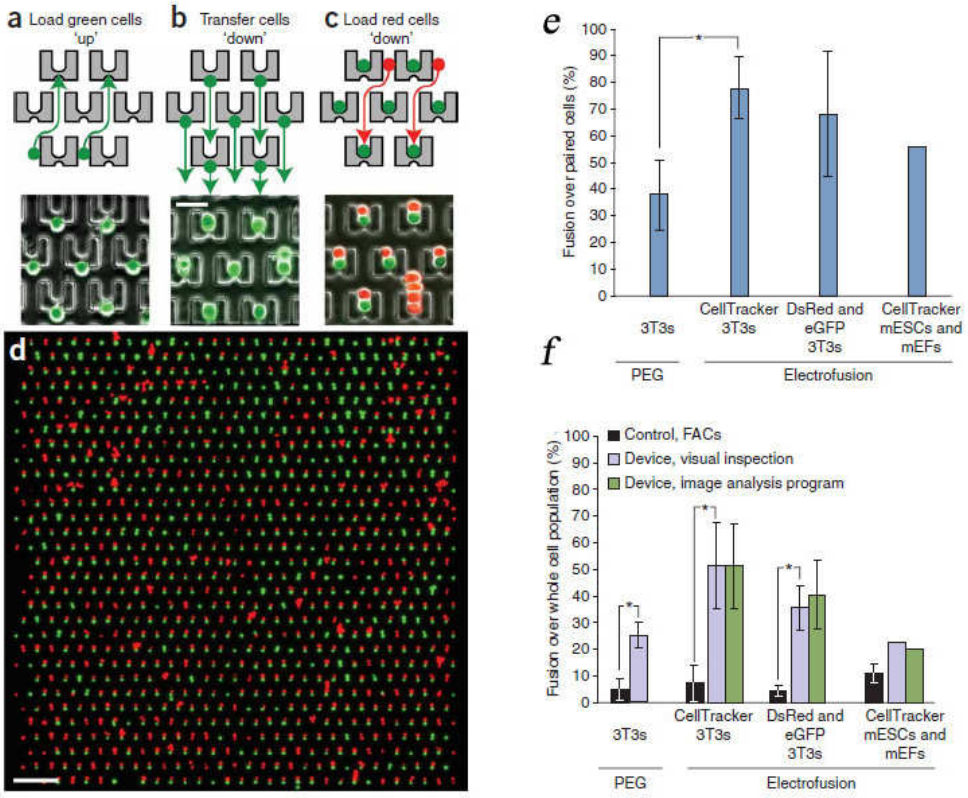

Figure II-38 : a,b,c) principe de la capture de cellules pour former des couples de cellules différents : a. la première famille de cellules (vertes) est piégée à l'arrière de la structure, b. puis en inversant le flux, celles-ci sont capturées à l'intérieur de la structure (rappelons que le liquide peut circuler sous la structure en forme de fer à cheval), c. enfin, il ne reste plus qu'à envoyer l'autre famille de cellules (rouges) pour former les couples. d) Vue d'ensemble des pièges avec leurs couples de cellules (barre d'échelle 200µm). e) rendement de fusion parmi les paires de cellules. d) rendement de fusion en prenant en compte toutes les cellules. [Voldman]

6. Conclusion

Les macrosystèmes pour l'électrofusion nous permettent de bénéficier d'une base de données comparative sur les conditions d'électrofusion. Ainsi, le choix d'un milieu faiblement conducteur et hypotonique semble le plus adapté. Le protocole électrique est lui plus disparate, car dépendant des cellules à fusionner. Cependant, la plupart des expérimentations commencent par appliquer un champ alternatif de hautes fréquences (DEPp) pour mettre en contact les cellules et/ou les placer. Ensuite, les chercheurs les soumettent à de courtes (<100 µs) mais intenses impulsions électriques (>1 kV/cm). Enfin, l'application à nouveau de la DEPp, pour garder en contact les cellules, semble être bénéfique pour améliorer les rendements. Toutefois, ces dispositifs montrent leur limite avec un rendement (<20%) et une qualité d'hybridomes discutable (multinucléés). D'où l'intérêt de se tourner vers les microsystèmes qui offrent la possibilité d'être à l'échelle de la cellule et donc de pouvoir mieux la manipuler. Le nombre de travaux dans cette voie reste néanmoins faible, sûrement en partie du fait de la difficulté à former en grand nombre des couples de cellules de types différents. Quelques travaux arrivent tout de même à franchir cet obstacle, en particulier ceux de Washizu et de Voldman. Ces derniers nous montrent le chemin à suivre et confirment l'intérêt de développer des microsystèmes pour ce type d'application. Leur réussite est due en grande partie à l'optimisation de la cartographie de champ électrique et/ou des flux hydrodynamiques (microfluidique). Dans le cadre des champs électriques, l'emploi de la diélectrophorèse positive se révèle particulièrement judicieux, puisqu'elle place les cellules dans les zones les plus favorables à l'électrofusion. Enfin, les travaux de Voldman corroborent l'avantage de ce type de microdispositifs pour analyser en temps réel le processus de fusion, en particulier à l'aide de cellules marquées par des molécules fluorescentes.

Tout au long de ce chapitre, nous avons discuté des forces à l'échelle microscopique et de leur utilisation dans des microdispositifs. Nous allons maintenant aborder les aspects concernant la fabrication de ces microdispositifs.

F. Microtechnologies pour la microfluidique

1. Introduction

En introduction de ce chapitre, nous avons abordé les débuts de l'histoire des microtechnologies. Celles-ci ont aujourd'hui bien évolué et on ne compte plus le nombre de procédés pour élaborer des dispositifs de plus en plus complexes. Notons que dans notre cas, les principales difficultés sont de réaliser des microcanaux avec un rapport de forme important et des électrodes épaisses. La fabrication sera développée dans le chapitre 3. Cependant, nous prendrons en compte dans cette partie leurs contraintes d'intégration dans le dispositif. Au début des années 90, les techniques les plus employées pour la microfabrication de canaux, étaient basées sur le silicium et le verre. Ces techniques sont toutefois complexes et coûteuses à mettre en place, particulièrement dans notre cas où les parois des microcanaux mesurent au moins 30 µm de haut et 50 µm de large. Autre point négatif pour le silicium, celui-ci n'est pas transparent. Toutes ces contraintes limitent donc grandement la créativité des chercheurs, tout du moins jusqu'en 1998. En effet, à cette époque un article est publié qui explique comment élaborer rapidement et pour un faible coût, des prototypes pour la microfluidique [171]. La clef de la réussite de ces travaux repose sur un élastomère particulier, le PDMS. Aujourd'hui, cette technique est massivement utilisée dans les laboratoires de recherche et la plupart des microsystèmes dont nous avons discutés précédemment sont basés sur celle-ci. Nous aborderons donc, dans une première partie ce choix technologique. Ce procédé n'est pas sans défaut, ainsi il ne convient pas à une application industrielle pour de multiples raisons. C'est pourquoi, dans une deuxième partie nous présenterons un procédé exploité par les industriels, bien plus coûteux à mettre en place, mais très intéressant dans le cadre de la production de masse. Enfin, nous finirons par une technique hybride, à la fois robuste et peu coûteuse basée sur un polymère bien connu, puisqu'il est employé dans le protocole des dispositifs à base de PDMS : la SU-8.

Dans ce chapitre nous abordons quelques techniques de microfabrication pour des applications microfluidiques, pour d'avantage de détails on se rapportera à : [3, 8, 31, 172].

2. Microtechnologie PDMS

Le PDMS (Polydimethylsiloxane) est un polymère bien connu qu' on retrouve à titre d'exemple dans les shampoings, dans les graisses siliconées [4]. Mais ce n'est pas sous cette forme chimique qu'il nous intéresse. En effet, il est alors trop visqueux pour permettre de former une structure solide. En revanche, en lui ajoutant un agent pontant (réticulant) et en le portant au dessus de sa température de polymérisation (~70°C), il se transforme rapidement en un élastomère aux propriétés fort intéressantes. Les principales caractéristiques qui ont fait son succès sont : sa biocompatibilité, sa porosité aux gaz, mais pas à l'eau, sa très bonne transparence dans le visible, sa faible énergie de surface et enfin la possibilité de l'oxyder par plasma. En utilisant ces caractéristiques, on forme des microcanaux par moulage. Le principe est le suivant (voir *Figure II-39*): on coule tout d'abord un mélange de PDMS avec son réticulant sur un moule dur. Ce moule est fabriqué en général à l'aide d'une résine épaisse comme la SU-8, ou parfois, en employant un wafer de silicium préalablement micro-usiné. Ensuite, on met le tout à réticuler pendant quelques heures, entrainant la solidification du mélange. Une fois sortie du four, il faut démouler la structure en PDMS. Deux propriétés du PDMS vont alors grandement nous faciliter la tâche : premièrement, étant un élastomère, il se déforme facilement sans casser et deuxièmement, ayant une faible énergie de surface, il se décolle aisément. À ce niveau de la fabrication, il est déjà possible d'exploiter cette structure en PDMS en l'utilisant comme un tampon (voir C.5.a). Cependant, dans le cadre d'une application microfluidique, il nous faut encore refermer cette structure pour finaliser les canaux. Cette étape est réalisée simplement en exposant simultanément notre structure préformée et l'autre structure à accoler, à un plasma d'oxygène. À la fin de cette opération, il suffit de mettre rapidement en contact les surfaces des structures pour les sceller. En suivant ce protocole, le PDMS peut adhérer à du silicium, du verre ou à lui-même.

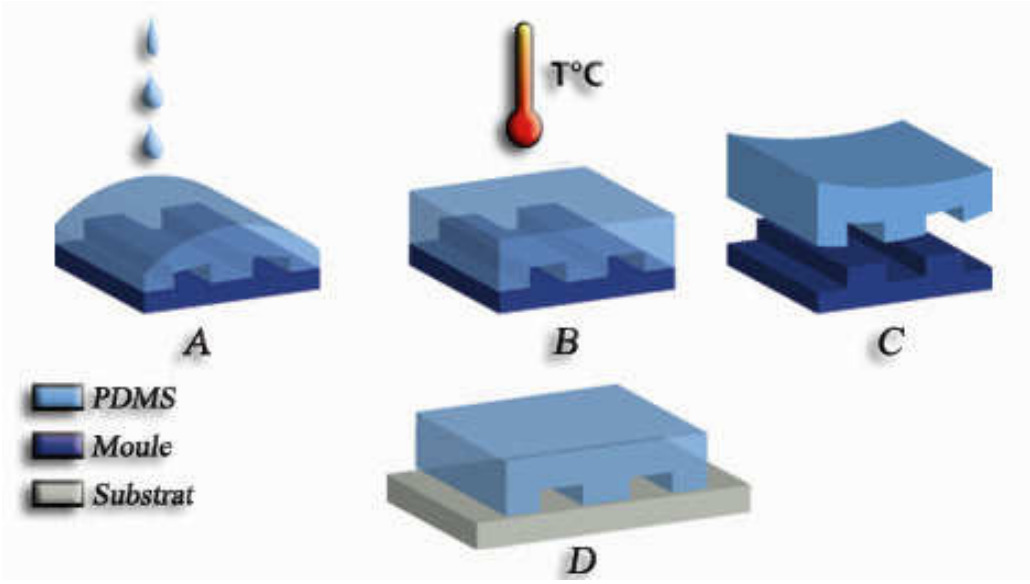

Figure II-39 : Schéma du procédé PDMS. A) Coulage du mélange PDMS+réticulant sur le moule, B) Mise au four pour accélérer le durcissement du PDMS, C) Démoulage, D) Après le plasma O_2 les deux structures : PDMS+substrat sont apposés pour ne former plus qu'un.

Ce procédé de fabrication est rapide En quelques heures nous pouvons disposer d'un microsystème prêt à l'emploi. De plus, il ne nécessite pas l'usage de machines sophistiquées

ou d'une salle blanche. Seule l'élaboration du moule l'exige, mais il pourra aisément être sous-traité. D'autant plus que celui-ci est réutilisable un grand nombre de fois, limitant ainsi son coût de réalisation. Tous ces avantages ont fait de cette technique la voie de prédilection pour concevoir des dispositifs microfluidiques dans les laboratoires de recherche [173]. Pourtant, ce matériau n'est pas sans défaut, en particulier durant l'étape d'alignement entre les deux structures à coller. Si nous restons dans le cas simple où l'une des structures joue le rôle d'un simple couvercle ou capot, cette étape reste triviale. Par contre, dans le cas où les deux structures ont un design complexe, par exemple des canaux pour l'une et des électrodes pour l'autre, l'alignement se révèle une tâche particulièrement ardue. D'autant plus qu'il doit se faire en moins d'une dizaine de secondes. Si l'on ajoute à cela des électrodes épaisses, la mission s'annonce fort compliquée. Un autre problème se pose dans le cadre d'une utilisation multiple du dispositif qui nécessite un nettoyage par des solvants et/ou des acides ou bases fortes. Le PDMS a en effet une très mauvaise résistance en dehors des solutions à pH neutre. De plus, l'usage d'un grand nombre de solvants est proscrit, car il leur est perméable [174]. Son emploi se limite donc principalement au prototypage rapide et à des dispositifs à usage unique. Enfin, son industrialisation s'avère difficile à mettre en œuvre, en particulier lors des étapes de démoulages et de collages. Notons aussi que ce matériau a tendance à se salir rapidement.

3. Micromoulage par injection ou compression

La microtechnologie appliquée à la microfluidique est une thématique de recherche encore jeune. Par conséquent, les techniques développées ont principalement pour objectif de produire des prototypes et non une production de masse. Cependant, un procédé issu de la plasturgie semble l'une des voies les plus prometteuses pour ce type de production : c'est la technique de micromoulage par injection ou compression [175]. Commençons par la méthode par injection. Celle-ci est massivement employée pour fabriquer les jouets en plastique. On reconnait d'ailleurs facilement l'usage de cette technologie en regardant si la structure en plastique possède à l'une de ces extrémités un petit ergot. Sa présence trahit en fait l'endroit où l'on a injecté le plastique à l'intérieur du moule. En effet, le principe réside dans l'injection d'un thermoplastique chauffé de façon à être dans un état liquide très visqueux (température supérieure à la température de transition vitreuse T_{eg}). Lorsque ce thermoplastique refroidit, il garde par la suite la forme du moule. Le moule étant formé de deux structures il suffit à la fin du procédé de les séparer pour récupérer le composant en plastique. Les principaux plastiques utilisés sont le polymethylmethacrylate (PMMA) et le polycarbonate (PC). Une machine de moulage par injection est capable de produire plus de 100 dispositifs par heure. Toutefois, ce type d'équipement coûte très cher à l'achat et le développement de moules ayant une résolution micrométrique augmente encore ce coût. Mais dans le cadre d'une application industrielle, les coûts initiaux peuvent être très importants, car ceux-ci seront amortis par le grand nombre de dispositifs produits.

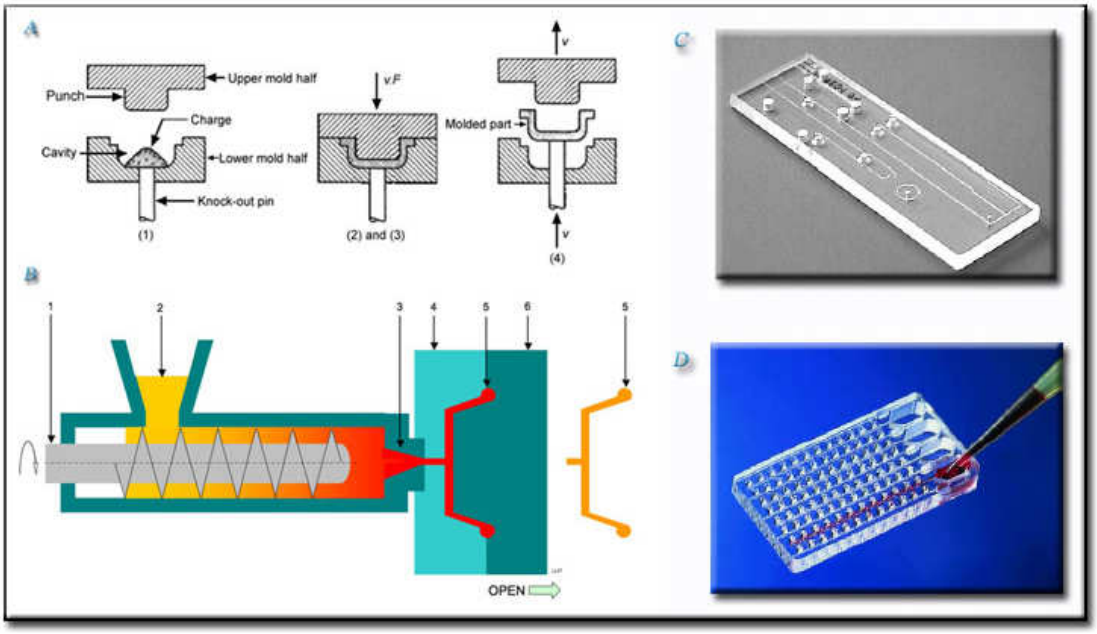

Figure II-40 : A) Procédé de moulage par compression : 1. Chargement du composant dans la demi-partie basse du moule 2&3. Compression et chauffage 4.Ouverture du moule et expulsion de la pièce [8] B) Principe du moulage par injection : 1. Vis d'injection 2. Alimentation en matériau 3. Buse d'injection 4. Partie fixe du moule 5. Pièce 6. Partie mobile du moule [4] C&D) Applications à des microdispositifs par compression [53] et par injection [55] respectivement .

La technique de compression est assez similaire à l'injection. Le moule est lui aussi divisé en deux parties. Sauf que cette fois-ci, le matériau thermoformable est placé avant dans le moule du bas. Ce matériau peut être sous la forme de poudre, de liquide visqueux ou solide. Une fois le moule du bas chargé, on vient presser le matériau à l'aide de l'autre partie du moule pour que celui-ci prenne la forme du moule. Puis en chauffant le tout, le matériau se polymérise et ainsi se durcit. Il ne reste plus qu'à rouvrir le moule pour extraire la pièce. Ce procédé est plus simple à mettre en place et moins coûteux que l'injection, par contre le cycle de fabrication d'une pièce est plus long. Notons que de nouvelles technologies comme le coulage sous vide permettront peut-être de limiter le coût d'achat en simplifiant l'appareillage et la conception des moules, mais tout en gardant un bon niveau de production [176].

Dans le cadre de notre application, ce type de procédé rencontre les mêmes problèmes d'alignement et d'intégration des électrodes que ceux décrits pour le PDMS. En revanche, il a l'avantage d'être compatible avec un large choix de matériaux et bien sûr, il est déjà industriel.

4. Microtechnologie SU-8

En recherchant les meilleurs compromis pour concevoir notre microsystème, la résine SU-8 [177] et les technologies récemment développées pour son utilisation, se sont révélées les plus adéquates. À la base, la SU-8 est une résine époxy négative surtout connue pour son haut aspect de forme (c'est-à-dire que les structures ainsi fabriquées peuvent être beaucoup plus hautes que larges) et ses structures 3D [178]. C'est pour ces raisons qu'elle est devenue la candidate idéale pour réaliser les moules dans le cadre de la technologie PDMS. Mais ses avantages ne s'arrêtent pas là, elle a aussi une excellente résistance aux produits chimiques (acide ou basique), elle est transparente, biocompatible [179-181] et sa température de

transition vitreuse est très basse (<65°C, cas non réticulé). Cependant, il y a encore quelques années, son utilisation pour la conception de canaux microfluidiques restait difficile, voire impossible à mettre en œuvre dans notre cas.

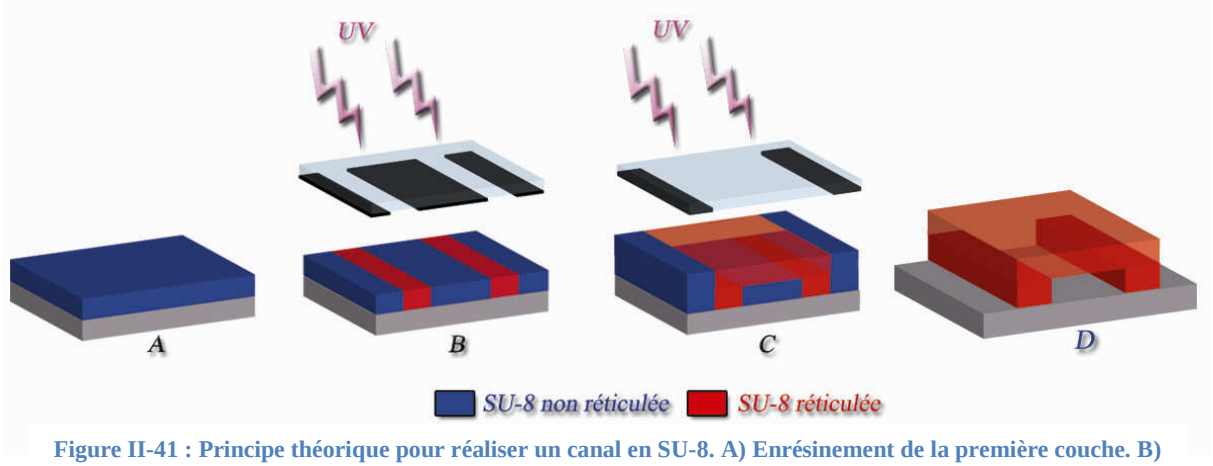

Figure II-41 : Principe théorique pour réaliser un canal en SU-8. A) Enrésinement de la première couche. B) Insolation des parois. C) Enrésinement de la deuxième couche et insolation du capot. D) Développement.

Rappelons que la résine SU-8 est négative, cela signifie que lorsqu'elle est exposée à un rayonnement Ultra Violet (UV), elle va se polymériser et donc se durcir. Ainsi, si l'on recouvre une surface de SU-8 et que l'on expose seulement certaines parties aux rayonnements UV, lors du développement, seules les parties insolées (qui ont vu les UV) vont rester. C'est le principe de la lithographie. En partant de ce procédé, il vient rapidement une idée simple : on étale tout d'abord la SU-8 sur un substrat à l'aide d'une tournette, puis on l'insole de telle façon à former les parois des canaux. Ensuite, on enrésine à nouveau une nouvelle couche de SU-8 par-dessus, pour former le capot. Après, on insole cette nouvelle couche pour qu'elle durcisse. Enfin, il ne reste plus qu'à développer pour enlever la résine non insolée et on obtient des canaux [182] (voir *Figure II-41*). Cette technique simple en apparence, se révèle particulièrement difficile à mettre en œuvre, car la résine SU-8 laisse très bien passer les UV. Ainsi, lors de l'insolation d'une couche supérieure, la couche inférieure est elle aussi touchée par le rayonnement. Cette technique est donc peu reproductible. Pour pallier ce problème de pénétration du rayonnement à travers les différentes couches, des équipes ont proposé d'intercaler un bouclier anti-UV, c'est-à-dire une couche métallique [183, 184]. Cette technique a le mérite de fonctionner, mais elle complexifie le processus de fabrication et surtout dans le cadre de nos recherches, elle rend opaque la zone d'intérêt. Dans la même lignée, différents travaux ont utilisé le principe de couches sacrificielles, avec de la résine SU-8 dépourvue de molécules photosensibles [185] ou avec d'autres résines [186]. Dans tous les cas, toutes ces techniques souffrent du même défaut qui est l'élimination de la résine contenue à l'intérieur des canaux. En effet, pour des microcanaux longs et structurés (ce qui est notre cas) le développeur aura beaucoup de mal à pénétrer et donc à dissoudre la résine, laissant les canaux ainsi bouchés et tout bonnement inutilisables.

Pour résoudre ce problème, une autre approche a été proposée. Elle consiste à sceller des microcanaux déjà structurés par un collage (*bonding* en anglais) SU-8/SU-8. Pour cela deux procédés sont envisageables : par lamination ou par pression. La lamination repose sur une machine équipée de deux cylindres s'appuyant l'un sur l'autre. Il est possible de faire

chauffer ces cylindres et de régler la force d'appui exercée entre eux. Pour recouvrir les parois des canaux, il suffit donc de passer ces structures avec un film de SU-8 entre les rouleaux. Ce film de SU-8 est un assemblage d'un film plastique en polyéthylène téréphtalate (PET) et d'une couche de SU-8 non réticulée. Les rouleaux vont donc écraser et chauffer le film de SU-8 sur les structures, permettant ainsi à celui-ci de se coller. Ensuite, en insolant le tout on obtient des microcanaux parfaitement recouverts et cela, quelque soient leur longueur et leur forme. En répétant ce procédé plusieurs fois, il est même possible de concevoir plusieurs niveaux de canaux [187] (voir *Figure II-42*). Cette technique a aussi l'avantage de s'adapter aux surfaces non planes et n'exigeant qu'une pression faible entre les rouleaux, elle limite drastiquement les écoulements intempestifs de résine. Cependant, elle ne permet pas de coller un substrat dur, comme une lame de verre, pour protéger le dispositif et faciliter son interconnexion avec des systèmes fluidiques extérieurs. En revanche, le procédé de collage par pression peut souder un substrat dur sur un autre. Son principe est fondé sur un appareillage muni d'un piston et de résistances chauffantes. Le piston va permettre d'écraser les deux structures à unir, puis sous l'effet de la pression et de la chaleur, les structures vont se souder. Toutefois, du fait de la rigidité des substrats, leur surface doit être la plus plane possible sous peine d'obtenir un collage partiel. Pour améliorer le collage, on peut augmenter la température, mais on risque alors de faciliter des écoulements de résine SU-8 dans les canaux. Pour éviter ce phénomène, une équipe a proposé d'intégrer des douves à côté des canaux pour être remplies à la place des canaux [188]. Seulement en procédant ainsi, on complexifie de façon importante le design du dispositif. Une autre équipe préconise de coller les différents substrats une fois ceux-ci insolés pour se prévenir des flux de résine SU-8. En contrepartie ce procédé est très sensible à l'état de surface [189].

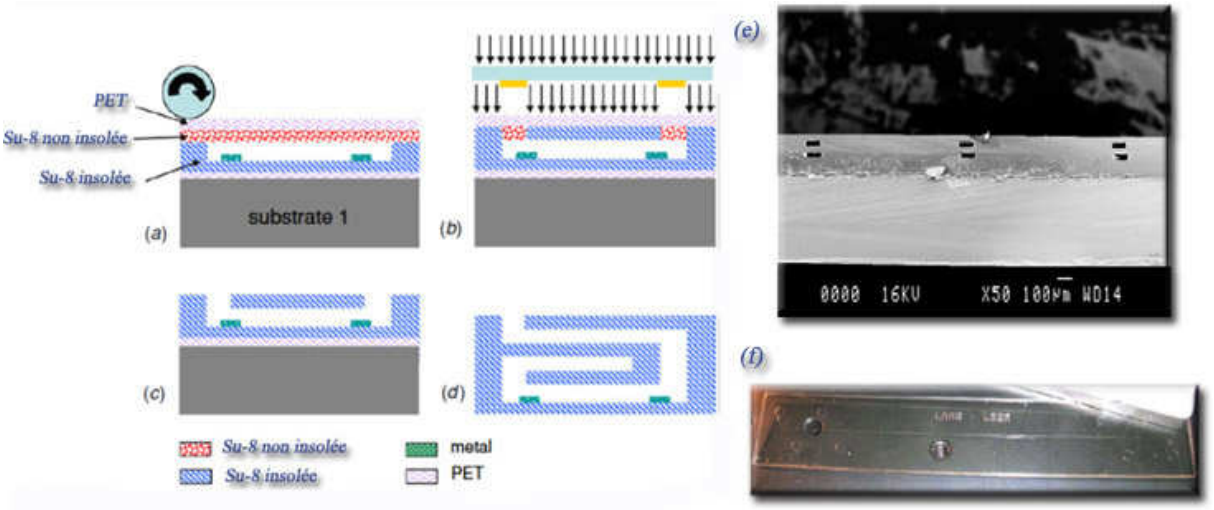

Figure II-42 : Principe de la lamination et dispositif ainsi obtenus. (a) Lamination d'un film de PET+SU-8 non réticulée sur une structure de SU-8 réticulée. (b) Insolation du film. (c) Développement. (d) En répétant a,b,c on obtient une structure 3D de microcanaux. (e) Découpe d'un dispositif pour observer les deux niveaux de canaux. (f) Dispositif complet entièrement en SU-8 [31][Abgrall].

La SU-8 fonctionnant sur le principe de la lithographie, son utilisation est donc compatible avec des chaînes de production de composants microélectroniques. Il est possible aussi de l'intégrer avec des circuits CMOS.

5. Conclusion

Les technologies existantes s'avèrent contraignantes pour la réalisation du dispositif visé pour notre application de fusion cellulaire. Notamment du fait que l'on cherche à intégrer des électrodes dans des microcanaux longs et structurés. Le procédé basé sur la résine SU-8 semble répondre à nos exigences : la SU-8 apporte une robustesse importante à notre dispositif, elle est transparente et biocompatible. Cependant, les techniques mises au point pour concevoir des canaux en SU-8 ont chacune leurs propres défauts. Nous nous proposons de les combiner pour n'en tirer que leurs avantages. Ce point sera développé par la suite dans le chapitre III.

G. Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons pu appréhender l'effet des forces prépondérantes à l'échelle microscopique. Ainsi, la force de gravité qui fait loi à notre échelle, se révèle dérisoire à l'échelle microscopique. À l'opposé, des forces insoupçonnées à notre échelle, car bien trop faibles, deviennent prépondérantes à ces échelles microscopiques. C'est ainsi que de nombreux microsystèmes se sont développés, profitant au mieux de ces lois d'échelle. La force de diélectrophorèse et la force hydrodynamique semblent les plus prometteuses dans l'élaboration de notre dispositif. En effet, la force hydrodynamique déplace facilement des cellules sur de longues distances sans risque de turbulences grâce au flux laminaire. Pour sa part, la force de diélectrophorèse permet de placer spatialement avec précision et vigueur un grand nombre de cellules en parallèle. C'est tout particulièrement la force de diélectrophorèse positive qui apparaît être la plus avantageuse dans le cadre nôtre projet, car elle mène les cellules vers les maxima de champ. Or, c'est précisément en ces lieux que l'électrofusion se fera le plus facilement. Ce phénomène d'électrofusion est d'ailleurs encore aujourd'hui difficile à appréhender. L'élaboration d'un microsystème comme le notre pourra peut-être au demeurant, aider à mieux le comprendre, en permettant une analyse plus détaillée. L'utilisation de ces forces implique de multiples contraintes comme la présence d'un réseau d'électrodes, de couches isolantes, de microcanaux… Il faut donc trouver une technologie qui s'y adapte au mieux. Le procédé utilisant la SU-8 se montre plus convaincant, même s'il faut tout de même l'adapter à nos besoins.

Les choix stratégiques sont décidés, il nous faut maintenant les utiliser de la façon la plus optimale pour arriver à nos fins. Cela implique de mettre en œuvre un design élaboré du microsystème et ensuite de réussir à le fabriquer.

III. Chapitre III, Conception et Réalisation

A. Introduction

Au début de cette thèse, en 2006, les travaux les plus intéressants sur lesquels nous pouvions nous appuyer étaient non pas les plus récents, mais ceux développés en 1989 par Washizu et *al* (voir *Chapitre II électrofusion*). Rappelons que cette équipe propose de manipuler la cartographie de champ électrique à l'aide de structures isolantes. Ce qui lui permet de placer avec précision des cellules dans les zones de maxima de champ, zones d'ailleurs propices à l'électrofusion. En partant de ce travail et en lui apportant de multiples optimisations, nous avons ainsi élaboré notre propre dispositif. Pour valider ces différentes optimisations, nous nous sommes appuyés sur un logiciel de simulation des phénomènes électrostatiques. Ainsi, nous avions une première confirmation théorique de la cartographie du champ électrique, ce qui nous permettait de déduire approximativement comment les cellules allaient se comporter. De ces études, plusieurs architectures ont été proposées, il nous restait alors à les réaliser. Pour cela, j'ai eu accès à la centrale de technologie MINERVE[12] de l'IEF (Institut d'Électronique Fondamentale) en tant que projet exogène [190]. Au sein de cette centrale, j'ai été formé à l'utilisation des différents appareils dont j'avais besoin. Une fois familiarisé avec ces différents équipements, je me suis lancé dans la fabrication des premiers prototypes. Leur réalisation fut longue et fastidieuse, débouchant en plus sur des résultats expérimentaux non concluants. Mais avec l'expérience acquise, la seconde génération de microsystèmes a commencé à livrer ses premiers résultats, notamment en observant le déplacement de cellules par diélectrophorèse et surtout, un peu plus tard, en constatant la fusion de cellules. Malgré ces premiers résultats encourageants, il restait encore beaucoup à faire au niveau de l'optimisation du procédé de fabrication des dispositifs. C'est donc jusqu'au dernier jour de ma thèse que j'ai œuvré à l'élaboration d'un bio-microsystème comprenant des microcanaux, des électrodes épaisses… le tout étant robuste et donc réutilisable.

Dans ce chapitre nous allons essayer de montrer notre démarche scientifique pour réaliser des dispositifs : en partant d'une idée originale qui est ensuite étayée par la simulation, débouche sur un design optimal et finit par la fabrication du dispositif.

[12] Microsystème Imageries Nanosciences Enseignement Recherche Valorisation Entreprise

B. Conception : une idée, des simulations, un design.

1. Introduction

Avant de commencer avec les résultats de simulation nous permettant d'obtenir des images de cartographie de champ électrique très intéressantes, rappelons quelques règles de bon sens. Tout d'abord dans le cadre de nos recherches, la simulation est un simple outil pour valider une idée d'architecture d'un dispositif. Elle nous permet ainsi de débroussailler les très nombreux dispositifs imaginés pour ne garder que ceux possédant les meilleures caractéristiques théoriques. Toutefois, rien ne sert de simuler toutes les structures imaginées, il faut déjà vérifier que celles-ci soient réalisables ou tout du moins en partie. Pour cela il faut simplement faire appel à ses connaissances en microfabrication et/ou soumettre son idée à un technologue. Durant ma courte expérience de technologue, j'ai vu bien trop de projets non réalisés suite à une divergence trop importante entre un dispositif donnant des résultats de simulation très encourageant, mais tout bonnement irréalisable ou si difficilement que les propriétés tant recherchées étaient perdues. Cette mise en garde est d'ailleurs de plus en plus d'actualité, avec la facilité que l'on a aujourd'hui à utiliser des logiciels de simulation comme COMSOL pour caractériser des structures complexes, même en trois dimensions. Ainsi, la plupart des simulations présentées dans ce chapitre n'ont pris que quelques minutes pour être calculées et moins d'une heure pour être dessinées. Seule l'analyse des données demande encore quelques heures de travail. Par contre, il aura fallu plus de deux ans pour trouver un procédé pour les fabriquer.

Toutes les simulations ont été effectuées sous le logiciel COMSOL Multiphysics [191]. L'analyse graphique des données s'est faite sous ce même logiciel ou sous MATLAB [192]. COMSOL est basé sur la modélisation et la simulation de phénomènes physiques descriptibles sous la forme d'équations aux dérivées partielles (EDP). Dans le cadre de notre application, nous nous mettons dans les conditions de l'électrostatique. C'est-à-dire que les charges sont fixées dans l'espace, ou si elles se déplacent, elles le font comme un courant continu dans un circuit, de telle sorte que le courant reste constant ($div\vec{J} = 0, rot\vec{E} = 0$). Ainsi, l'équation à résoudre se limite à l'équation dite de Poisson :

$$-div(\varepsilon grad\ U) = \rho$$

Avec ε la permittivité du matériau, U le potentiel et ρ la densité de charges. Nous avons donc une fonction dérivée du gradient du potentiel qui dépend des coordonnées spatiales x, y et z. C'est donc un système d'équations aux dérivées partielles, ce terme désignant simplement une équation différentielle où la fonction inconnue dépend de plusieurs variables. Résolvons alors ce système d'équations. On pourrait tenter une résolution "analytique" exacte, mais ceci n'est possible que pour des cas simples, typiquement un système à deux corps comme un dipôle. Le seul recours est de faire appel à des procédés numériques, qui visent à fournir une bonne approximation des valeurs de la solution. L'idée de base est de "discrétiser" les équations, pour cela on découpe l'espace en un nombre fini de morceaux (maillage) et l'on considère à titre d'approximation que chacune des fonctions à rechercher a une valeur uniforme à l'intérieur de chacun des morceaux. De cette manière, on ramène le nombre d'inconnues du problème (les valeurs des fonctions) à un nombre fini. Les dérivées sont alors approximées par des différences ; par exemple, si l'on découpe l'axe des x en morceaux d'égale longueur

Dx, la dérivée par rapport à x d'une fonction f au point x0 peut être approximée par le rapport [f(x0 + Dx) - f(x0)]/Dx. En procédant ainsi, on transforme le système d'équations différentielles initial en un système d'équations algébriques à N inconnues (où N est très grand). On passe ensuite à la résolution de ce nouveau système plus simple. Cela demande bien sûr, énormément de calculs numériques. D'ailleurs, plus l'espace est découpé finement, plus on se rapproche du cas réel (continu), mais plus les calculs sont volumineux. Il faut donc trouver un bon compromis entre la finesse du maillage (qualité de la simulation) et le temps de calcul.

Enfin, avant de se lancer dans les calculs, le simulateur a besoin de connaitre les paramètres électriques (conductivité et permittivité) des différents matériaux employés (voir *Tableau III-1*). Leur valeur est prise au plus proche de nos expériences, tout particulièrement celle concernant le milieu. Dans le cadre de cette campagne de simulations, nous avons pris les propriétés électriques de la cellule Jurkat, car celles-ci sont bien caractérisées[20]. Dernier point, pour l'ensemble des simulations le potentiel électrique est fixé à 5V.

	Conductivité (S/m)	Permittivité Relative
Cuivre	$59{,}6\times10^{6}$	-
Or	$45{,}2\times10^{6}$	-
SU-8	-	3
Milieu (~eau)	10×10^{-3}	80
Membrane Cellulaire	3×10^{-6}	6
Cytoplasme Cellulaire	0,4	45

Tableau III-1 : Paramètres électriques pour les simulations.

C'est donc en essayant de prendre au mieux toutes ces considérations que nous allons maintenant analyser différentes structures en partant de celle décrite par Washizu, pour finir, après de multiples optimisations, à notre dispositif.

2. Structure Washizu : cas d'école et premières optimisations

a) La structure Washizu

Si l'on résume la structure proposée par Washizu et al, elle se compose tout d'abord de deux électrodes planes séparées d'un peu plus de 200 µm. En rapprochant les électrodes si proches l'une de l'autre ils obtiennent un champ électrique intense tout en n'utilisant qu'une faible tension. Le second constituant d'importance sont les parois d'isolant qui coupe le canal central en deux sous canaux, autorisant à transporter deux types cellulaires différents. Pour permettre aux cellules de se rejoindre, ils conçoivent une ouverture de la taille d'une cellule. Cette ouverture va aussi servir à concentrer le champ, induisant localement un maximum de champ. Ce maximum de champ est judicieusement exploité pour forcer les cellules à se placer dans cette ouverture sous la force de diélectrophorèse positive. Il est aussi l'endroit privilégié pour faciliter l'électrofusion (voir *Figure III-1*).

Dans le cadre de la simulation nous avons repris cette structure en lui donnant les dimensions suivantes : l'espace inter-électrode est fixé à 200 µm, les électrodes ont une

épaisseur de 1µm et les parois isolantes sont larges de 40µm et épaisses de 30 µm. Enfin, l'ouverture entre les parois isolantes est de 20 µm (~la taille d'une cellule). Pour analyser au mieux les résultats de simulation 3D nous étudions deux coupes de la norme du champ électrique. La première coupe est horizontale (dans le plan des électrodes) et se situe à 10 µm de hauteur en partant du sol. Nous faisons cette coupe à cette hauteur, car dans le cadre de nos expériences, les cellules mesurent environ 10 µm de rayon (solution hypotonique contenant du sorbitol). Cette coupe nous donnera donc la cartographie du champ et nous permettra de voir où se situent les maxima et les minima de champ dans le plan horizontal. La seconde coupe est verticale et passe au milieu de l'ouverture entre les deux parois d'isolant. Celle-ci nous donnera les informations sur les variations de champ électrique dans le sens de la hauteur.

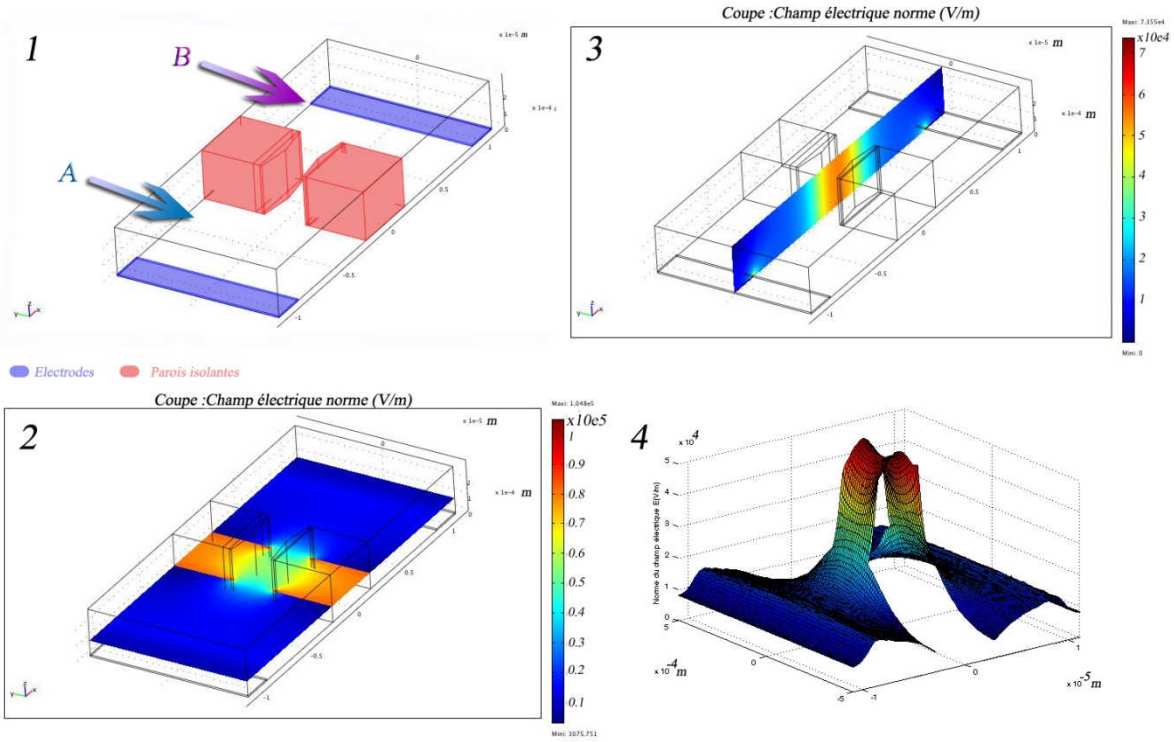

Figure III-1 : 1) Schéma 3D de la structure de Washizu avec la possibilité d'injecter des cellules dans le canal A et B. 2) Simulation donnant la norme du champ électrique sur une coupe horizontale à 10µm du sol 3) Simulation donnant la norme du champ électrique sur une coupe verticale en y=0 4) Reprise des résultats de simulation sous MATLAB pour mettre en évidence la norme du champ sans les structures isolantes.

Les résultats de simulation issus de COMSOL sont présentés dans les *Figure III-1-2* et *Figure III-1-3*. La *Figure III-1-2* nous confirme la concentration du champ au niveau de l'ouverture, par contre, les parois étant formées d'isolant, elles se polarisent et sont le siège d'un champ très intense. Cependant, ce champ n'est pas visible à l'extérieur de la structure isolante. Ainsi, une cellule proche de cette paroi ne ressentira pas le champ électrique interne à cette paroi. Par conséquent, pour faciliter la lecture nous exportons ces données sous MATLAB où nous supprimons les parois isolantes pour ne nous concentrer que sur la cartographie de champ que la cellule pourra *ressentir*. Ainsi, la *Figure III-1-2* devient la *Figure III-1-4* après traitement. On distingue ainsi plus facilement avec cette représentation 3D, la forte intensité de champ dans l'ouverture. On remarque aussi un léger renflement du champ au niveau des électrodes. Ce phénomène est d'ailleurs bien plus facile à observer dans

la *Figure III-1-3*, où l'on distingue une tâche bleu ciel au bout des électrodes. Cette augmentation du champ est induite par un effet de pointe, c'est-à-dire que les lignes de champ sortent en grand nombre d'un point de l'espace, entrainant cette élévation du champ localement. Nous nous retrouvons donc avec trois maxima de champ : deux petits à l'extrémité des électrodes et un troisième largement prépondérant dans la fente encastrée entre les parois isolantes (plus précisément il s'agit d'un col). Remarquons que si nous n'avions aucune structure isolante, pour une différence de potentiel de 5V, le champ électrique aurait une valeur de 250V/cm. Or, nous constatons qu'à l'aide de ces structures isolantes qui concentrent le champ, nous obtenons un champ atteignant les 500V/cm.

Un autre point important est de connaitre le gradient du champ électrique, car c'est lui qui nous donnera une information directe sur la force de diélectrophorèse (voir *Équation III-8*). Pour cela, nous réutilisons les données du champ électrique issues de la *Figure III-1-4* que nous élevons au carré pour ensuite calculer son gradient selon l'axe des *x* et *y*. Nous obtenons ainsi une cartographie du vecteur de la force de diélectrophorèse à un facteur multiplicatif près (voir *Figure III-2*). On constate comme précédemment que la forte concentration du champ dans l'ouverture entraine une forte variation de celui-ci, d'où une force de DEP importante (grandes flèches) et dirigée vers le centre de l'ouverture. Par conséquent, si une cellule passe à proximité de l'ouverture elle sera happée à l'intérieur de celle-ci (cas de la DEPp). Si l'on regarde attentivement la *Figure III-2*, on retrouve aussi une ligne de petits vecteurs de force induite par les minima de champ situés au bout des électrodes (grosses flèches noires). Malgré leur faible valeur, ils pourront probablement piéger eux aussi des cellules, ou tout du moins les dévier en les attirant à l'extrémité des électrodes. Remarquons enfin que dans le cadre de la DEPn, la cellule sera poussée vers les minima de champ, c'est-à-dire si l'on se réfère à la *Figure III-1-4* vers les parois des canaux situées à l'opposé de

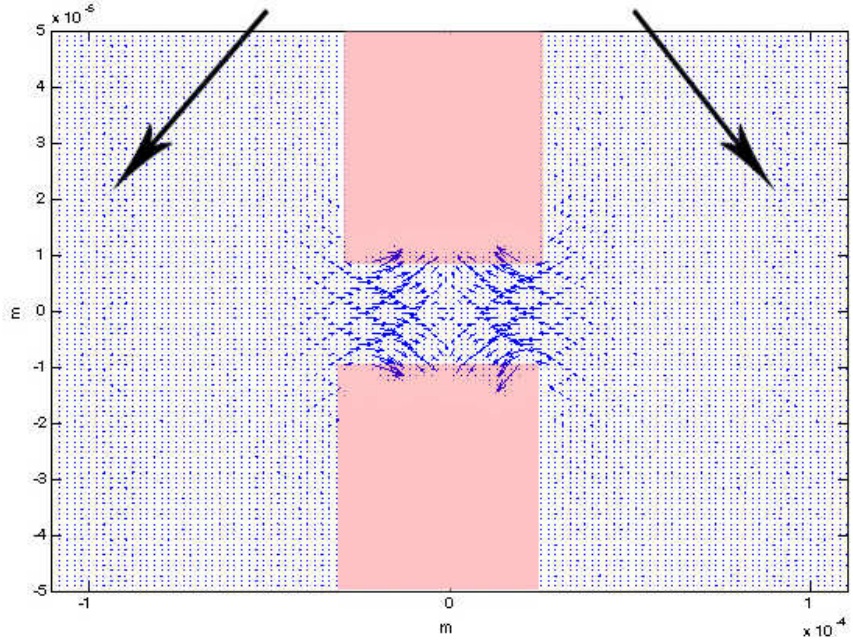

Figure III-2 : Tracé dans le plan des électrodes (à 10µm du sol) des vecteurs correspondants au terme $\nabla(E)^2$, terme dont dépend la force de diélectrophorèse (cas de la DEPp). En rose ont été ajoutées les parois centrales pour faciliter la lecture. Les deux flèches mettent en évidence la faible force de DEP induite par les petits maxima au bout des électrodes.

l'ouverture.

b) Modification des structures isolantes

Ces premières simulations confirment l'intérêt théorique d'employer des structures isolantes pour optimiser la cartographie de champ. Pour approfondir cette étude, nous avons modifié la forme des structures isolantes pour analyser les changements de la répartition du champ électrique. Les premières modifications ont concerné la largeur de l'isolant en la réduisant à 20 µm puis à 10 µm (*Figure III-3*). Les secondes transformations ont touché la forme des structures isolantes au niveau de l'ouverture. Celles-ci étaient à la base légèrement arrondies, nous les avons alors rendues sphériques ou pointues.

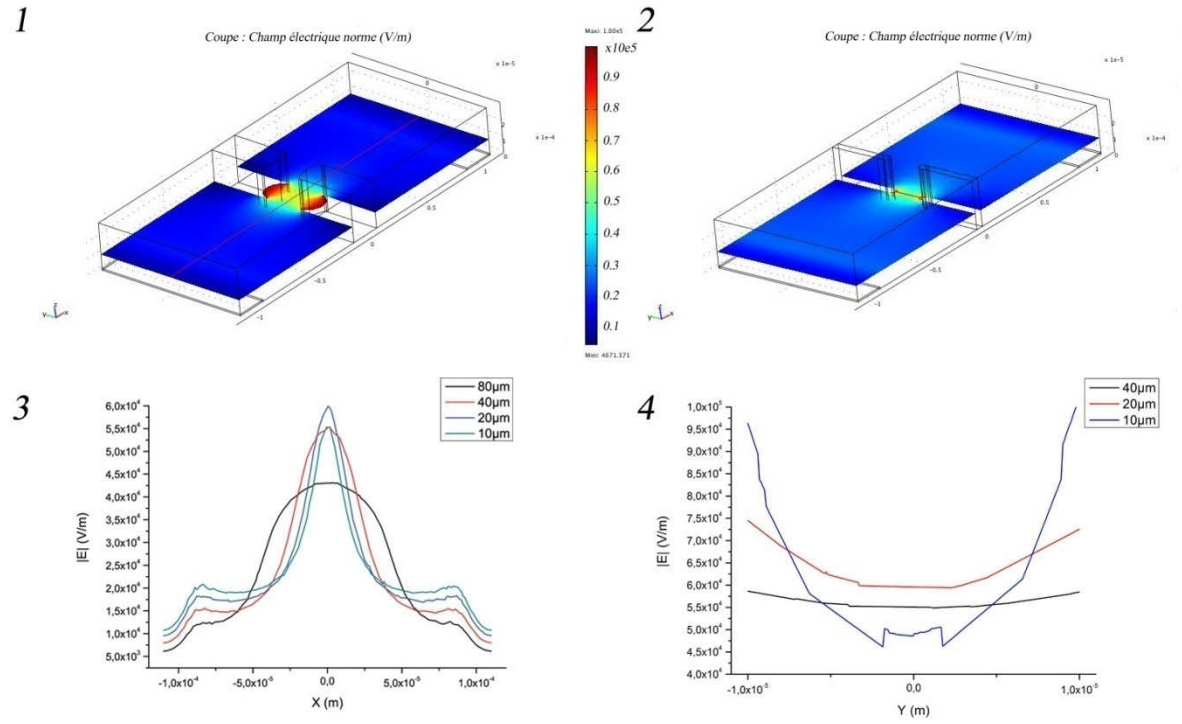

Figure III-3 : Variation de la largeur de la paroi d'isolant. 1) cartographie de la norme du champ électrique (V/m) dans le plan horizontal pour une largeur des parois de 20µm. 2) même chose, mais pour 10µm. 3) Variation du champ électrique suivant l'axe des x pour y=0 et z= 10 µm (ex : ligne rouge sur l'image 1). 4) Variation du champ électrique dans l'ouverture suivant l'axe y pour x=0 et z=10 µm (ex : ligne rouge sur l'image 2).

La *Figure III-3* fournit les différents résultats de simulation suite à la variation de la largeur des parois isolantes. Pour faciliter la lecture des cartographies de champ dans les images des *Figure III-3-1* et *Figure III-3-2* nous avons limité l'échelle du champ électrique à 1kV/cm. Ainsi, nous pouvons discerner plus aisément les structures isolantes et les variations de champ dans l'ouverture. Toutefois, ces cartographies de champ étant difficilement comparables, nous avons regroupé les valeurs de la norme du champ électrique des différentes structures selon deux lignes : l'une variant selon l'axe des *x* (perpendiculaire à l'axe des électrodes) et passant par le centre de l'ouverture (*Figure III-3-3*) et une autre se limitant à la taille de l'ouverture et variant selon l'axe des *y* (*Figure III-3-4*). La *Figure III-3-3*, nous donne une information sur la capacité de l'ouverture à piéger une cellule passant à proximité. En effet, les variations où le gradient du champ électrique sont directement reliés à la force de DEPp, donc plus la courbe est pentue plus la force sera importante. Un autre paramètre à

prendre en compte est la largeur de la courbe, plus celle-ci est grande plus la portée de la force de diélectrophorèse est importante. Au vu de ces remarques, nous constatons que plus les structures isolantes sont larges plus la portée de capture par DEP est grande. Cependant, nous constatons que dans le cas extrême d'une structure à 80 µm (mise à titre indicatif) la variation du champ est faible, d'où une limitation de la force de DEP. C'est pourquoi les structures de 40 µm et 20 µm semblent les meilleurs compromis entre surfaces de capture et intensités du champ. Remarquons que l'ouverture large de 40 µm a l'avantage de pouvoir contenir entièrement deux cellules (dans le cas où une cellule mesure 20 µm de diamètre) ce qui permet de les protéger du flux présent dans les canaux. La *Figure III-3-4* donne aussi un avantage aux structures larges de 40 µm, car dans ce cas la variation de champ est minime, limitant ainsi l'attraction des cellules par DEP vers les bordures isolantes. Les cellules restent de ce fait bien au centre et accolées entre elles. Alors que dans le cas de structures à 10 µm, on observe deux maxima de champ bien distincts, d'où deux placements possibles pour les cellules entrainant un possible décalage entre elles.

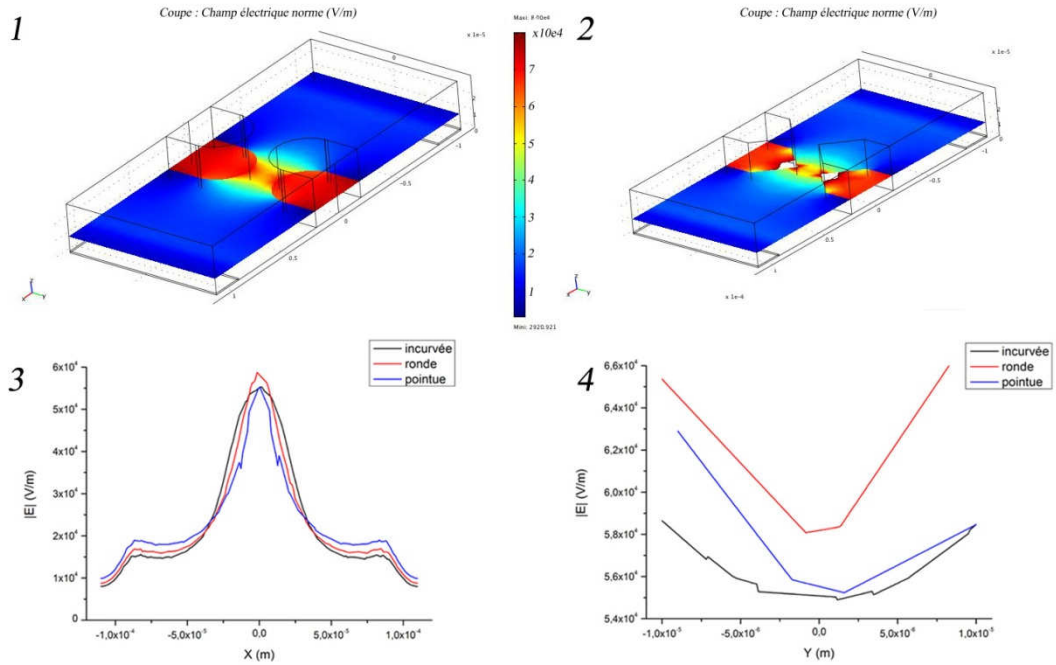

Figure III-4: Variation de la forme de la paroi isolante au niveau de l'ouverture. 1) cartographie de la norme du champ électrique (V/m) dans le plan horizontal pour une forme ronde. 2) même chose, mais pour une forme pointue. 3) Variation du champ électrique suivant l'axe des x pour y=0 et z= 10 µm (coupe dans la longueur de l'image en passant par son centre). 4) Variation du champ électrique dans l'ouverture suivant l'axe y pour x=0 et z=10 µm (ligne entre les deux extrémités des pointes).

La deuxième étude de modification de l'isolant a porté sur la forme des parois au niveau de l'ouverture. Deux variations ont été étudiées : une forme parfaitement arrondie et une forme pointue (voir *Figure III-4*), avec une largeur des parois isolantes égale à celle de la structure initiale (40 µm). Au regard des résultats des valeurs de la norme du champ électrique en *Figure III-4-3* et *Figure III-4-4*, la forme ronde et la forme initiale (incurvée) paraissent les plus intéressantes. La forme pointue n'apporte qu'un champ à faible portée et deux maxima de champ très fort dans l'ouverture (peu visibles sur la *Figure III-4-4* car les points extrêmes ont été supprimés pour faciliter la lecture, par contre bien perceptibles sur la *Figure III-4-2*

avec les taches rouge-noir au bout des pointes). La forme initiale semble légèrement plus propice, avec certes un champ un peu moins intense que la forme ronde, mais ses deux maxima dans l'ouverture sont très faibles.

c) Simulation avec une cellule

Ajouter une cellule dans la structure simulée semble intéressant pour étudier le champ induit dans la membrane. L'idée consiste à ajouter une sphère imbriquée dans une autre, pour simuler ainsi une membrane cellulaire et son cytoplasme. Mais dans ce cas, on se confronte à d'importants problèmes. En particulier à cause de l'épaisseur de la membrane qui mesure à peine 5nm. Lorsque l'on rentre de tels paramètres dans le logiciel de simulation, celui-ci est incapable de le calculer, suite au trop grand nombre d'éléments et à la différence d'échelle entre la structure (~100µm) et la membrane (~nm). C'est donc en approximant très grossièrement la membrane à une épaisseur de 1µm que nous avons pu faire nos simulations.

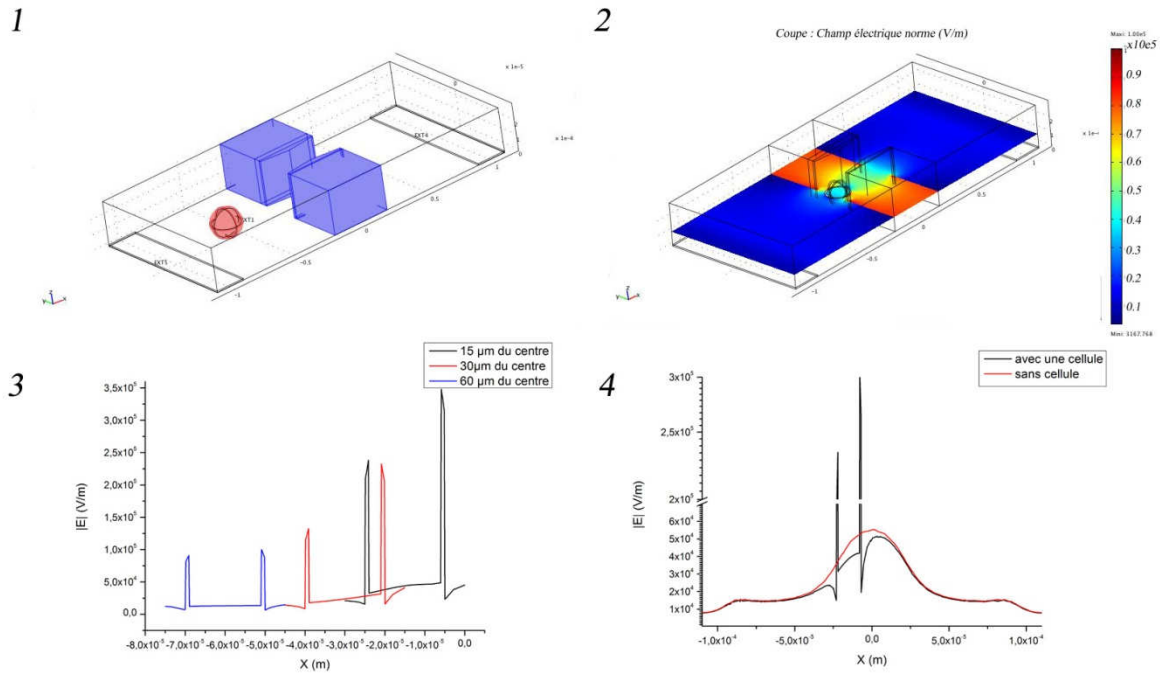

Figure III-5 : Étude du champ électrique en présence d'une cellule : 1) Structures simulées avec en bleu les parois isolantes et en rose une double sphère modélisant une cellule (ici centrée en x=60µm). 2) Coupe selon le plan xy pour z=10µm donnant la cartographie de la norme du champ électrique en présence d'une cellule (ici centrée en x=15µm). 3) Évolution de la norme du champ électrique dans la cellule lorsque l'on déplace celle-ci selon l'axe des x. 4) Comparaison de la norme du champ électrique en présence ou non d'une cellule selon l'axe des x passant en y=0 et z=10µm (cellule centrée en x=15µm).

À la vue des valeurs du champ issues de la *Figure III-5*, nous constatons que le champ électrique est très intense dans la membrane. La membrane étant assimilée à un isolant ayant de faibles pertes, elle se comporte quasiment comme les parois isolantes et se polarise donc sous l'effet du champ. De plus, celle-ci étant bien moins épaisse que les parois, le champ interne est beaucoup plus important. Remarquons que les valeurs de champ calculées par cette simulation n'ont aucune valeur réelle étant donné la taille de la membrane considérée, par contre les variations de champ à l'intérieur de la membrane sont elles, exploitables. Nous avons observé dans les simulations précédentes que le champ augmente au fur et à mesure que

l'on se rapprochait de l'ouverture. C'est donc sans surprise que l'on constate le même phénomène dans la membrane de la cellule : la zone se rapprochant le plus de l'ouverture présente un champ beaucoup plus intense que la zone de la membrane qui lui est opposée. Notons que c'est d'ailleurs cette différence de champ qui est exploitée dans le phénomène de DEP. La *Figure III-5*-3 nous montre comment évolue cette différence de champ dans la membrane selon où l'on place la cellule. Ainsi, une cellule placée trop loin de l'ouverture ne ressentira pas les effets de la DEP, car la différence de champ entre les pôles de la cellule est faible (courbe bleue). On perçoit déjà une limite du système dans sa capacité à capter toutes les cellules s'écoulant dans le canal. Si celles-ci sont un tant soit peu éloignées de la paroi centrale, on ne pourra pas les piéger. Pour limiter ce phénomène, il faudrait envisager de réduire la taille des canaux et rapprocher les électrodes, de cette façon on confinerait l'espace des cellules tout en augmentant le champ électrique. D'un autre côté, nous n'avons peut-être pas intérêt à ce que trop de cellules soient captées par une même ouverture sous peine de voir s'agglutiner un grand nombre de cellules à cet endroit. En effet, cet amas de cellules pourrait perturber la cartographie de champ et parasiter la fusion en entrainant la fusion de plusieurs cellules non souhaitées. Cependant, l'endroit où la fusion est le plus probable reste la zone de l'ouverture, zone où le champ est le plus intense. Nous finirons enfin sur l'étude de la *Figure III-5-4*, celle-ci représente les variations du champ électrique avec ou sans cellule selon l'axe des x en passant au milieu de l'ouverture. Nous constatons que la cellule ne perturbe que très localement le champ électrique et a plutôt tendance à minimiser le champ électrique à sa périphérie. Ceci pourrait donc se traduire par une moins grande portée de la DEP localement et ainsi minimiser la force de captage d'une autre cellule contenue dans le canal. Pourtant en raisonnant ainsi nous ne prenons pas en compte l'attraction entre dipôles induits. En effet, sous l'action d'un champ électrique (même uniforme), les cellules vont se polariser et se comporter comme de grands dipôles. Ceci a pour conséquence d'attirer les pôles positifs des unes vers les pôles négatifs des autres, les cellules vont alors se rapprocher l'une de l'autre et s'arranger en formant des *colliers de perles* [1]. C'est-à-dire que dans le cas où une cellule est piégée dans l'ouverture, celle-ci aura tendance à faciliter la saisie d'une cellule circulant dans le canal. Nous observons ainsi les premières limites de nos simulations.

d) Parallélisation de la structure

Pour l'instant, nos études se sont concentrées sur la forme des structures isolantes pour rechercher une forme optimisant à la fois la capture et la fusion de cellules. Toutefois, nous n'avons pas résolu le problème majeur de ce système qui est sa faible capacité à fusionner un grand nombre de cellules. En effet, il n'est constitué que d'une seule ouverture et ne peut donc fusionner qu'une paire de cellules à la fois. Pour résoudre ce problème une idée simple consiste à paralléliser cette structure, c'est-à-dire répéter simplement un grand nombre de fois la structure de base. Pour des canaux longs d'environ 3 cm, on peut ainsi espérer avoir au moins 300 ouvertures. Seule difficulté, il faut maitriser la technologie pour concevoir des canaux longs, structurés et correctement alignés sur un réseau d'électrodes. Cependant, si l'on s'intéresse au protocole expérimental d'un tel dispositif, on s'aperçoit qu'il faut tout d'abord injecter les deux types cellulaires dans leurs canaux respectifs, puis capturer les cellules au niveau des ouvertures pour ensuite les fusionner. Pour récupérer les hybridomes, nous

n'avons alors pas d'autre choix que de les remettre dans les canaux d'injections. Nous nous retrouvons en sortie du dispositif avec un milieu contenant les cellules injectées non captées et nos hybridomes. De plus, pendant cette étape de récupération nous sommes obligés d'arrêter l'injection des cellules et de changer la solution par un milieu qui en est dépourvu pour éviter ainsi de contaminer encore un peu plus le milieu contenant les hybridomes. Au vu de ces contraintes, nous avons donc élaboré une nouvelle structure.

3. Une architecture à trois canaux

Le principal défaut du dispositif précédent est la difficulté à récupérer spécifiquement et rapidement les hybridomes. Pour remédier à ces problèmes, nous proposons de concevoir un microsystème pourvu de trois canaux : deux canaux latéraux sont alors dédiés respectivement à l'injection des cellules cancéreuses (A) et dendritiques (B), et un troisième canal central est voué à recevoir les hybridomes (AB) (*Figure III-6*). Il nous reste cependant à trouver d'une part, une technique pour réussir à extraire les cellules cancéreuses et dendritiques de leurs canaux respectifs pour les amener dans le canal central et d'autre part, nous devons ensuite être capables de les fusionner. Si nous appliquons la même configuration d'électrodes que précédemment (c'est à dire deux électrodes parallèles placées aux extrémités des canaux) nous n'obtenons dans ce cas, des maxima de champ électrique seulement au niveau des ouvertures, entre les différents canaux. Les cellules cancéreuses et dendritiques sont dans ces conditions piégées chacune de leur côté et ne peuvent être fusionnées pour former des hybridomes. Pour pallier cela, nous insérons une troisième électrode située dans le canal central et nous la recouvrons entièrement d'isolant, sauf à un endroit spécifique où nous laissons l'électrode à nue. Cette zone non recouverte d'isolant nous permet une fois encore de

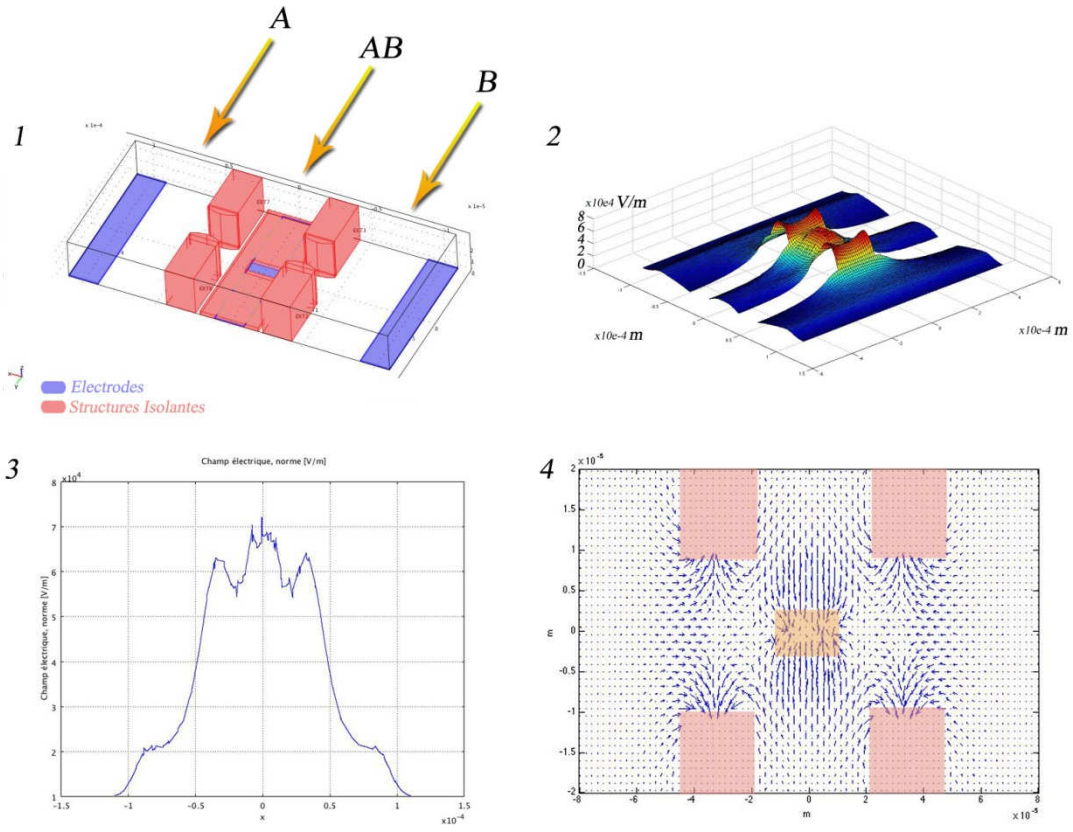

Figure III-6 : 1) Structure composée de trois canaux, on aperçoit au centre l'électrode enterrée et son ouverture (petit rectangle bleu). 2) Norme du champ électrique dans les canaux et les ouvertures pour z=10µm. 3) Valeur de la norme du champ électrique selon une ligne variant en x, passant au milieu des ouvertures (y=0) et pour z=10µm. 4) Zoom sur la zone centrale où sont calculés les vecteurs issus du gradient de $|E^2|$ dont dépend la force de DEPp (en rose les parois isolantes et en jaune clair ouverture faite dans l'isolant recouvrant l'électrode centrale).

concentrer le champ électrique et d'induire un maximum de champ très intense (*Figure III-6*) [193].

Les résultats de simulation présentés en *Figure III-6* ont été obtenus pour une structure formée :

- de trois électrodes en or épaisses d'1 µm, larges de 20 µm et séparées l'une de l'autre d'un peu moins de 100 µm.
- de parois isolantes en SU-8 larges de 20 µm et épaisses de 30 µm.
- et d'une couche isolante en SU-8 recouvrant l'électrode centrale d'une épaisseur de 3 µm.

Enfin, le potentiel électrique est fixé à 5V sur les électrodes latérales et à la terre pour l'électrode centrale. La *Figure III-6-2*, nous présente une cartographie du champ électrique à 10 µm du sol des zones susceptibles d'interagir avec une cellule. On retrouve la même configuration de champ dans les ouvertures que dans celle développée par Washizu et al, nous permettant ainsi de capter via DEPp les cellules circulant dans les canaux latéraux. Pour attirer ensuite les cellules dans le canal central, nous avons mis à nu l'électrode centrale sur une petite zone bien définie ce qui nous permet d'avoir un maximum de champ très intense favorisant à la fois l'attraction des cellules et l'électrofusion. La *Figure III-6-3* met en évidence ces trois maxima : les deux engendrés par les ouvertures dans les parois isolantes et le troisième prépondérant au centre dû à l'ouverture dans la couche isolante. Toutefois, la chute du champ électrique entre les petits maxima et le grand maximum central engendre une force de DEPp dirigée vers les ouvertures des parois et non comme souhaité vers le canal central (*Figure III-6-4*). Cela signifie que nous risquons d'avoir des cellules qui restent coincées au niveau des petits maxima. Pour contrecarrer cet effet, nous pouvons jouer par exemple sur la pression des différents canaux pour ainsi aider les cellules à franchir cette petite barrière de potentiels.

Dans le cadre d'un dispositif bénéficiant de cette nouvelle structure fortement parallélisée, le protocole pour fusionner deux types cellulaires différents est le suivant : tout d'abord, nous injectons les cellules A et B dans leur canal respectif, puis nous appliquons la DEPp pour capter ces cellules et les piéger dans le canal central. Une fois les cellules accolées dans tous les pièges, nous appliquons des pics de tension pour les électrofusionner. Enfin, pour récupérer les hybridomes, il suffit de relâcher la DEPp pour qu'ils soient emmenés vers la sortie du microsystème. Pour relancer un nouveau cycle, nous réactiverons simplement la DEPp. Avant de passer à la fabrication de ces différentes structures, intéressons-nous à l'optimisation des électrodes et regardons si nous ne pouvons pas interagir sur le flux hydrodynamique.

4. Électrodes épaisses

Dans le chapitre précédent sur les microtechnologies, nous avons discuté de microsystèmes basés sur l'emploi d'électrodes épaisses. Parmi ces travaux nous avions surtout relevé ceux développés par Tresset et al qui proposent d'utiliser des électrodes épaisses en silicium pour former un champ électrique intense et uniforme. L'idée nous

semblant intéressante, nous avons testé l'intérêt de ce type d'électrodes par simulation dans les structures dites de Washizu et à trois canaux. Ayant acquis durant mes études en Master 2 Recherche une expérience en dépôt électrolytique de cuivre, notre objectif était donc de réaliser ces électrodes dans ce métal. Pour simuler ces structures, nous avons simplement repris les anciens designs en incorporant des électrodes en cuivre épaisses de 20 µm (*Figure III-7*). Les simulations nous montrent bien une augmentation de plus de 7% du champ électrique maximum à 10 µm du sol entre des électrodes fines et épaisses (voir *Figure III-7*). De plus, le champ étant plus intense, la force de DEPp est, elle aussi plus grande, tout particulièrement dans les zones de fort champ (ouverture dans les structures isolantes). Dans une moindre mesure, nous pouvons noter que le champ électrique est légèrement plus important à longue distance des ouvertures, d'où une portée de la DEP un peu plus grande. Notons aussi que dans le cas de la structure à trois canaux, le champ au niveau de l'ouverture de la couche isolante s'atténue moins rapidement en hauteur (en z) en présence d'électrodes épaisses (résultats non présentés). Enfin, dans le cas où les électrodes ont la même épaisseur que le canal, nous n'aurons plus de pics de champ en bordure de celles-ci, évitant ainsi de capturer les cellules dans ces zones.

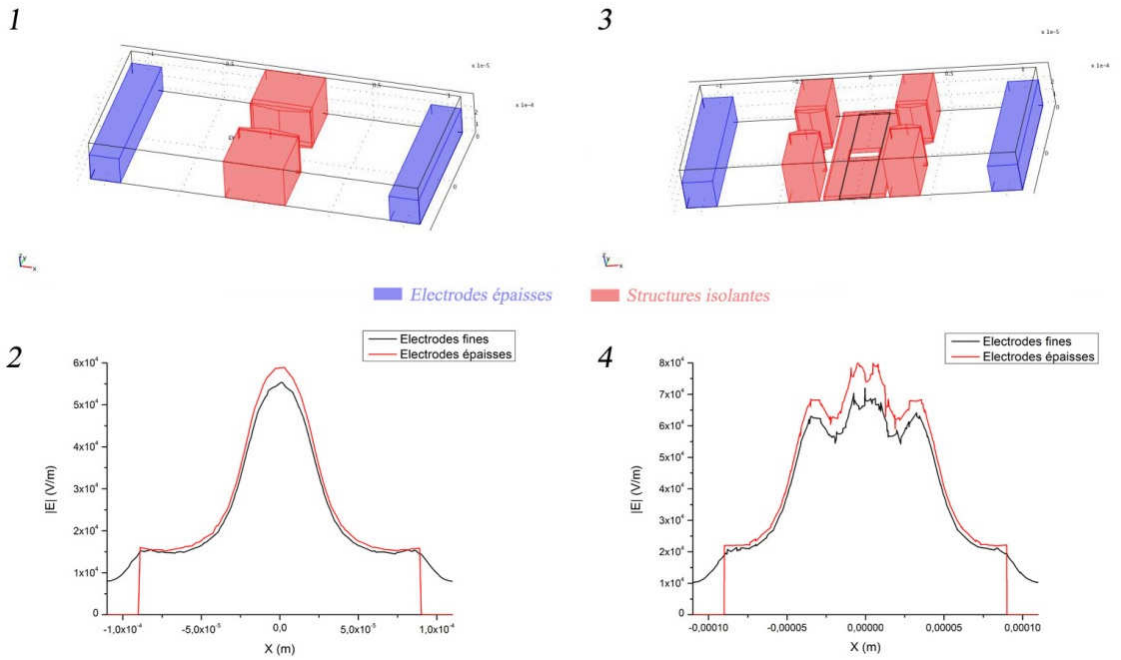

Figure III-7 : Simulation des structures Washizu (1) et trois canaux (3) en incorporant des électrodes épaisses de 20µm en cuivre. En (2) et (4) variation de la norme du champ électrique selon une ligne variant selon l'axe des x, passant par le milieu des ouvertures (y=0) et pour z=10µm. En (2) résultats issus de la structure (1) et en (4) résultat résultant de la structure (3).

5. Interaction sur le flux hydrodynamique

Pour l'instant nous avons concentré nos études sur l'optimisation de la cartographie de champ électrique sans essayer d'intervenir sur l'écoulement du flux qui se cantonne jusqu'à présent à transporter les cellules dans les canaux. Pourtant si l'on essaye de modifier son écoulement nous pourrons sûrement piéger plus facilement les cellules. C'est en suivant cet objectif que nous avons inséré directement dans le canal une structure de forme triangulaire

pour dévier légèrement le flux dans l'ouverture et ainsi pousser les cellules dans les zones de fort champ. Dans le cadre de nos simulations, nous avons ajouté cette nouvelle forme dans la structure dite Washizu et celle dite à trois canaux (voir *Figure III-8*). Ces simulations consistent à résoudre les équations de Navier et Stockes avec comme caractéristiques pour le milieu celles de l'eau (densité de 1000 kg/m3 et viscosité dynamique 1.10-3 Pa.s) et une vitesse d'entrée du milieu de 100 µm/s.

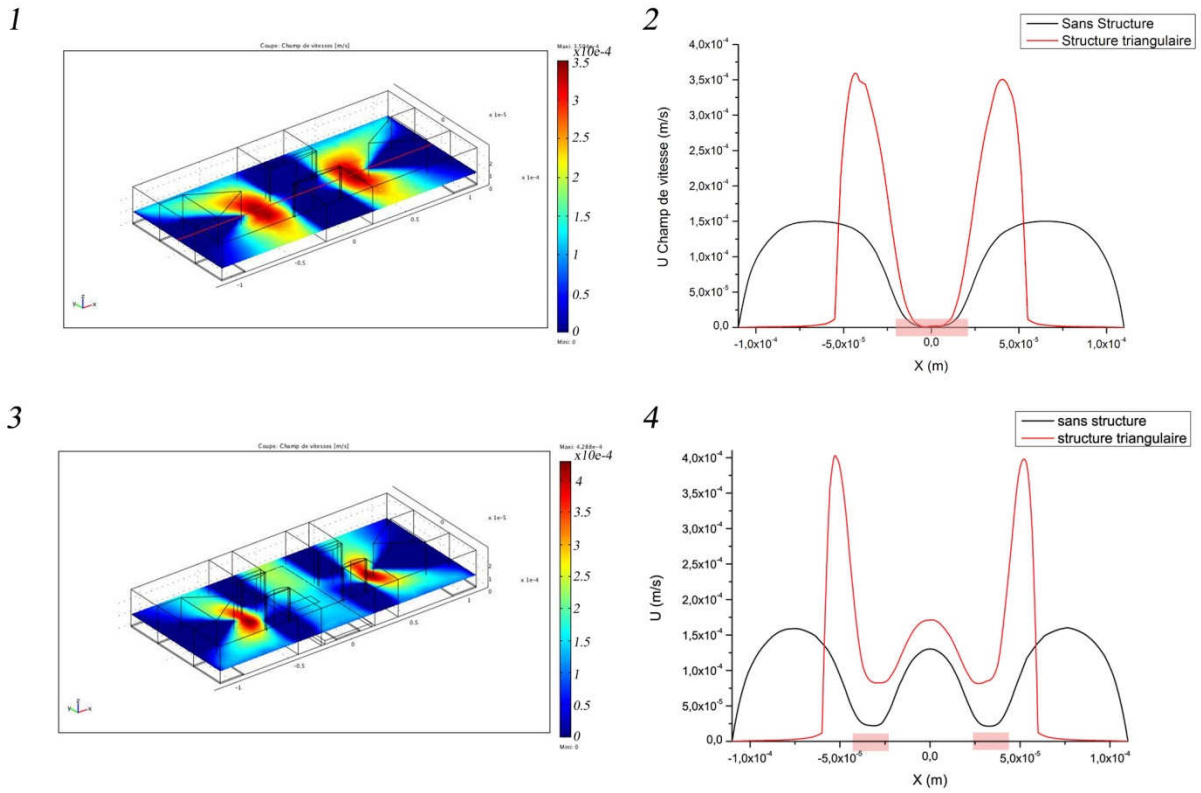

Figure III-8 : Simulation de l'écoulement dans les structures Washizu (1,2) et trois canaux (3,4) en présence de structures triangulaires. 1) Coupe à z=10µm donnant le champ de vitesse du flux dans les canaux. 2) Variation du champ de vitesse le long d'une ligne variant selon l'axe des x, pour z=10µm et passant au milieu de l'ouverture y=0 (en rose nous avons schématisé les parois des ouvertures). 3) même coupe qu'en (1) mais pour structure trois canaux. 4) même chose qu'en (2) mais pour structure trois canaux.

Les résultats des simulations issus de la *Figure III-8* mettent bien en évidence le phénomène de déviation et de resserrement du flux en présence des structures triangulaires. On obtient ainsi une augmentation de la vitesse au niveau des ouvertures, ce qui signifie que le courant rentre plus profondément dans la structure et de ce fait, il emmènera aussi les cellules au plus près des zones de fort champ électrique. Notons que dans le cas des structures à trois canaux le champ de vitesse dans les ouvertures est plus important en présence des structures triangulaires, ce qui peut de cette façon aider à éviter de garder une cellule bloquée par DEP dans ces zones (*Figure III-8-4*). Cependant, en contractant le flux nous augmentons de façon considérable sa vitesse, ce qui engendrera une plus grande difficulté à capturer les cellules par DEPp, celles-ci étant alors plus véloces. À ce niveau, il est encore difficile de trancher sur l'efficacité d'une telle structure.

6. Conclusion

Au cours de ce chapitre sur la simulation de la cartographie du champ électrique, nous avons pu confirmer l'attrait de la structure proposée par Washizu et al. Celle-ci sera d'ailleurs, une fois parallélisée, un très bon outil pour mettre en place un protocole basé sur la DEPp et l'électrofusion. Toutefois, il nous semble possible d'améliorer cette structure en proposant une nouvelle architecture basée sur l'emploi de trois canaux et d'une électrode enterrée. Malgré un design plus complexe que celui de Washizu, sa fabrication parait largement envisageable, d'autant plus que les simulations de cette nouvelle structure paraissent encourageantes. Enfin, l'utilisation d'électrodes épaisses et la modification du flux dans les canaux sont deux options que nous pourrons appliquer pour optimiser nos structures.

Durant ces simulations, nous avons vu également les limites de nos modèles. Ceux-ci ne peuvent en effet décrire tous les phénomènes et n'oublions pas que nous restons dans un monde virtuel. Ces résultats devront être confrontés à l'expérimentation pour valider tout leur potentiel. Cependant, comme nous le verrons par la suite, elles permettent tout de même de bien prédire le comportement d'une cellule soumise à la DEP. Cela reste donc un très bon outil pour trier et sélectionner les meilleures structures de nos microsystèmes. Mais pour rendre ces structures réelles passons à leur fabrication.

C. Fabrication

1. Introduction

Les simulations nous ont permis de sélectionner deux structures aux designs différents, mais qui d'un point de vue technologique sont assez proches. On peut d'ailleurs regrouper ces spécificités de la façon suivante : il nous faut tout d'abord des canaux capables de transporter des cellules sur de grandes distances et ayant des géométries permettant de modifier la cartographie de champ et l'écoulement du flux. Ensuite, il nous faut maîtriser la fabrication d'électrodes fines et épaisses. Enfin, nous devons réussir à englober tout cela dans un dispositif connectable avec l'extérieur et facilement exploitable. Lors de notre étude sur la microtechnologie, nous avons choisi le procédé utilisant la résine SU-8. Celle-ci possède en effet un grand nombre de qualités, en particulier d'avoir un haut aspect de forme, être biocompatible, être transparente… Cependant, aucune des technologies mises en place jusqu'à présent ne permet d'insérer des électrodes épaisses dans les canaux et de souder des substrats à la fois durs et mous, il nous reste donc à la développer. De même, la fabrication d'électrodes épaisses de plus d'une dizaine de microns nécessite la mise en place d'un protocole encore peu développé. Si ces deux étapes semblent les plus difficiles à surmonter, en fait chaque étape pour mener à bien la réalisation du microsystème a son lot d'obstacles. C'est pourquoi nous aborderons le processus de fabrication dans son ensemble en commençant par la réalisation des masques, pour finir après de multiples étapes sur la connectique. Mais avant de se lancer dans ce processus présentons la salle blanche.

2. La salle blanche : univers épuré

Dans le chapitre précédent nous avons discuté de l'intérêt de paralléliser notre structure de base pour augmenter de façon importante le nombre d'hybridomes produits. Cela signifie que notre dispositif a des dimensions à la fois micrométriques et occupe une surface de plusieurs centimètres carrés, d'où une sensibilité accrue à la moindre contamination durant sa phase de fabrication. Ainsi, un cheveu ou une poussière pourraient obstruer un des canaux ou perturber une des étapes d'insolation. Pour éviter ce type d'accident, nous travaillons en salle blanche (*clean room*). Cet espace de travail se caractérise par un contrôle drastique de la pureté de tous les éléments mis en contact avec les échantillons. C'est le cas par exemple de l'air qui est filtré pour être dépourvu des principales poussières. Pour donner un exemple, 1 m^3 d'air dans la salle de lithographie de la CTU d'Orsay contient moins de 1000 particules d'un diamètre de 0,1 µm et quasiment aucune particule d'un diamètre supérieur à 1 µm (classe iso 3 ou classe 1000). De ce fait, pour préserver cet environnement l'utilisateur doit s'équiper d'une combinaison intégrale, de surchaussures et de gants, car dans ce lieu épuré c'est lui qui est la principale source de contamination. Enfin, la salle blanche étant un lieu contenant des substances chimiques dangereuses (acide fort, gaz toxique…), les règles de sécurité y sont très sévères. Passons maintenant à la première étape de fabrication : la réalisation des masques.

3. Les masques

Lors du chapitre sur la microtechnologie, nous avons parlé des résines photosensibles. Comme leur nom l'indique, elles sont sensibles aux rayonnements lumineux et tout particulièrement aux UV. Ainsi lorsqu'elles sont illuminées, elles peuvent devenir résistantes ou solubles à une solution de développeur. Dans le cas où elles deviennent résistantes, on parle de résine négative, dans le cas contraire, on les nomme résine positive. Dans le cadre de nos applications, toutes les résines seront négatives. En partant de ce principe, on peut donc envisager de masquer certaines zones aux rayonnements et inversement en exposer. On peut obtenir de cette façon des zones délimitant les parois de canaux ou encore laissant à nu le substrat sur des emplacements bien définis tout en laissant le reste recouvert de résine. Pour former ces zones d'ombre et de lumière, on utilise un masque.

a) Dessin et fabrication :

Le masque, de part son rôle de délimitation des zones éclairées ou non, va donner la résolution de nos structures (à un phénomène de diffraction près). Les choix techniques pour le réaliser auront donc un impact sur la finesse et la qualité de notre dispositif (voir *Tableau III-2*). Dans le cadre de nos travaux, nous avons employé trois types de procédés pour fabriquer nos masques et pour définir le design du masque nous nous sommes servis de deux logiciels de dessins, l'un destiné au grand public : Illustrator et l'autre conçu pour un usage professionnel et spécifique : CleWin [194].

Technique	Qualité transparence/opacité	Résolution max.	Temps de développement (dessin+fab.)	Coût
Masque plastique	mauvaise/moyenne	~20 µm	~3 jours	<10 €
Masque plastique transféré sur masque chrome	bonne/excellente	~20 µm	~4 jours	~40 €
Lithographie Laser sur masque chrome	excellente/excellente	<1 µm	1 semaine	~80 €
Fabricant de masque	excellente/excellente	<1µm	2 à 4 semaines	>300 €

Tableau III-2 : Caractéristiques techniques des différents types de masques.

Dans un premier temps nous avons employé la technique de masque plastique pour développer nos systèmes. Cette technique repose sur l'utilisation d'un film plastique sur lequel va être *flashé* le motif défini par un fichier informatique. A la base, ce type de produit est commandé par les architectes pour pouvoir superposer leurs différents plans de construction. N'étant pas spécifique à la microtechnologie, il présente de nombreux défauts : sa résolution est ainsi rarement inférieure à 20 µm, le plastique est bullé impliquant une mauvaise transparence, les parties noires ne sont pas parfaitement opaques à la lumière et enfin le film plastique présente de nombreuses microrayures (*Figure III-9*). Toutefois, la résolution étant faible, un logiciel de dessin comme Illustrator dont la prise en main est aisée, permet de tracer rapidement ces premiers masques. De plus, de nombreux imprimeurs proposent ce service pour une somme modique (moins de 10 € la page A4) et un délai

d'impression d'à peine 24h. Cette technique est donc très utile pour se faire la main sur ses premiers masques, et permet de développer à moindre coût ses premiers dispositifs. Cependant, une fois que le design des structures et le protocole technologique commencent à prendre forme les défauts du masque plastique deviennent fortement pénalisants. Ainsi, les bulles présentes dans le film diffractent le rayonnement UV et empêchent la bonne insolation de la résine, ce qui provoque durant la fabrication des électrodes, des dépôts métalliques sur des zones qui devraient en être dépourvues. De même, les microrayures engendrent des coupures dans les structures (*Figure III-9*).

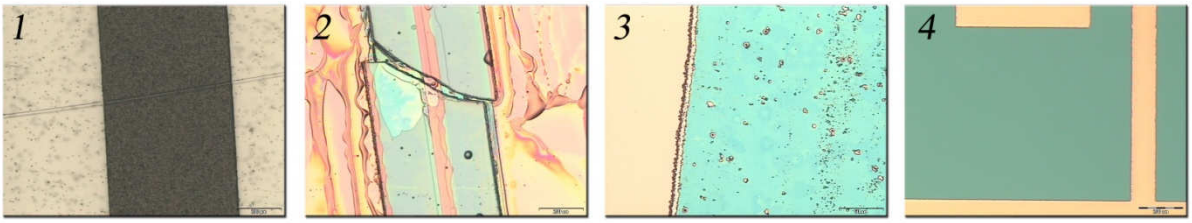

Figure III-9 : 1) Masque plastique, on distingue une coupure traversant de part en part l'image et de nombreuses bulles dans les zones claires. 2) Conséquence d'une rayure d'un masque plastique sur une structure en SU-8. 3) Électrode sur la gauche dont les bords sont dentelés et présence non souhaitée de petits ilots métalliques sur la zone bleu (silice) dus aux bulles. 4) Électrodes réalisées à l'aide d'un masque chrome issu du transfert d'un masque plastique, la plupart des défauts ont disparu.

Pour corriger ces différents problèmes nous avons eu recourt au transfert de masque plastique sur un masque chrome. Le masque chrome est le masque de prédilection pour la microfabrication. Il est constitué d'une plaque de verre qui fait office de support transparent et d'une fine couche de chrome structurée qui absorbe très efficacement les UV. Pour améliorer la qualité de nos masques, nous utilisons des masques de chromes vierges (entièrement couvert de chrome) que nous recouvrons d'une résine inversible (même propriété qu'une résine négative). Ensuite, nous exposons ce masque vierge à travers le masque plastique de notre choix. Durant cette étape nous exposons la résine à une dose deux fois plus élevée pour gommer au mieux les défauts (bulles et rayures), en contrepartie nous perdons légèrement en résolution. Une fois la résine développée, nous immergeons le masque dans une solution de gravure de chrome, ce qui nous permet de retirer le chrome sur les zones non protégées par la résine. La gravure aide en partie à effacer les défauts et à lisser les bords des structures. Au final, en supprimant la résine à l'aide d'un solvant, nous obtenons un masque chrome avec une faible résolution, mais parfaitement opaque, avec des défauts minimisés et une transparence accrue. De tels masques donnent des dispositifs de bonne qualité et à moindre coût, mais avec une faible résolution (voir *Figure III-9*).

La dernière technique de fabrication de masque a été rendue possible durant ma troisième année de thèse, lorsque la CTU s'est équipée d'un appareil de lithographie laser [195]. Comme dans la technique précédente, nous partons d'un masque de chrome vierge recouvert d'une résine, sauf que cette fois-ci, c'est un laser asservi par un ordinateur qui va venir insoler les zones spécifiées par le dessin du masque. La qualité du masque ainsi obtenue est excellente en tout point. Par contre, elle nécessite, du fait de la haute résolution (<1 µm), l'utilisation de logiciel professionnel dédié au dessin de masques. Ce type de logiciel demande un certain temps d'adaptation et est plus difficile à manier qu'Illustrator. Enfin, son

coût de développement est plus élevé suite aux frais de réservation de la machine, mais reste raisonnable comparé aux prix pratiqués par les industriels (voir *Tableau III-2*). Si nous savons comment dessiner et fabriquer des masques, nous ne savons pas encore comment les utiliser au mieux.

b) Bien utiliser des masques

Notre dispositif est un empilement de structures plus ou moins complexes : électrodes, parois de canaux, capot… il faut donc développer pour chacun un masque spécifique. Or, à chaque nouvelle étape, nous devons aligner le masque avec la structure présente sur l'échantillon. Ainsi, dans le cas de l'alignement entre le masque des parois des canaux et le réseau d'électrodes présent sur le substrat, l'erreur d'alignement doit être inférieure à 5 µm. Pour se faire nous disposons deux séries de motifs d'alignements sur les masques, l'une aux dimensions millimétriques et l'autre aux dimensions micrométriques. Les gros motifs nous permettent un alignement rapide et grossier et les petits motifs d'ajuster l'alignement à quelques micromètres près. Les motifs d'alignements sont le plus souvent des dessins qui se superposent ou s'emboitent entre eux. Le plus commun est de reproduire une croix sur le premier niveau de masquage et des carrés venant s'imbriquer sur elle sur le deuxième niveau de masquage (voir *Figure III-10*).

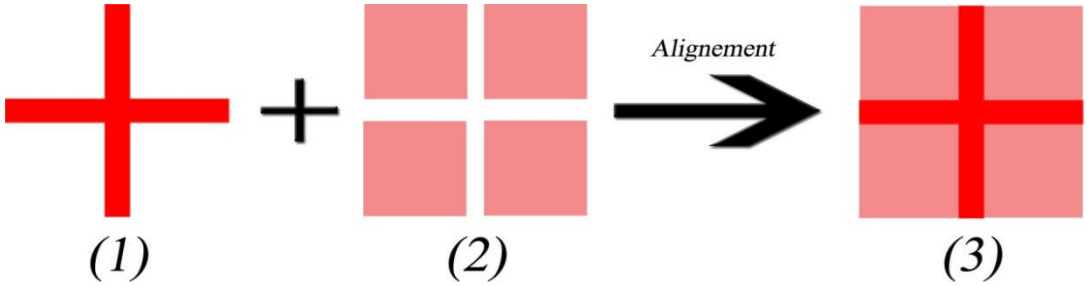

Figure III-10 : Principe de l'alignement. 1) Suite au premier masquage, des croix d'alignements sont présentes sur l'échantillon. 2) Le deuxième masque est composé de motifs pouvant s'imbriquer sur la croix. 3) À l'aide d'optique présente sur la machine nous alignons l'échantillon et le masque en imbriquant les motifs.

D'autres paramètres sont à prendre en compte lors du dessin du masque. Par exemple, il faut éviter au maximum de placer des structures au bord de l'échantillon, car c'est à cet endroit que la résolution est la plus mauvaise à cause de l'effet de bord induit lors de l'enrésinement. Il vaut mieux aussi privilégier deux dispositifs sur un échantillon, qu'un seul gros dispositif qui sera d'autant plus sensible aux défauts de fabrication. Enfin, lorsque l'on parallélise une structure, il est intéressant de modifier ses paramètres, comme sa largeur ou sa longueur. Ainsi, on arrive à mieux paramétrer son protocole et à connaitre ses limites. Pour mieux appréhender chacun des dessins des masques que nous avons fabriqués, nous les présenterons au fur et à mesure de leur utilisation. Le premier sera ainsi celui permettant de réaliser les électrodes.

4. Les électrodes

Les électrodes sont primordiales dans notre dispositif, car ce sont elles qui permettent de générer le champ électrique. Nous devons donc dans un premier temps, nous assurer que les électrodes fournissent un champ électrique constant tout le long des canaux. Il faut donc

limiter au maximum la chute de potentiel le long des électrodes, ce qui revient à avoir la résistance la plus faible. La résistance électrique (R) d'une électrode est donnée par la relation suivante :

$$R = \frac{l}{\sigma . S}$$

Avec l la longueur de l'électrode, σ sa conductivité ($S.m^{-1}$) et S sa section (m^2). Durant les simulations, nous avons élaboré deux types d'électrodes : des électrodes fines en or (<1 µm) et des électrodes épaisses en cuivre (>10 µm). Nous obtenons ainsi, en supposant que nos électrodes sont longues de 2 cm et large de 300 µm, une résistance $R_{elec.\ fine}$~1,5 Ω et évidemment au minimum dix fois moins pour les électrodes épaisses $R_{elec.\ epaisse}$~0,1 Ω (pour les valeurs de conductivité consulter le *Tableau III-1*). La chute de tension le long des électrodes est ainsi minime et ce d'autant plus que le milieu a une conductivité très faible et se comporte donc comme une résistance élevée (R_{milieu}~1e^6 Ω, on suppose que l'on travaille en haute fréquence, négligeant ainsi les effets de la double couche à l'interface). Tout cela implique que nous pouvons réaliser des électrodes d'une longueur d'au moins 2 cm sans risquer de diminuer la valeur du champ électrique au bout des électrodes. C'est donc en prenant en compte tous ces paramètres (simulation, optimisation, résistance…) que nous avons élaboré le design du masque d'électrodes présenté en *Figure III-11*.

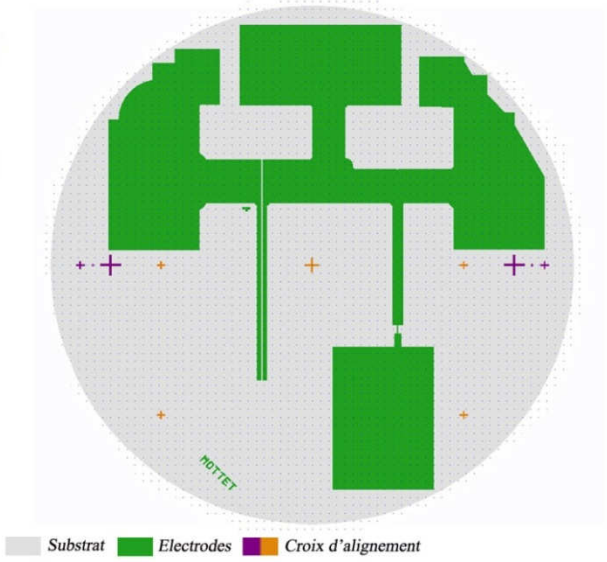

Figure III-11 : premier niveau de masquage : réseau d'électrodes.

Notons que tous nos échantillons sont constitués à la base d'un substrat circulaire de verre ou de silicium d'un diamètre de 5 cm (schématisé par le cercle gris sur la *Figure III-11*). Notre réseau électrique est formé de quatre électrodes. En haut, on trouve deux électrodes latérales composées chacune d'un plot pour une future soudure et d'une longue (>2 cm) et fine (300 µm) piste, et une troisième électrode centrale qui possède aussi un plot mais se divise en deux longues pistes. En bas à droite, on aperçoit une autre électrode avec son plot et le début de la piste, le reste de la piste étant trop petit pour être visible sur cette figure. Cette électrode est la future électrode enterrée dans la structure trois canaux. On obtient ainsi nos deux dispositifs sur un même échantillon (Washizu/trois canaux). Enfin, notons que les

longues électrodes du haut sont espacées entre elles de 200 µm ou 100 µm, c'est d'ailleurs dans ce long, mais petit interstice que les futurs canaux seront construits. Ayant défini le premier niveau de masquage, nous pouvons à présent aborder la fabrication des électrodes.

a) Les électrodes fines.

Pour obtenir notre réseau d'électrodes fines nous avons utilisé le procédé dit de *lift-off* (décollement) à l'aide de la résine inversible AZ 5214E de la compagnie Clariant [196]. Ce procédé a l'avantage de ne déposer le métal qu'au seul endroit défini. Il évite ainsi toutes les étapes de gravures et empêche toute contamination de métal sur les zones dépourvues d'électrodes. Son emploi permet de gagner du temps et de limiter l'emploi de produit chimique. En revanche, il nécessite un certain savoir-faire et demandera plusieurs expérimentations de la part de l'opérateur avant de bien maitriser le protocole. L'intérêt de la résine AZ 5214E est d'avoir des flancs dits en forme de casquette, ce qui facilite grandement le décollement de la résine une fois le métal déposé dessus. Pour obtenir ces structures en biseau nous suivons le protocole suivant : nous en enrésinons tout d'abord l'échantillon à une vitesse de 1000 rpm durant 30 s pour obtenir une épaisseur de résine d'un peu moins de 3 µm. Ensuite, nous mettons à cuire l'échantillon à 110°C pendant 50 s pour évaporer le solvant contenu dans la résine. Après cela, la résine est insolée à travers le premier masque avec une énergie surfacique de 2 mJ/cm², pour cette étape nous utilisons un aligneur conventionnel pour la lithographie de type EVG 620. La résine est maintenant inversée par un recuit à 120°C durant 2 min, puis elle est à nouveau insolée, mais cette fois-ci sur toute sa surface avec une énergie surfacique de 180 mJ/cm². Pour finir la résine est développée dans une solution d'AZ développeur mélangé avec de l'eau (rapport 1 :1) pendant approximativement 90 s (voir *Figure III-12*). A présent notre échantillon est prêt à recevoir le dépôt métallique.

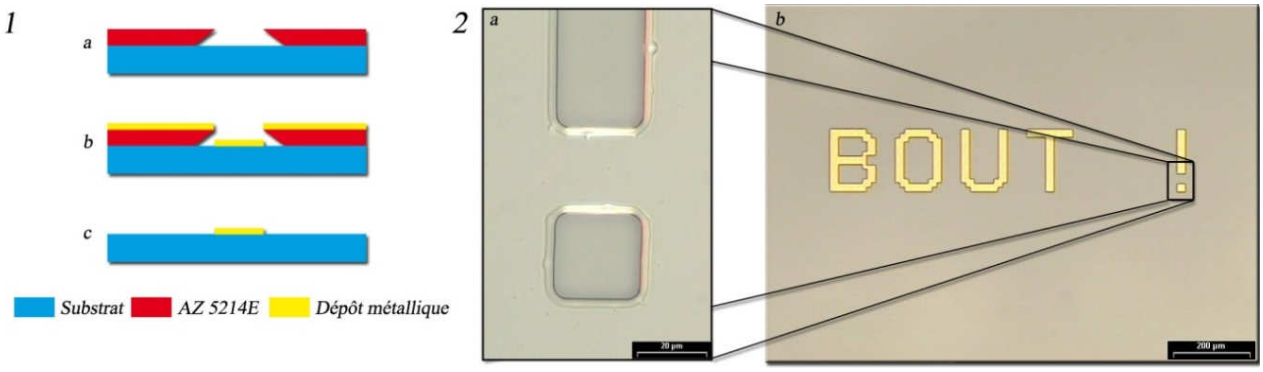

Figure III-12 : 1) Principe du lift-off avec la résine AZ 5214E: (a) structure de la résine avec ses flancs biseautés (b) dépôt métallique (c) suppression de la résine et obtention d'un dépôt métallique localisé. 2) (a) photo de la résine AZ5214 juste après le développement on distingue les flancs biseautés (b) photo montrant le résultat obtenu après métallisation puis suppression de la résine.

Pour ce dépôt nous avons choisi comme matériau l'or, car c'est un métal noble (inoxydable), un bon conducteur électrique et il est biocompatible. En revanche, l'or a un faible pouvoir d'accroche, c'est pourquoi nous déposons une sous-couche en titane pour améliorer l'adhésion. Le dépôt se fait par pulvérisation cathodique dans un bâti de la société Denton Vacuum. Au final, nous déposons une première couche de 150 nm de titane et une seconde couche de 800 nm d'or (20 nm/min). Il ne nous reste plus qu'à dissoudre la résine

dans de l'acétone pour obtenir notre réseau d'électrodes (voir *Figure III-12*). Pour faciliter le décollement de la résine, le recourt à des ultrasons peut s'avérer nécessaire. Dans le cadre de nos optimisations, nous souhaitons réaliser des électrodes épaisses (>10 µm), or avec les techniques de dépôt par pulvérisation cathodique ou par évaporation, il est difficile de déposer des couches d'épaisseurs supérieures au micron. En effet, notre dépôt demande déjà plus d'une heure d'utilisation, ce qui entraine pour l'appareil un échauffement important, une forte contamination du bâti et une grande usure de la cible. Nous nous sommes donc tournés vers un autre type de technologie de dépôt : le dépôt électrolytique.

b) Les électrodes épaisses

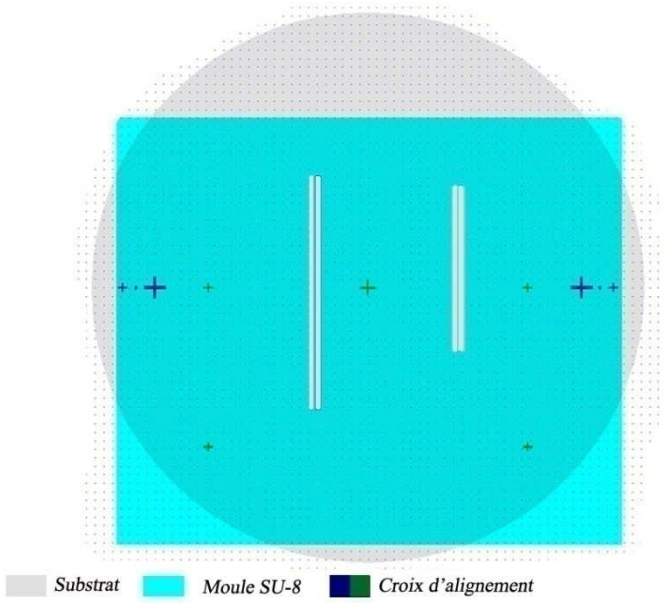

Figure III-13 : Deuxième niveau de masquage : moule SU-8 pour dépôt électrolytique.

La CTU d'Orsay met à disposition tout l'équipement nécessaire pour procéder à un dépôt électrolytique. La présence de cet équipement revient en fait aux nombreux travaux de fabrication de microbobines développés par le laboratoire MINASYS [15]. Toutefois, le protocole mis en place ne permettait pas de réaliser des électrodes épaisses de plus de 10 µm. Il fallait donc trouver un procédé pour concevoir des moules permettant la croissance électrolytique de structure épaisse de plus de 10 µm. La SU-8 s'est tout de suite imposée comme le choix le plus adéquat : elle permet en effet d'élaborer des structures de plus de 100 µm d'épaisseur et nous avions déjà une expérience dans sa manipulation. Cependant, une fois structurée, la SU-8est très difficile à enlever. Il n'existe pas comme pour les résines positives un solvant qui permet de la dissoudre efficacement. Lors du début de ma thèse, un nouveau promoteur d'adhérence spécifique pour la SU-8 venait d'être mis sur le marché : l'Omnicoat [197]. Il s'avère qu'il peut aussi être utilisé comme couche sacrificielle pour aider à supprimer les couches de SU-8 structurées. Nous avons donc mis en place un protocole de fabrication de moules incorporant ce produit. D'autres techniques existent pour enlever des structures en SU-8 en utilisant par exemple un plasma [198] ou des bains chimiques très agressifs [199]. Il nous reste encore à décider du métal employé pour le dépôt électrolytique. Le choix le plus logique aurait été de choisir l'or, mais des bains électrolytiques d'or contiennent du cyanure (difficulté pour obtenir les autorisations d'emploi) et ont un coût financier d'exploitation

important. C'est donc le cuivre, matériau bon marché et possédant une bonne conductivité, que nous avons sélectionné. Le dernier point à traiter est le dessin du masque qui donnera forme au moule. Nous n'avons pas besoin de rendre tout le réseau d'électrodes épais, seule la partie en contact avec les canaux le requiert. Notre moule recouvrera donc l'ensemble de l'échantillon sauf deux parties (voir *Figure III-13*):

- les électrodes en contact avec les canaux plus une marge supplémentaire de 300 µm pour laisser la solution électrolytique rentrer facilement à l'intérieur

- et la partie haute de l'échantillon pour permettre de prendre un contact électrique lors du dépôt électrolytique.

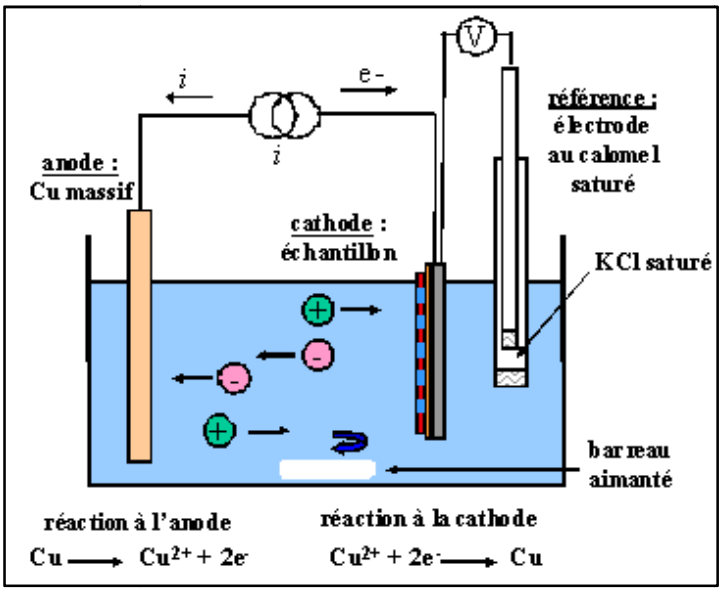

Figure III-14 : Schéma du dispositif et du principe de dépôt électrolytique de cuivre [15].

Le protocole de fabrication d'électrodes épaisses se divise en trois parties : réalisation du moule, dépôt électrolytique puis destruction du moule. Comme nous venons de le dire, le moule est constitué de deux couches. La première couche est une fine couche d'Omnicoat qui permet à la fois d'augmenter l'adhésion de la SU-8 sur le substrat en verre et fera aussi office de couche sacrificielle pour l'étape de suppression du moule. La deuxième couche qui donne la forme du moule est faite de SU-8 2100 (pour les paramètres techniques, voir *Tableau III-3*). Une fois que cette couche est structurée, nous passons l'échantillon dans un plasma O2/CF4 (0,1mbar, 200W) pendant 3 minutes pour s'assurer que les couches métalliques soient parfaitement propres. Nous passons ensuite à la deuxième étape : le dépôt électrolytique. Pour cela nous immergeons la partie de l'échantillon où nous souhaitons que le dépôt se fasse dans une solution acide contenant des ions cuivre (Cu^{2+}). Ensuite nous relions notre échantillon à la cathode et appliquons un courant de 100 mA qui va induire le dépôt de cuivre via la réaction Cu^{2+}+2e-=Cu (voir *Figure III-14*). Un tel courant nous permet de déposer approximativement 0,8 µm de cuivre par minute. Dans le cadre de cette application, nous limitons le dépôt à une épaisseur d'une quinzaine de micromètres, mais pour d'autres projets basés sur le même procédé nous sommes montés à 50 µm (voir *Annexe III*). L'échantillon est à présent pourvu d'électrodes épaisses, il ne reste plus qu'à dissoudre le moule en SU-8. Pour ce faire, nous plongeons l'échantillon dans une solution chaude (~80°C) de *remover PG* pendant 30 à 40

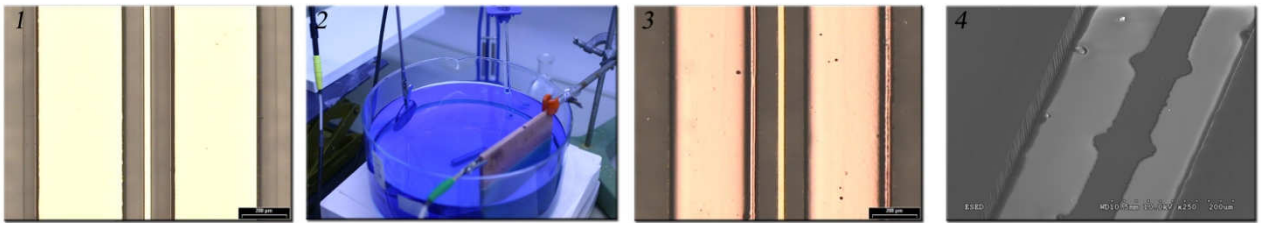

Figure III-15 : Différentes étapes de la fabrication des électrodes épaisses. 1) Moule en Su-8 laissant à nu les électrodes qui recevront le dépôt et recouvre le reste de l'échantillon. 2) Échantillon en cours de dépôt électrolytique de cuivre. 3) Électrodes épaisses obtenues après destruction du moule, au centre électrode fine. 4) Image MEB d'électrodes épaisses sur les cotés et au centre électrode fine.

minutes. Notons que l'usage des ultrasons peut être nécessaire pour aider à supprimer certains morceaux de SU-8 bien accrochés. Au final, nous obtenons un échantillon pourvu d'un réseau d'électrodes fines en or et d'électrodes épaisses en cuivre (voir *Figure III-15 et Figure III-17*). Avant de passer à la prochaine étape de fabrication, remarquons que l'usage d'électrode en cuivre est assez problématique dans notre cas, car celui-ci s'oxyde rapidement à l'air. Pour remédier à ce défaut, il existe des solutions d'autocatalyse d'or qui permettent de déposer, simplement en immergeant l'échantillon, une fine couche d'or (~60 nm) sur les parties métalliques [200]. Le principe de ce dépôt repose sur la réaction chimique entre les ions métalliques et un agent réducteur, permettant ainsi d'obtenir des atomes métalliques qui interagiront par la suite avec le substrat [201]. Le prix de ces solutions est certes conséquent 1500€/L (contient 6g d'or), mais dans le cadre de systèmes réutilisables et interagissant avec des cellules, cela semble une voie intéressante à développer.

5. Parois des canaux et isolation des électrodes

Cette étape peut se révéler rapide à mettre en place dans le cas où notre dispositif n'est pourvu que d'électrodes fines. En effet, la résine SU-8 qui sert à modeler les parois s'étalera facilement et les étapes suivantes d'insolation et de développement seront faciles à réaliser. Seule l'adhésion de la résine SU-8 sur des surfaces comme le verre ou la silice se révèle difficile. Ceci s'explique par la différence des propriétés des surfaces des matériaux, le verre et la silice sont hydrophiles et présentent à leur surface une fine couche d'eau native, alors que la SU-8 est hydrophobe. Si on étale de la SU-8 sur une surface recouverte de cette fine couche d'eau, ceci va entrainer un stress important dans les structures de SU-8, d'où un risque élevé de décollement. Pour éviter cela, il suffit de déshydrater la surface de l'échantillon en le laissant pendant 30 minutes sur une plaque chauffante à 200°C. Ensuite, il suffit de suivre le protocole établi par le fabricant de la résine SU-8 pour réaliser les parois des canaux (voir *Tableau III-3*). Par contre, si l'on considère que notre échantillon est pourvu d'électrodes épaisses, l'état de surface de la résine SU-8 après enrésinement va être problématique. La résine SU-8 est visqueuse et les couches déposées sont importantes, en présence d'une surface structurée, elle va donc répercuter la forme des électrodes épaisses sur sa surface. On se retrouve ainsi avec une surface complètement *vallonnée* (voir *Figure III-16*). Or une telle rugosité de surface est incompatible avec l'étape suivante qui consiste à venir coller un capot sur cette surface. Dans ces conditions le collage sera de mauvaise qualité et l'on risque d'avoir des fuites lors de l'injection de liquide dans les canaux. Pour remédier à ce phénomène, nous insérons notre échantillon avec sa surface rugueuse de SU-8 dans une

machine à soudure de wafer EVG 501 et nous la paramétrons de telle façon qu'elle presse l'échantillon avec une force de 700 N tout en le chauffant à 70°C. Pour protéger la machine des écoulements de SU-8, nous plaçons un film en PET entre l'échantillon et le piston. Au bout de 30 minutes, nous récupérons l'échantillon et reprenons le cycle normal de développement : insolation, post-recuit et développement. Le résultat final est très intéressant car nous avons fortement gommé le vallonnement produit par les électrodes épaisses, mais aussi une partie de l'effet de bord (voir *Figure III-16*). Nous obtenons ainsi une surface de SU-8 presque aussi lisse que si nous étions partis d'un échantillon parfaitement plat.

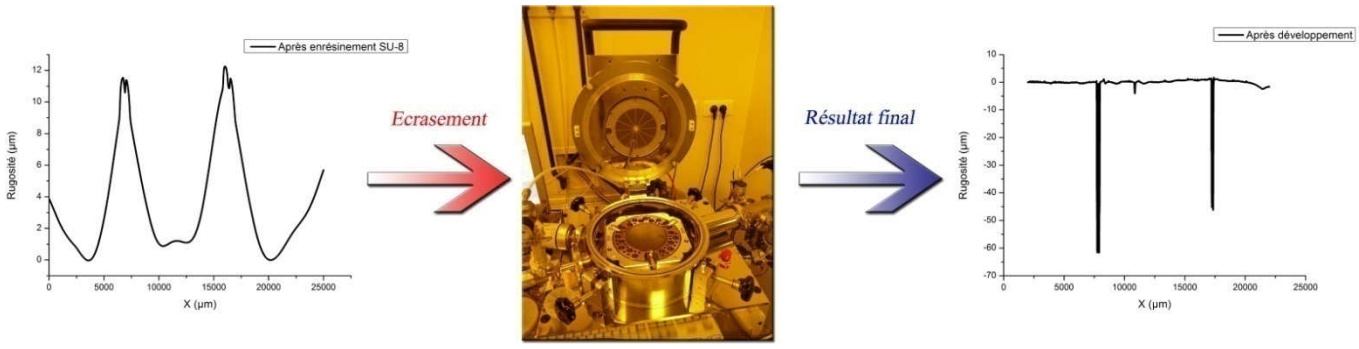

Figure III-16 : Principe du lissage de la surface de SU-8 après enrésinement sur une surface fortement structurée. À gauche : mesure au profilomètre mécanique donnant l'état de surface après enrésinement. Au centre : appareil ouvert prêt à recevoir l'échantillon pour le presser. À droite : mesure au profilomètre mécanique montrant un état de surface finalement lisse, on distingue les canaux des deux dispositifs (les deux pics).

Nous savons maintenant comment fabriquer des parois de canaux même en présence d'électrodes épaisses, il ne nous reste plus qu'à définir le design que nous voulons donner à ces parois. Lors des simulations nous avons défini deux types de structures de parois isolantes : la structure *Washizu* et la structure *trois canaux*. Dans le cadre de nos simulations de la structure Washizu, nous avons vu que les variations de forme de la paroi centrale avaient une répercussion sur la cartographie de champ électrique. Nous avons donc dessiné une paroi centrale avec différentes largeurs et différentes formes pour essayer de retrouver expérimentalement ces variations sur la DEP. Ces variations des structures seront aussi utiles pour visualiser l'efficacité de notre protocole et permettront ainsi de l'optimiser. De plus, dans le cadre de l'optimisation de la structure Washizu nous avons ajouté pour certaines parties des canaux, des structures triangulaires pour dévier le flux et faciliter la capture des cellules. En revanche, la structure trois canaux étant déjà assez complexe, nous n'avons pas fait varier ni la taille ni la forme des parois. Pour les entrées et sorties des canaux, nous nous sommes contentés pour le moment à deux entrées et une sortie par dispositif (voir *Figure III-17*).

À ce niveau du développement, les dispositifs sont assez avancés pour permettre les premiers tests de DEP et d'électrofusion sur des cellules. Il suffit en effet de déposer une goutte contenant des cellules sur notre dispositif et de la presser avec une lamelle de verre pour obtenir des canaux remplis de cellules. Certes, nous ne pouvons pas faire varier le flux dans les canaux ni maitriser où vont se positionner les cellules, mais cela est suffisant pour faire nos premières expérimentations. En parallèle de ces expériences, nous avons continué la mise au point de la prochaine étape de fabrication : le scellement des canaux.

Type de Résine	Omnicoat	SU8-2100	SU-8 3050	SU-8 3005
Fonction	Promoteur & Couche sacrificielle	Moule	Parois des canaux	Isolation des électrodes fines
1er palier vitesse (rpm)	500	500	500	500
1er palier accélération (rpm.s-1)	300	300	300	300
Temps (s)	10	30	30	20
2ieme palier vitesse (rpm)	1000	5000	3000-4000	4000
2ième palier accélération (rpm.s-1)	300	300	300	300
Temps (s)	60	60	60	60
1er recuit min@°C	1'@200°C	3'@65°C, 13'@95°C	1'@65°C, 10'@95°C	1'@65°C, 5'@95°C
Exposition (mJ)		150	200	120
2ième recuit min@°C		2'@65°C, 10@95°C	1'@65°C, 8'@95°C	1'@65°C, 5'@95°C
Développement PGMEA (min)		8	5	3
Épaisseur (µm)	~0,02	~80	~50-~40	4

Tableau III-3 : Paramètres des procédés d'utilisation de l'Omnicoat, de la SU-8 2100 (Moule), de la SU-8 3050 (parois des canaux) et de la SU-8 3005 (isolation des électrodes).

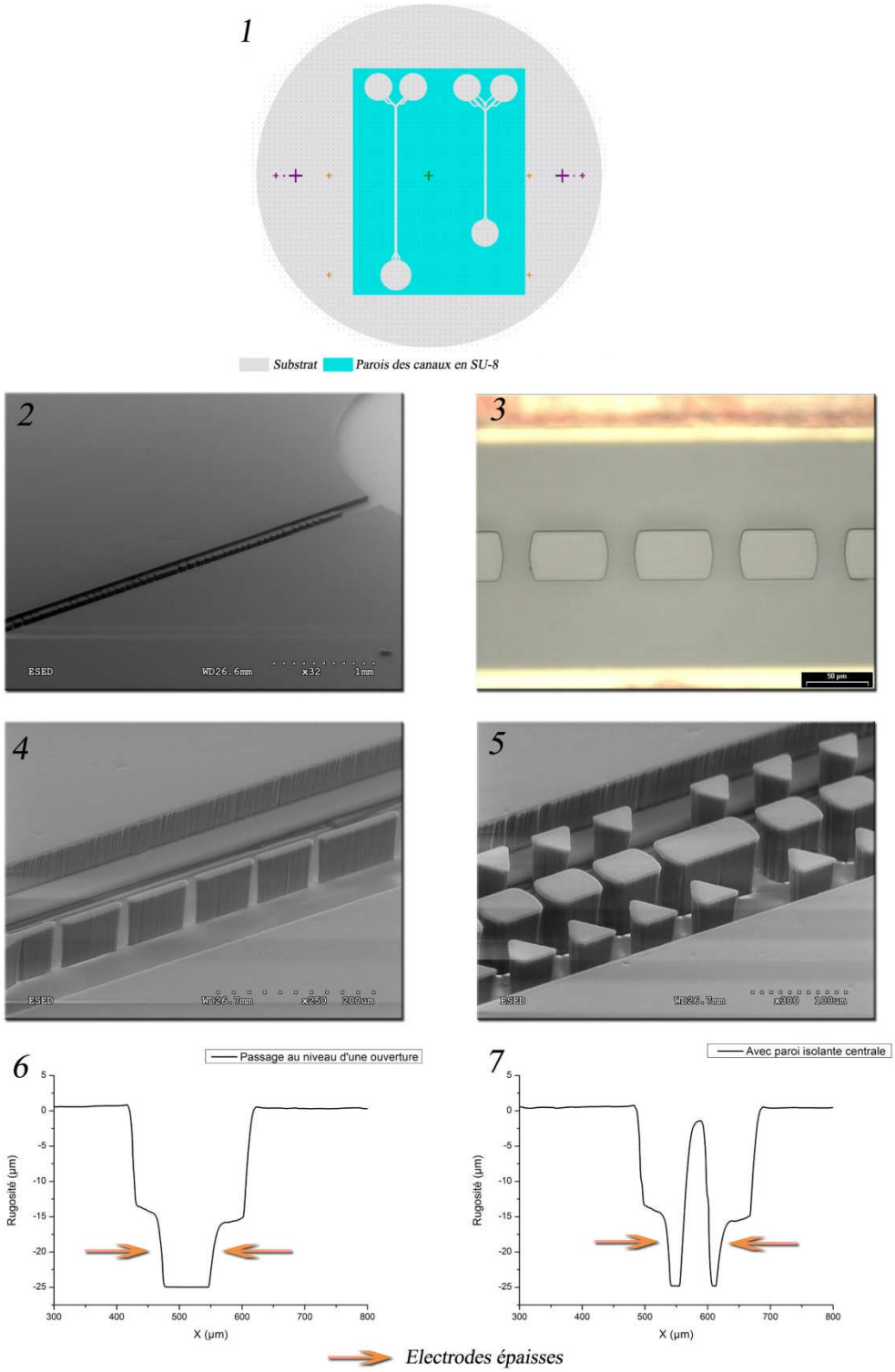

Figure III-17 : 1) Troisième niveau de masquage parois des canaux. 2) Photo MEB d'une structure Washizu parallélisée, on distingue les canaux avec la structure centrale et sur la droite la sortie du dispositif. 3) Photo vue de haut de la structure Washizu avec ces nombreuses ouvertures dans la paroi centrale. 4) Photo MEB zoomant sur les structures centrales, on aperçoit en fond une électrode épaisse et une paroi du canal. 5) Photo MEB mettant en évidence les structures triangulaires servant à dévier le flux. 6&7) Mesures au profilomètre mécanique d'une coupe d'une structure Washizu au niveau d'une ouverture ou au niveau d'une paroi isolante.

6. Collage de substrats souples et durs pour sceller les canaux

Dans la partie Microtechnologie, nous avons présenté deux technologies pour sceller des microcanaux : l'une est basée sur le collage de films de SU-8 souples et l'autre sur le collage de substrats durs recouverts de SU-8. La première présente l'avantage de s'adapter aux surfaces rugueuses et de nécessiter des forces de compression faibles limitant ainsi les écoulements de SU-8. Toutefois, un dispositif ainsi fabriqué est peu protégé des agressions extérieures et difficilement connectable avec l'extérieur. De l'autre, le collage de substrat dur permet d'utiliser des substrats de verre qui sont à la fois solides et sur lesquels il est aisé de coller des plots de PDMS pour se connecter vers l'extérieur. En revanche, cette technique demande un état de surface lisse et génère des écoulements de SU-8 importants pouvant boucher les canaux. Nous proposons donc de coupler ces deux techniques pour réunir leurs avantages et pallier les défauts de l'une et de l'autre. Le protocole mis en place consiste dans un premier temps à sceller les canaux avec un film de SU-8 puis à recouvrir le tout en collant un substrat de verre. Avant d'aborder en détail chacune des étapes de ce protocole, notons que le dessin du masque se limite à définir les entrées et les sorties des canaux.

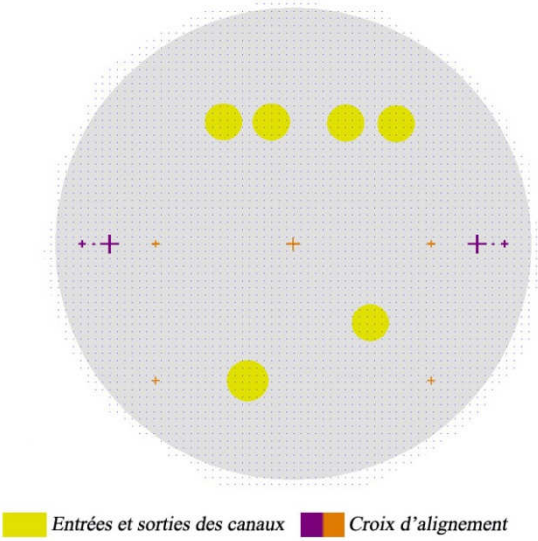

Figure III-18 : Quatrième niveau de masquage définissant les entrées et les sorties des canaux.

a) Collage de film SU-8 (Soft bonding)

Cette technique a été développée par Abgrall et al [187] et consiste à laminer des films constitués de SU-8 et de PET. Cette technique repose sur l'emploi d'un laminoir, or cette machine n'est pas présente au sein de la CTU d'Orsay. Nous avons donc transposé ce protocole expérimental sur la machine à collage de substrats (wafer bonding). L'emploi de cette dernière permet de réaliser le collage sous vide, mais le procédé nécessite au moins une demi-heure, alors qu'il ne faut que quelques minutes pour la lamination. Après plusieurs expérimentations nous avons donc mis au point notre propre protocole de collage de substrat souple. Celui-ci commence par la préparation du film de SU-8 qui est à la base constitué d'une couche de SU-8 de 20 µm d'épaisseur prise entre deux films de PET servant de support et de protection. Ce film est commercialisé par la société Microchem (référence DF 1000-20, plus commercialisé aujourd'hui). Pour une raison non expliquée, notre lot de films était

complètement *bullé* (plus exactement le film de PET) ce qui a eu des conséquences non négligeables sur la qualité de nos couches de SU-8 transférées. Pour les prochains développements, il faudra donc trouver un autre fournisseur ou fabriquer soit même les films de SU-8. La première étape consiste donc à découper la surface de film nécessaire et à retirer le premier film protecteur en PET. Avant de procéder au collage, nous exposons l'échantillon comportant les canaux à sceller et le film de SU-8 sous un plasma d'O2 (200W, 0,1mbar, 3 min) pour améliorer l'adhésion entre les deux couches. Nous plaçons ensuite l'échantillon dans la machine à collage de substrats en le recouvrant du film de SU-8. Le collage s'effectue par la suite à 65°C sous une force d'appui comprise entre 200 et 300 N durant 10 min. Le film de SU-8 est maintenant collé aux parois des canaux en SU-8, nous n'avons plus qu'à insoler l'échantillon (~180 mJ) à travers le masque pour définir les entrées et les sorties des canaux (voir *Figure III-18*). Enfin, nous retirons le film de PET, nous recuisons l'échantillon (2 min à 65°C puis 8 min à 95°C) et nous le développons dans une solution de PGMEA (~5 min). Nous obtenons ainsi des canaux recouverts d'une fine couche de SU-8 sur toutes leurs longueurs sauf au niveau des entrées et des sorties. Notons que les bulles présentes dans le film de PET posent problème lors de l'insolation en diffractant les UV, ce qui engendre un film de SU-8 entièrement tacheté. Pour limiter cet effet, nous avons trouvé la solution suivante qui consiste à insoler le film de SU-8 en deux fois. La première insolation de faible énergie permet de retirer le film de PET et la seconde insolation, de forte énergie, d'insoler correctement le film de SU-8 (voir *Figure III-19*).

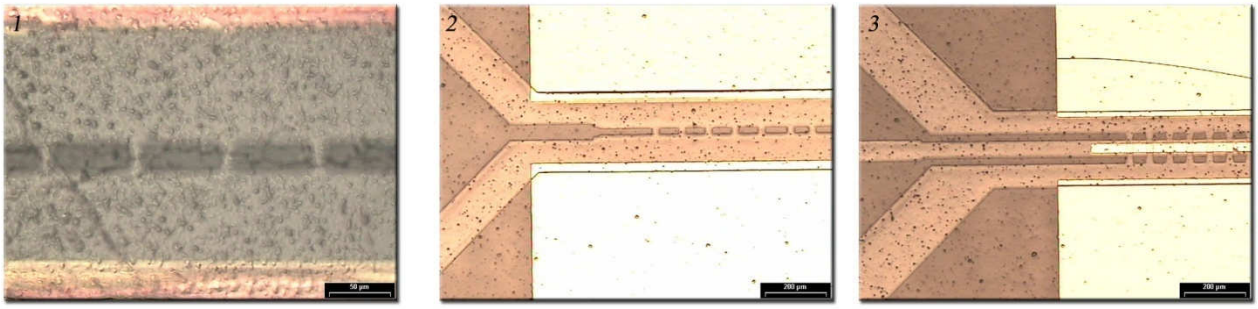

Figure III-19 : 1) Canaux scellés par un film de SU-8 fortement tacheté 2) Entrées des canaux de la structure Washizu scellés par un film de SU-8 faiblement tacheté (optimisation du procédé). 3) Comme en (2), mais entrées des canaux de la structure trois canaux.

À ce niveau de la fabrication, nous pouvons continuer de répéter cette étape de collage comme le propose Abgrall et al. De cette façon, nous transférons de nombreuses couches de SU-8 qui formeront à leur tour de nouveaux canaux. Nous disposons alors d'un dispositif à plusieurs niveaux, ce qui nous ouvre des perspectives intéressantes de création de nouvelles architectures. Dans le cadre de nos travaux de mise au point du protocole de collage, nous avons élaboré un dispositif de démonstration avec des canaux sur deux niveaux [202].

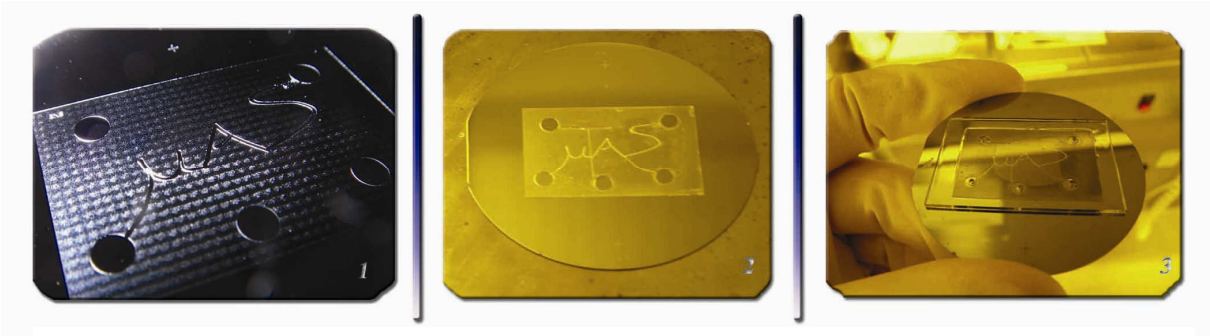

Figure III-20 : Dispositif à deux niveaux, développé à l'aide de la technologie de masque en plastique. 1) 1er niveau définissant les parois d'un très long canal formant les lettres « µAS », on distingue aussi les entrées et les sorties (grands ronds). 2) 2ième niveau formé de deux films de SU-8, l'un recouvrant entièrement le 1er niveau et le second délimitant le long canal en T. 3) Collage d'un substrat de verre pour protéger et connecter le dispositif.

b) Collage de substrats durs (hard bonding)

Notre échantillon dispose de canaux fluidiques, mais ceux-ci ne sont protégés de l'extérieur que par une fine couche de SU-8. De plus, il reste difficile à connecter avec l'extérieur. C'est pourquoi nous préparons un substrat de verre d'1 mm d'épaisseur en vue de le coller sur le dispositif. Cette plaque de verre est percée de trous de diamètre compris entre 1 et 0,6 mm pour permettre de relier les différentes entrées et sorties des canaux. Le perçage se fait à l'aide d'une perceuse et de forets carbures (voir *Figure III-21*). La technique est certes artisanale et demande un savoir-faire assez long à acquérir, mais le résultat final est de bonne qualité. Une technique industrielle appelée *powder blasting* permet de façonner des trous dans une telle épaisseur de verre, mais elle nécessite un appareillage bien particulier [203, 204]. La plaque de verre ainsi percée est recouverte ensuite d'une couche de SU-8 3050 (mêmes paramètres que les parois des canaux voir *Tableau III-3*). De la même façon que pour le collage de film de SU-8, nous soumettons le dispositif et la plaque de verre à un plasma O2 (200W, 0,1mbar, 3 min), puis nous positionnons le tout dans la machine à collage de substrat. Le substrat étant très rigide nous augmentons la force de pression à 700 N, tout en laissant la température à ~65°C, ceci pendant 10 min. Finalement, il ne reste plus qu'à insoler et faire recuire le tout pour finaliser le collage. Notons que le résultat final de collage entre la plaque de verre et l'échantillon n'est pas aussi bon que celui obtenu avec un film de SU-8. En effet, on retrouve souvent des zones au centre de la plaque de verre non collée du au fait que la surface de l'échantillon ne soit pas complètement plate (voir *Figure III-20-3*). Ceci ne pose en général aucun problème, car les canaux sont déjà bien scellés par le film de SU-8, seules les zones d'entrée et de sortie des canaux sont sensibles à ce problème.

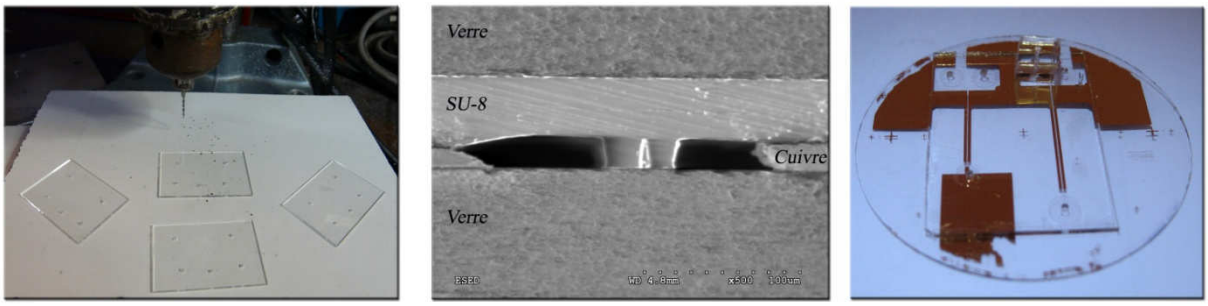

Figure III-21 : À gauche, outillage et lames de verre percées. Au centre, vue en coupe au MEB de la structure Washizu, on distingue les deux canaux, les électrodes épaisses et la paroi isolante centrale. À droite, photo d'un microsystème recouvert de sa plaque de verre.

7. Connectique et tests hydrauliques

Pour transformer notre dispositif en un microsystème prêt à l'emploi, il ne reste plus qu'à faire les connexions électriques et fluidiques. Pour les connectiques électriques, nous venons simplement souder les fils sur les différents plots prévus à cet effet. Il faut toutefois faire attention de ne pas sublimer le plot en or en appliquant trop longtemps le fer à souder. Il est donc recommandé d'étamer avant, les fils à souder. Pour la connectique fluidique, nous préparons plusieurs supports en PDMS que nous transperçons de part en part. Ensuite, nous les collons sur la plaque en verre via un plasma O2 (30 W, 30 s). Une fois fait, on peut aisément enfoncer des capillaires dans ces blocs de PDMS et injecter ou récupérer la solution voulue. Pour les différents tests hydrauliques, voir *Figure III-22*.

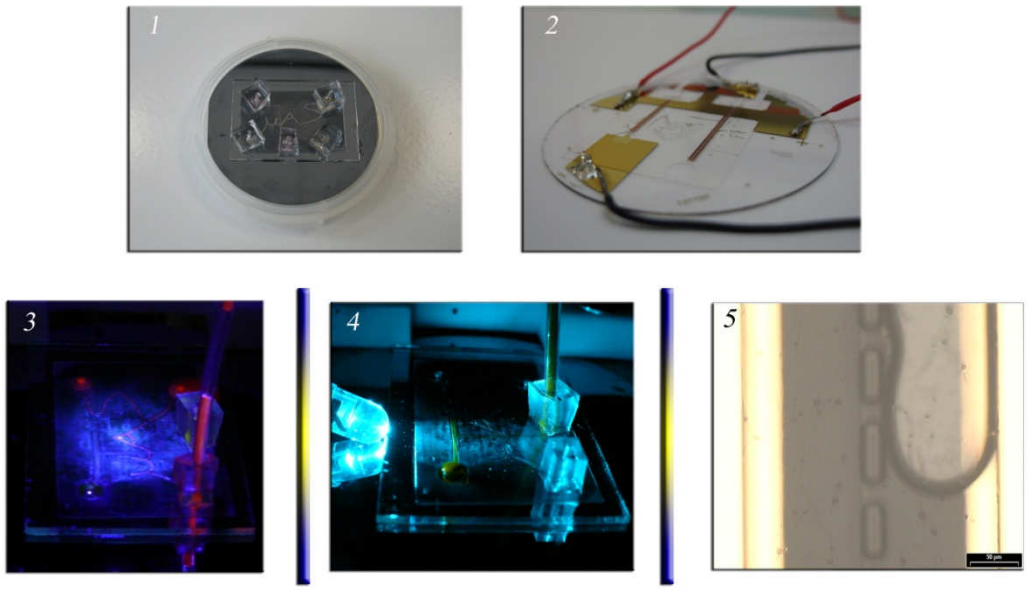

Figure III-22 : 1) Dispositif finalisé à deux niveaux de canaux avec ses plots de PDMS. 2) Dispositif avec des canaux non scellés prêt à l'expérimentation électrique avec les différents fils soudés. 3) Injection de DCM (marqueur fluorescent rose) dans le canal '*µAS*'. 4) Injection d'Éosine (marqueur fluorescent jaune) dans le second niveau, canal en forme de 'T'. 5) Présence d'une bulle d'air dans un dispositif de type Washizu rempli d'eau.

8. Conclusion

De part leur finesse les microsystèmes nécessitent de travailler dans un espace épuré et avec des machines dédiées à une telle résolution. Cet espace est communément appelé salle blanche ou *clean room*. Cependant, la première étape de fabrication ne commence pas dans ce lieu, mais au bureau à dessiner les différents masques. Les masques vont permettre de retranscrire une image sur l'échantillon via une résine photosensible. D'ailleurs, pour réaliser notre dispositif ce n'est pas moins de quatre niveaux de masquage qui seront nécessaires. Une fois les dessins des masques finalisés, plusieurs techniques de masques s'offrent à nous selon un rapport coût/résolution à définir. Dès que les masques sont faits nous pouvons à proprement dit commencer la fabrication de notre dispositif. La première étape consiste à élaborer le réseau d'électrodes en employant la technique de *lift-off*, on obtient ainsi

rapidement des électrodes fines composées d'une sous-couche de titane et d'une couche d'or. La deuxième étape demande la mise en place d'un moule pour permettre le dépôt électrolytique de cuivre pour réaliser des électrodes épaisses de cuivre aux extrémités des canaux. Une fois le moule détruit, nous passons à la troisième étape basée sur l'emploi de la résine SU-8. Grâce à cette résine, nous allons isoler les électrodes et définir les parois de nos canaux. Dans le cas où notre dispositif est équipé d'électrodes épaisses, une étape de compression est nécessaire pour aplanir la surface de la résine. Remarquons qu'à ce niveau d'élaboration, notre dispositif est déjà prêt à être employé pour des expérimentations de DEP ou d'électrofusion. Si l'on continue le procédé, vient alors la cinquième étape où nous allons successivement sceller les canaux avec un film mince de SU-8 puis avec un substrat de verre percé. Il ne reste finalement plus qu'à souder les fils électriques et à coller des plots de PDMS pour que notre microsystème soit totalement opérationnel. Nous avons donc réussi à mettre au point un protocole qui en une semaine permet de fabriquer des microsystèmes comportant des électrodes épaisses ou fines, le tout parfaitement intégré dans des canaux fluidiques structurés et pouvant être développés sur plusieurs niveaux [202]. Toutefois, notons que d'un point de vue technique, il reste encore à finaliser le procédé de collage de substrats durs pour avoir une surface entièrement collée et ensuite caractériser sa force d'adhésion. Pour l'instant, les seules informations que nous avons collectées sont : que ce collage est plus résistant que le collage PDMS/verre et qu'il résiste à une découpe à la scie.

D. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons fait tout le cheminement de la conception à la réalisation d'un microsystème. Tout commence avec une idée de structure que nous soumettons à un logiciel de simulation pour confirmer son intérêt et tenter de l'optimiser. Une fois le design de la structure choisie, nous passons à sa fabrication. Pour cela, il nous aura fallu plus de deux ans de travail pour acquérir le savoir-faire existant et mettre au point de nouveaux procédés pour réaliser en tout point la structure souhaitée au départ. Il nous reste maintenant à mettre nos différents dispositifs (sans capot et avec capot) à l'épreuve de l'expérimentation biologique afin de prouver leur efficacité et leur robustesse.

IV. Chapitre IV, Expérimentation biologique

A. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons vu toutes les étapes de fabrication d'un microsystème équipé de canaux structurés et d'un réseau d'électrodes. Toutefois, la fabrication du microdispositif complet est longue et incertaine. Pour les premières expériences biologiques, nous avons donc décidé d'utiliser des dispositifs non finalisés, mais comportant les structures les plus importantes, c'est-à-dire les électrodes et les parois des canaux. Un tel dispositif est certes inadéquat pour une expérimentation fluidique, mais il se prête parfaitement à des tests de DEP et d'électrofusion. De plus, ce dispositif a l'avantage d'être facile à manipuler et à nettoyer ce qui permet de réaliser rapidement un grand nombre d'expérimentations. Dans le cadre de nos travaux, nous avons donc principalement travaillé avec ce type de dispositif. Pour les expérimentations fluidiques, celles-ci étant tributaires de la technologie de scellement des canaux, seules quelques expériences ont été réalisées en fin de thèse. Un autre paramètre important de nos systèmes est l'architecture. Chaque échantillon comprend deux dispositifs : l'un avec une architecture dite Washizu et l'autre dite à trois canaux. Dans la suite de ce chapitre, nous verrons que la totalité des expérimentations s'est faite avec la structure dite Washizu. Si la caractérisation biologique de la structure trois canaux a été reportée, cela est dû principalement à un problème d'observation. En effet, cette structure est équipée d'une électrode centrale qui empêche une observation par microscope à transmission. Or, les expériences portant sur la manipulation de cellules cancéreuses se font dans un laboratoire de biologie habilité (P1 ou P2) et l'équipement de prédilection des biologistes pour l'observation est le microscope à transmission. Notre laboratoire d'accueil ne faisant pas exception, le microscope était donc de ce type.

Nos premières expériences se sont focalisées sur le phénomène de DEP, le but étant de mettre en place un protocole expérimental pour notre microsystème et de valider nos simulations de cartographie de champ électrique. Une fois familiarisés avec l'emploi de la DEP, nous avons commencé à appliquer des pics de tension, ce qui nous a permis d'observer les premières fusions de cellules. Enfin, les premiers dispositifs scellés ayant commencé à sortir de salle blanche, nous avons pu tester l'action de la DEP sur des cellules soumises à un flux. Dans ce chapitre, nous reprendrons simplement cet ordre chronologique pour présenter nos différents résultats expérimentaux.

B. Matériels et Méthodes

1. Introduction

Les expériences décrites dans cette section ont été réalisées au sein de l'équipe de mon co-directeur de thèse (UMR 8121). Cette équipe a mis à ma disposition l'ensemble du matériel biologique, optique et électronique nécessaire à mes expérimentations. J'ai aussi été formé à toutes les techniques de base pour utiliser des cellules (culture, préparation de milieu…). Tout ceci m'a permis de mettre rapidement en place un protocole d'expérimentation pour la DEP et l'électrofusion.

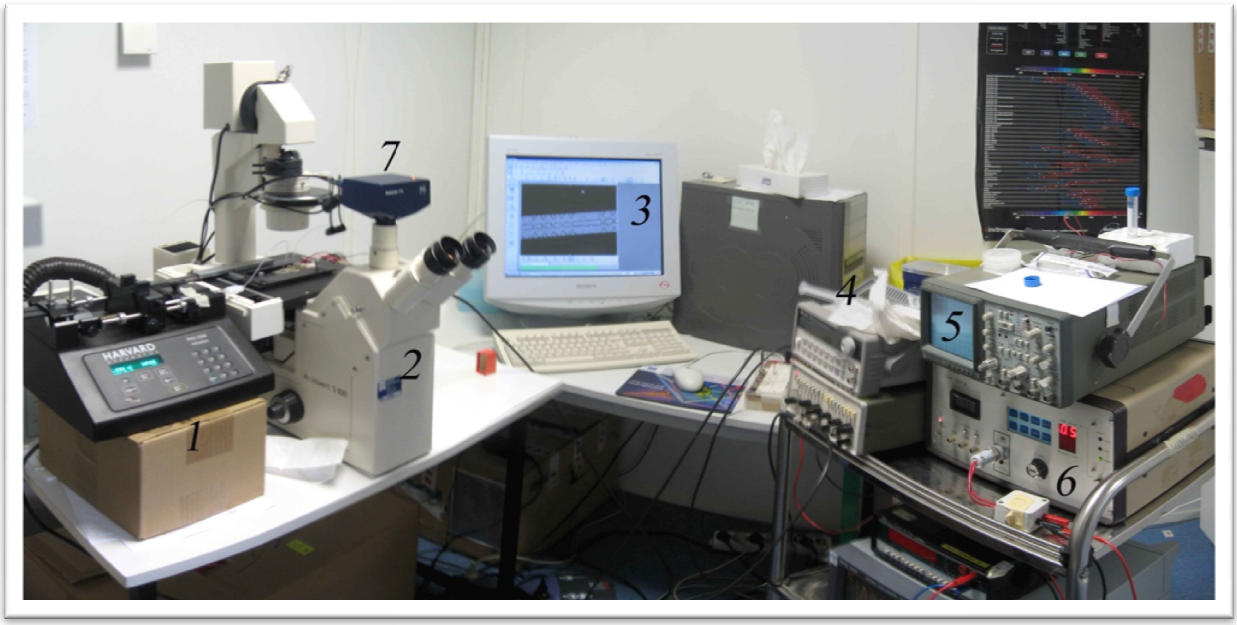

Figure IV-1 : Photo panoramique de la plateforme mise en place pour l'électrofusion. 1) Pousse seringues 2) Microscope à transmission et à optique inversée 3) Ordinateur pour gérer les photos et les flux vidéos 4) Générateur Basses Fréquences (GBF) 5) Oscilloscope 6) Pulseur 7) Camera.

2. Cellules et milieu

Deux types de cellules adhérentes ont été utilisés au cours de ces expériences. La première est une lignée cellulaire cancéreuse de poumon de hamster chinois, dénommé DC-3F. Cette lignée étant employée en routine dans le laboratoire, elle a donc servi aux premières expérimentations portant sur la DEP. Pour les expériences d'électrofusion, nous avons changé de lignée cellulaire sur les conseils de Mr Lluis Mir. Cette seconde lignée cancéreuse est issue d'un mélanome de souris et porte le nom de B16. Ces cellules ont la particularité d'avoir une matrice extracellulaire limitée ce qui explique leur facilitée à métastaser. Dans le cadre de l'électrofusion, cette caractéristique pourrait favoriser la mise en contact des membranes et rendre ainsi les cellules B16 plus propices à la fusion.

Dans le chapitre 2, nous avons étudié les différents milieux utilisés pour les expériences d'électrofusion. De cette étude, nous avons conclu que la solution la plus adaptée était celle issue des travaux de Zimmermann. Notons qu'il existe une version commerciale de

cette solution (société Eppendorf). Ce milieu est une solution aqueuse comprenant des ions acétate de magnésium (0.5mM) et de calcium (0.1mM), de l'albumine (1mg/ml) et du sorbitol (~90mM). La particularité de ce milieu est d'avoir une faible conductivité (~100µS/cm) et d'être hypotonique (~90mOsm). Cette dernière propriété, ajoutée à la présence de sorbitol, permet de faire grossir artificiellement les cellules (voir *Figure IV-2*). Cette augmentation du diamètre des cellules est d'environ deux fois celle d'une cellule présente dans une solution isotonique (~300mOsm).

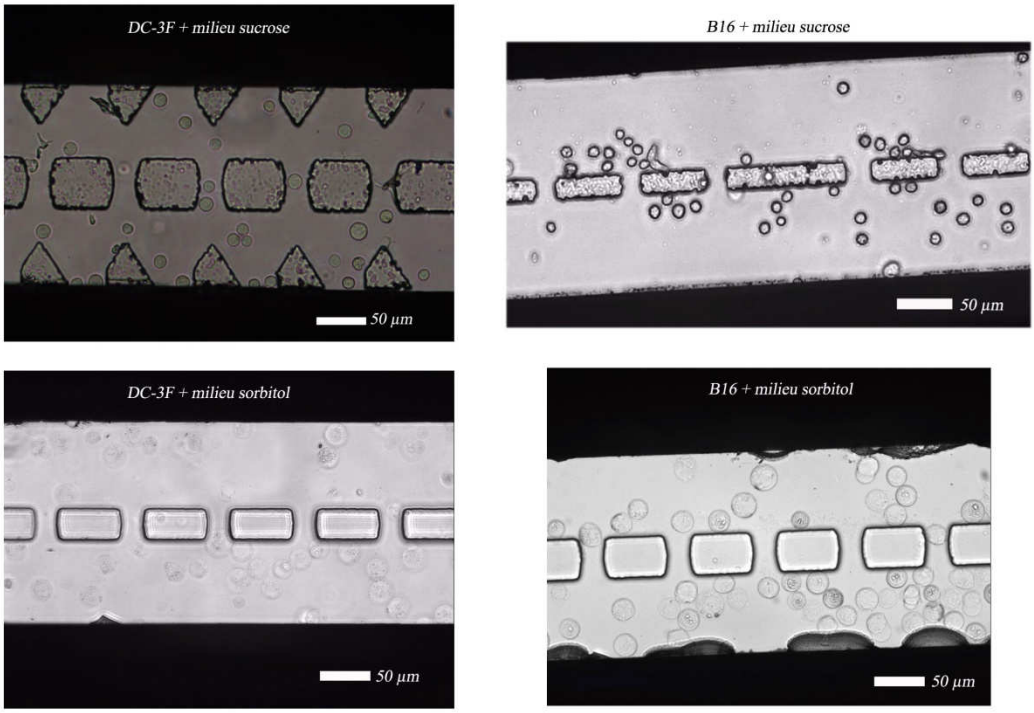

Figure IV-2 : Photos représentant les cellules DC-3F et B16 mises en présence d'une solution hypotonique contenant du sucrose (photos du haut) ou du sorbitol (photo du bas). On constate bien le grossissement des cellules en présence de sorbitol.

3. Microsystèmes

Dans le chapitre 3, nous avons réalisé deux types de microsystèmes. L'un est une version non finalisée, avec des canaux non scellés. Dans ce cas, l'utilisation se fait de la façon suivante : nous disposons tout d'abord une goutte de 100 µl de milieu contenant les cellules dans une des entrées ou des sorties du système. Puis, nous appliquons sur la goutte et l'ensemble du dispositif une fine lamelle de verre. Ainsi, nous remplissons les canaux et préservons le liquide de l'évaporation. Pour le système finalisé, il suffit de relier les différents capillaires aux entrées et sorties, puis d'injecter le milieu pour commencer les expériences. Une fois les expérimentations finies, les systèmes se nettoient à l'aide d'eau distillée ou si cela s'avère insuffisant à l'aide d'eau de javel pure ou diluée. Ensuite, il suffit de les laisser sécher à l'air libre. Notons que les structures en SU-8 ne supportent pas une atmosphère saturée en eau, comme celle présente dans les incubateurs (risque de décollement).

Les expériences de placement et de fusion cellulaire ont été effectuées sur la structure Washizu pour des raisons évoquées précédemment. Cette structure est répétée un grand

nombre de fois en faisant varier les dimensions. Ainsi, la largeur de l'isolant centrale (*l*) évolue entre 10, 20, 30, 40 ou 50 µm (voir *Figure IV-3*). Par contre, l'ouverture entre les isolant (*e*) et l'écart inter-électrodes (*L*) sont respectivement fixés à 22 µm et 200 µm (voir *Figure IV-3*).

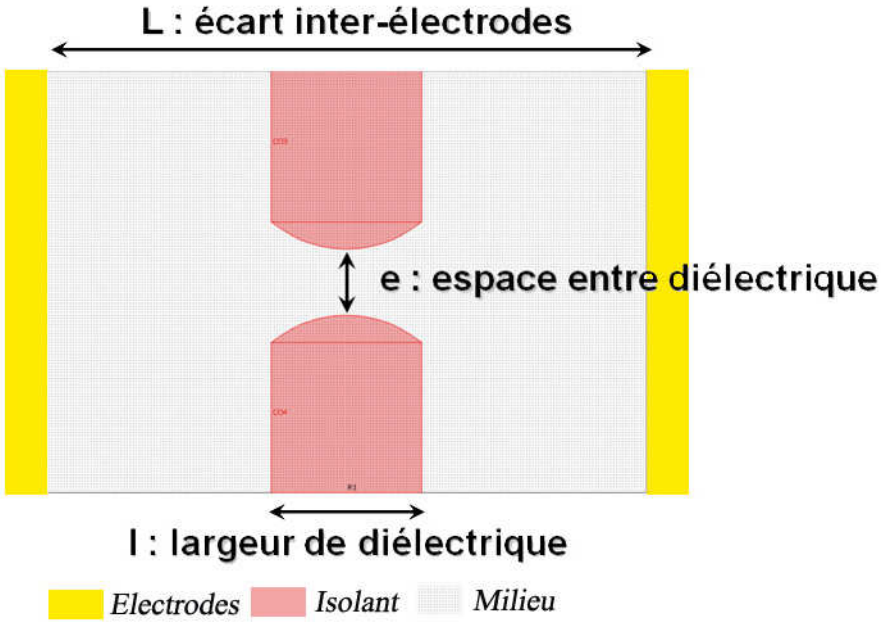

Figure IV-3 : Schéma de la structure Washizu avec les différents paramètres la caractérisant.

4. Électronique et microscope

Dans le cadre de nos expérimentations, deux types de signaux électriques sont utilisés : l'un pour la DEP et l'autre pour l'électrofusion. Le premier est un signal sinusoïdal de faible amplitude et ayant une fréquence variant entre 10 kHz et 10MHz. Pour le délivrer, nous utilisons un simple générateur basses fréquences (1hz-10MHz, V_{max}=10V, TOPWARD TGF-4613). Notons que pendant une courte période nous avons eu à notre disposition un GBF numérique permettant de monter jusqu'à 80MHz et de faire de la modulation de fréquence (HP 33120A). Le deuxième type de signal correspond à un pic de tension de forte amplitude et de courte durée (<40V, ~80 µs). Pour le générer, nous employons un pulseur dédié à l'électrochimiothérapie (TRX GHT 1287B). Celui-ci peut fournir plusieurs pulses de tension allant d'environ 10V à 1kV et d'une durée variant de la microseconde à la seconde. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, le protocole expérimental consiste à appliquer le premier type de signal (DEP), puis d'envoyer les pulses de tension (électrofusion) pour enfin rétablir la DEP. Lors de nos premières expérimentations, nous étions obligés de débrancher le GBF du dispositif pour envoyer les pics de tension. Cette manipulation était nécessaire pour protéger le GBF. Or, en procédant ainsi, nous relâchions pendant quelques secondes la DEP ce qui suffisait aux cellules pour se décoller l'une de l'autre. Pour remédier à ce problème, nous avons réalisé un additionneur (voir *Figure IV-4*). Celui-ci a été conçu de telle façon à protéger le GBF des pics de tension et de conserver en permanence la DEP. Signalons qu'en additionnant les signaux nous obtenons lors de l'envoi d'un pic de tension un signal sinusoïdal couplé à un créneau de forte amplitude et non un simple créneau.

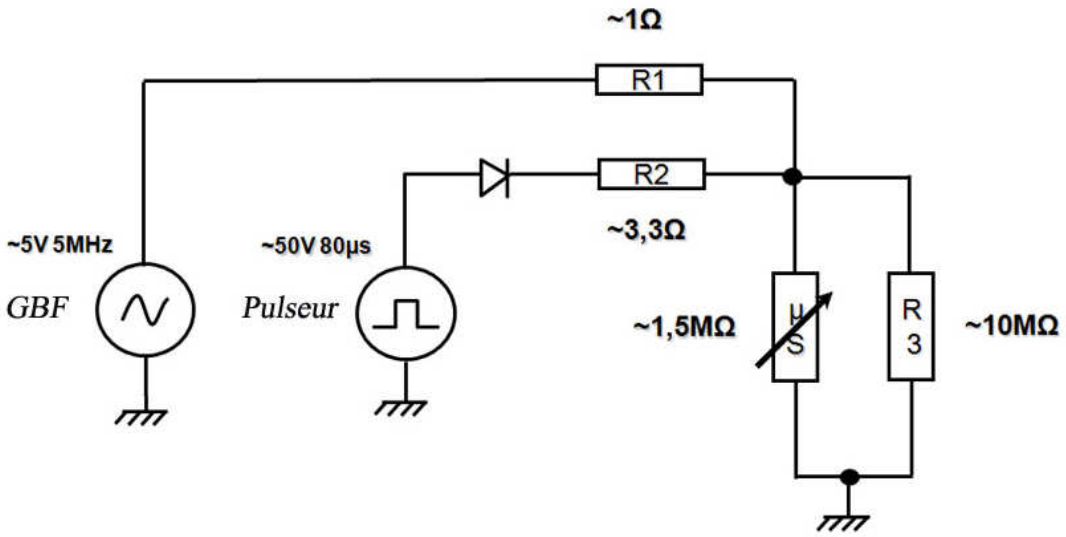

Figure IV-4 : Schéma électrique de l'additionneur de signaux.

En ce qui concerne le dispositif optique, nous avons à notre disposition un microscope à transmission et optique inversée (Zeiss Axiovert S100) équipé d'une caméra CCD (Axiolam HRC Zeiss, voir *Figure IV-1*). Ce microscope dispose de deux sources de lumière : l'une fournit par une ampoule halogène (lumière blanche) et l'autre par une ampoule à mercure utilisée pour la fluorescence. La majorité des acquisitions photos ou vidéos sont faites en noir et blanc et en pleine résolution (1400x1030 pixels). Dans ces conditions, la caméra est capable de fournir au maximum, un peu moins de deux images par seconde. En réduisant la fenêtre d'acquisition, il est toutefois possible de monter à un peu plus de 3 images par seconde.

5. Conclusion

Connaissant maintenant les outils et les protocoles expérimentaux, nous pouvons passer à l'étude détaillée des résultats.

C. Résultats expérimentaux sur la diélectrophorèse

1. Introduction

Nos premières observations ont consisté à étudier en détail où se plaçaient les cellules sous l'action de la DEP, pour comparer avec les simulations de cartographie de champ électrique réalisées au cours du chapitre 3. Durant ces simulations, nous avions aussi remarqué qu'une variation des formes des parois centrales avait des conséquences sur la cartographie de champ. Notre système étant équipé de structures ayant une largeur de parois centrales différentes, nous avons entrepris d'étudier les répercussions de ces variations sur la DEPp. En parallèle, nous avons analysé l'incidence de la variation de la fréquence sur le phénomène de diélectrophorèse pour les deux types cellulaires. Examinons à présent ces différents résultats en détail.

2. Placement des cellules par DEP

Lorsque l'on regarde la simulation du champ électrique dans la structure Washizu, trois zones se dégagent (voir *Figure IV-5*):

- La première se situe au niveau de l'ouverture où est établi le maximum de champ (*1*). Elle devra ainsi attirer les cellules lorsque nous appliquerons la DEPp.

- La seconde localisée aux bords des parois isolantes est caractérisée par la présence de minima de champ (*2*). Elle sera donc propice pour capter les cellules par DEPn.

- La troisième positionnée tout le long des bords des électrodes se distingue par un maximum de champ local (*3*). Lors de la DEPp, les cellules à proximité pourront de ce fait être attirées vers cette zone.

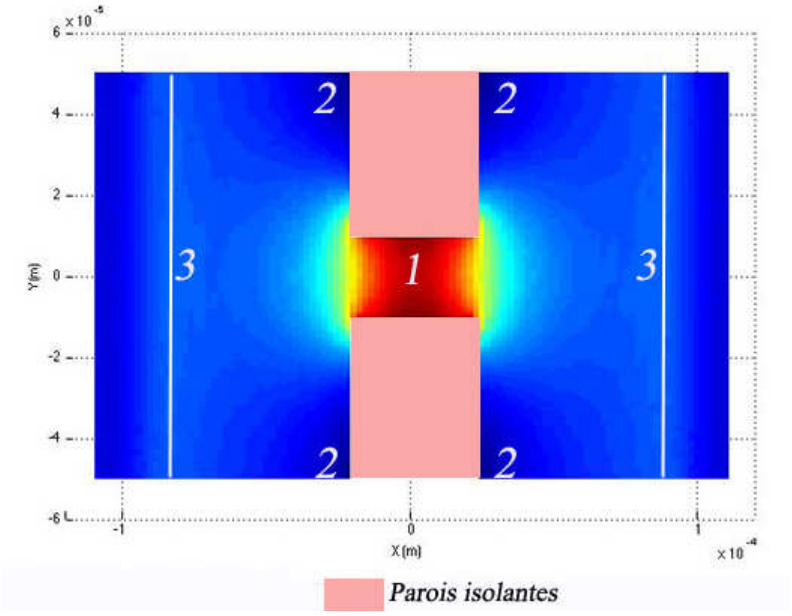

Figure IV-5 : Cartographie du champ électrique pour une structure Washizu (vue de haut) mettant en évidence 3 zones d'intérêts : (1) maximum de champ (2) minimum de champ (3) maximum local au bout des électrodes (trait blanc).

Pour confronter ces résultats théoriques, nous avons soumis des cellules de type B16 dans une solution hypotonique contenant du sorbitol, à un champ électrique de haute fréquence (5MHz) pour mettre en évidence la DEPp et inversement de basse fréquence (50kHz) pour observer la DEPn. Comme nous pouvons le constater sur les photos de la

Figure IV-6, les expériences nous confirment les interprétations issues des cartographies de champs simulées. On retrouve ainsi les cellules dans les zones prédites. Dans le cas de la DEPn les cellules vont se coller aux parois des structures isolantes (voir *Figure IV-6-1*), à l'inverse pour la DEPp les cellules se placent dans les ouvertures et au bord des électrodes (voir *Figure IV-6-2*). Toutefois, on retrouve dans la *Figure IV-6-3* un phénomène que nous avons abordé dans le chapitre 3 et que nos simulations n'avaient pas prédit : la formation de *grappes* de cellules, conséquence de l'attraction entre dipôles induits (particulièrement visibles au niveau des électrodes).

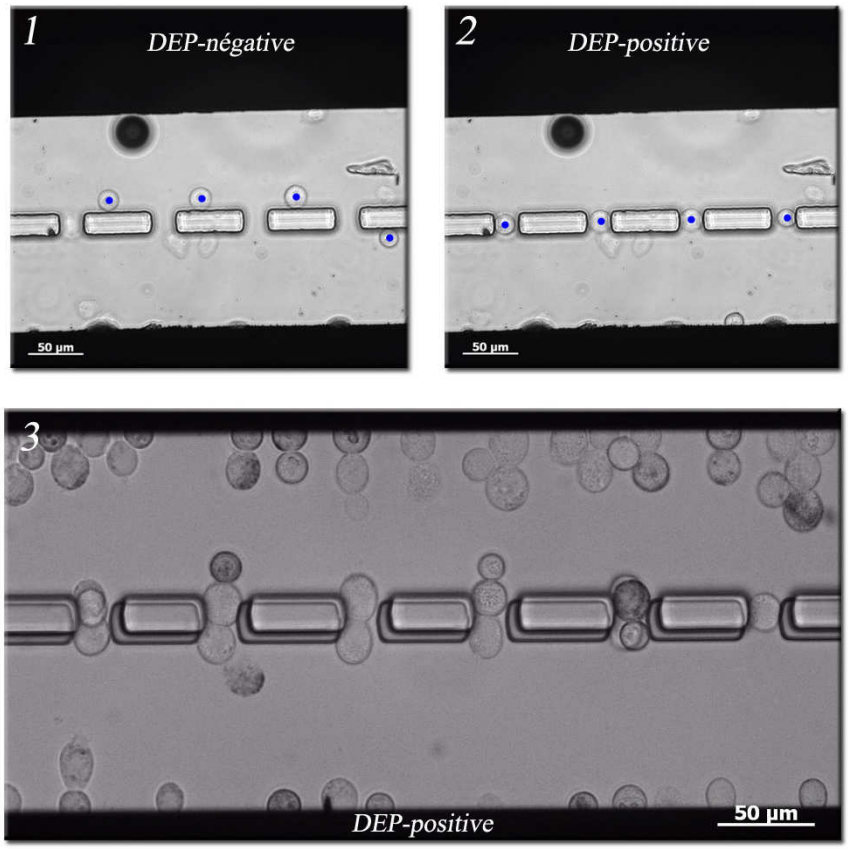

Figure IV-6 : Expérience de diélectrophorèse. 1) DEP négative visible sur 4 cellules (marquées en bleu). 2) DEP positive sur les 4 mêmes cellules. 3) DEP positive avec placement de cellules au niveau des ouvertures et des électrodes, mise en évidence du phénomène de *grappe*.

3. Étude du comportement diélectrophorétique des cellules

Nous savons à présent interpréter un placement des cellules comme étant liés à l'action de la DEPp ou de la DEPn. Nous pouvons donc en faisant varier la fréquence du champ électrique retrouver grossièrement les variations du facteur de Clausius-Mossotti (voir chapitre 2). Nous avons réalisé ce type d'étude dans nos premières expériences avec les cellules DC-3F et B16 dans une solution hypotonique avec du saccharose, puis seulement avec les cellules B16 dans une solution hypotonique avec du sorbitol (voir *Tableau IV-1*). Notons que pour ces expériences les solutions ont une conductivité comprise entre 50 et 100 µS/cm. On constate que pour une même solution et une même fréquence, deux types cellulaires ont un comportement diélectrophorétique différent. Ceci s'explique par les

propriétés électriques et morphologiques propres à chaque type cellulaire. C'est d'ailleurs cette disparité de réponse à la DEP qui est exploitée pour trier des familles de cellules différentes. On remarque aussi une divergence importante de la réponse diélectrophorétique entre une cellule B16 immergée dans une solution de saccharose et cette même cellule placée dans une solution de sorbitol. Ceci est du à la différence de taille. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les cellules mises dans une solution hypotonique contenant du sorbitol sont environ deux fois plus grosses que dans une solution hypotonique contenant du sucrose. Cette augmentation importante de la taille va favoriser le passage du champ électrique dans le milieu intracellulaire (cas d'un milieu intracellulaire plus conducteur que la solution), d'où une réponse à la DEPp plus tôt en basses fréquences (voir aussi *Figure IV-7*).

Cellules	Solution	10kHz	100kHz	1MHz	2MHz	12MHz	20MHz
DC-3F	saccharose	DEP-n	DEP-n	Non défini	DEP-p	DEP-p	-
B16	saccharose	DEP-n	DEP-n	DEP-n	DEP-n	DEP-n	-
B16	sorbitol	DEP-n	DEP-n	-	DEP-p	DEP-p	DEP-p

Tableau IV-1 : Étude de la force exercée sur les cellules, selon la fréquence du champ électrique.

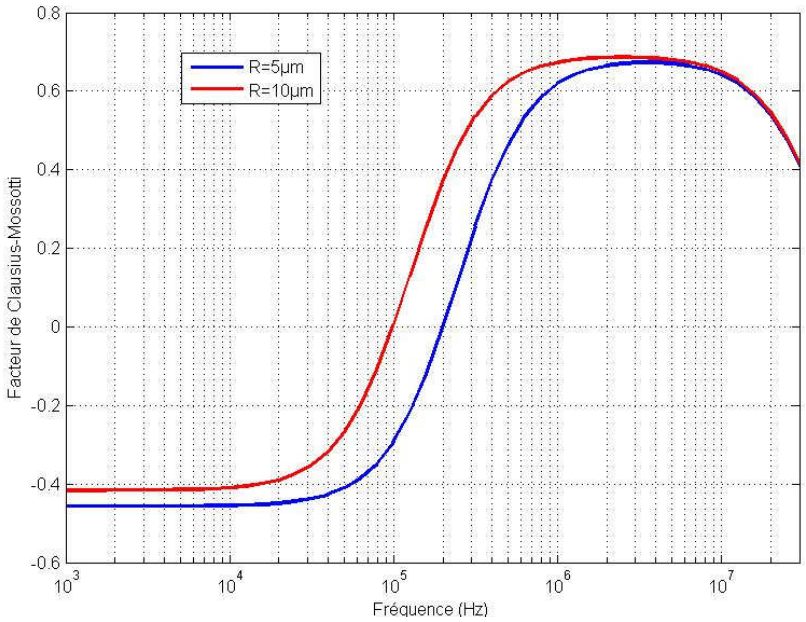

Figure IV-7 : Tracé du spectre diélectrophorétique d'une cellule dans le cas hypothétique où elle mesure 5µm ou 10µm de rayon. On suppose que la conductivité et la permittivité de la cellule restent constantes.

4. Étude de la variation de la largeur des parois centrales sur la force de DEP

Pour réaliser cette étude, nous avons décidé d'analyser les variations de vitesse d'une cellule soumise à la DEPp. En effet, dans le chapitre 2 *Equation III-9*, nous avons montré que la force de DEP dépend en première approximation de la vitesse de la cellule à un coefficient près (la masse étant minime on a $m\vec{a} \approx 0$ et la force de frottement visqueux vaut $\overrightarrow{F_{Drag}} = k\vec{V}$). Dans le cadre de nos expérimentations, la vitesse devrait donc varier comme la force de DEP d'autant que l'on suppose que la cellule est statique ou a une faible vitesse avant

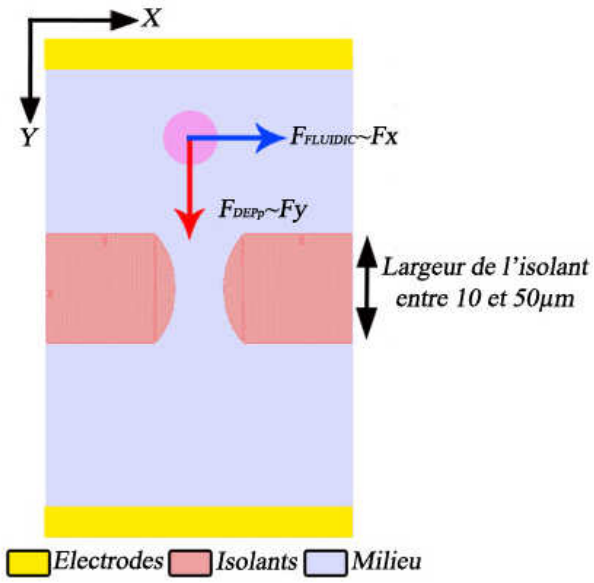

Figure IV-9 : Schéma de la structure avec les axes choisis

d'appliquer le champ électrique. De plus, nous nous sommes intéressés uniquement à la vitesse selon l'axe perpendiculaire à celui des parois centrales. C'est-à-dire que nous nous concentrons sur les forces qui *poussent* la cellule dans l'ouverture. Dans notre cas, c'est principalement la force de DEPp qui est selon cet axe, la force hydrodynamique étant si elle existe, principalement selon l'axe parallèle des parois centrales (dans le sens des canaux, voir *Figure IV-9*).

Pour obtenir les variations de vitesse de la cellule, nous enregistrons à l'aide de la caméra, des courtes vidéos du phénomène de DEP. Ensuite, nous décomposons cette vidéo en une série de photos, ce qui nous permet de connaitre la position de la cellule à un temps donné. Pour savoir le temps écoulé entre deux photos, nous supposons que la caméra prend les photos de façon régulière. Ainsi, connaissant le nombre de photos composant la vidéo et la durée de celle-ci, nous en déduisons le temps entre deux photos. En combinant le chemin parcouru par la cellule entre deux photos et le temps écoulé, nous en déduisons sa vitesse. Enfin, pour comparer les variations de vitesse entre des structures de largeurs différentes nous avons conservé les mêmes paramètres électriques, soit une amplitude de 5 V et une fréquence de 5 MHz. Il en est de même pour la solution hypotonique contenant du sorbitol qui était maintenue à environ 90 µS/cm, ainsi que pour les cellules qui étaient toutes de type B16. En maintenant ces paramètres, nous avons récupéré et analysé plusieurs vidéos. Ce qui nous a permis de regrouper la vitesse moyenne d'au moins trois cellules pour les différentes tailles de structure (voir *Figure IV-8*).

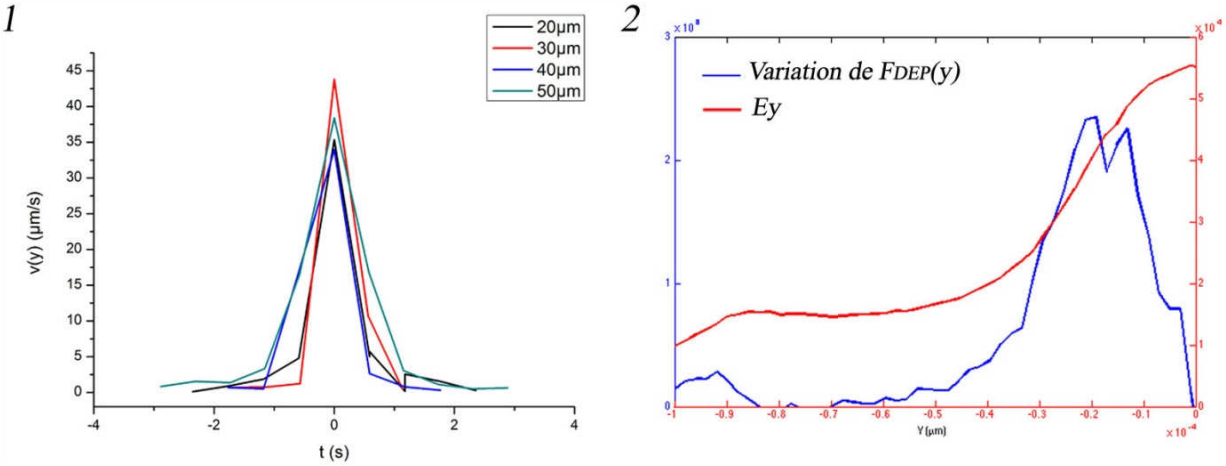

Figure IV-8 : 1) étude de la vitesse de cellules soumises à la force de DEPp pour différentes largeurs de parois centrales. La vitesse donnée pour chaque structure est une moyenne de la vitesse d'au moins trois cellules. Pour faciliter la lecture du graphe nous avons centré la vitesse maximale de toutes les courbes à t=0. 2) : variations du champ électrique (en rouge) partant d'une électrode pour arriver au milieu de l'ouverture (y=0), issues de nos simulations. De ce champ nous déduisons la force de DEPp à un facteur près. On distingue bien l'augmentation puis la diminution.

En analysant le graphe issu de la *Figure IV-8*-1, on retrouve un profil de vitesse commun à toutes les structures qui commence par une augmentation de la vitesse lorsque la cellule est *happée* par la force de DEPp, puis une décélération au fur et à mesure que la force de DEPp diminue, pour finir par s'immobiliser au centre de l'ouverture. Ces résultats sont d'ailleurs en concordance avec les simulations de la force de DEPp, on retrouve en effet ces phases d'augmentation et de diminution de la force de DEPp. Par contre, si l'on regarde les variations de vitesse d'une structure à l'autre, on s'aperçoit qu'il est très difficile de tirer une information. Au chapitre 3, nos simulations avaient prédit une force de DEPp plus importante pour la structure à 20 µm, puis de plus de plus en plus faible pour les structures plus larges. Pour expliquer en partie ces résultats incohérents, nous devons rapprocher la vitesse d'acquisition des images et la vitesse de déplacement des cellules suite à l'action de la force de DEPp. Dans notre cas, la vitesse est très rapide et la distance à parcourir très petite, or l'acquisition des photos est limitée à moins de 2 images par secondes. Nous nous retrouvons alors avec trop peu d'images (donc trop peu de points) pour différencier la vitesse d'une structure à l'autre. Pour remédier à ce problème, nous avons augmenté la fréquence du champ électrique à 20 MHz pour diminuer le facteur de Clausius-Mossotti (on peut s'inspirer de la *Figure IV-7*) et ainsi limiter la force de DEPp (résultats *Figure IV-10*).

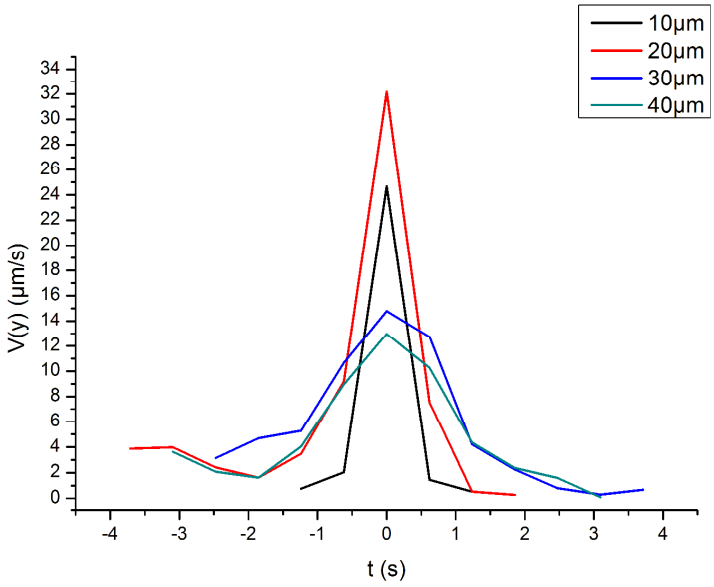

Figure IV-10 : étude de la vitesse de cellules soumises à la force de DEPp pour différentes largeurs de parois centrales (f=20MHz). La vitesse donnée pour chaque structure est une moyenne de la vitesse d'au moins trois cellules

Avec cette nouvelle condition, on observe que la vitesse a largement diminué. Ce qui nous permet cette fois-ci de mieux différencier la vitesse entre les différentes structures. Ces résultats sont proches des études comparatives faites avec les simulations (voir chapitre III structure Washizu). Il parait donc intéressant de continuer d'étudier ce phénomène en collectant plus d'informations. Notons que pour obtenir plus de points, nous pouvons modifier le champ électrique appliqué ou l'osmolarité de la solution pour ainsi diminuer un peu plus la force de DEPp. L'achat d'une caméra rapide peut être aussi une solution à envisager.

5. Conclusion

Au cours de ces expérimentations de diélectrophorèse, nous avons pu observer le placement des cellules dans les zones prédites par nos simulations et cela, aussi bien pour la DEPp que pour la DEPn. Toutefois, lorsque l'on s'intéresse à un phénomène plus fin, comme la variation de la force de DEP à la suite du changement de taille de certaines structures, on constate alors que le rapprochement entre simulations et expérimentations est moins évident et ce malgré quelques premiers résultats encourageants.

D. Résultats expérimentaux sur l'électrofusion

1. Introduction

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu comment manipuler des cellules par DEP. Ce phénomène est relativement simple à mettre en place, une fois que l'on dispose d'une solution faiblement conductrice et d'un microsystème étudié pour cette application. De plus, l'application de la DEP n'étant pas délétère pour les cellules, on peut faire varier les paramètres électriques pendant plusieurs minutes. En revanche, dans le cas d'une expérimentation d'électrofusion, l'expérience ne peut avoir lieu qu'une seule fois, car en appliquant des impulsions de tensions, on modifie de façon importante les propriétés électriques et biologiques de la cellule. De surcroît, l'électrofusion n'est pas un phénomène généralisé à toutes les cellules comme cela se produit pour la DEP, seules les cellules placées dans les zones de maxima de champ ont une chance de fusionner. Ces zones étant espacées et le phénomène de fusion ayant lieu à l'échelle cellulaire, l'observation se fait à fort grossissement (fois 20 ou 40), limitant ainsi l'observation à une dizaine de cellules. Ceci ne facilite pas ainsi l'étude de l'électrofusion. Dans un premier temps nous nous sommes donc assurés que nous étions capables de perméabiliser des cellules contenant un marqueur fluorescent. Une fois ces expériences réussies, nous avons commencé une campagne d'expérimentations pour mettre en évidence l'électrofusion de cellules. Après plus de 200 expériences, l'étude a abouti à l'observation d'une vingtaine de fusions. Nous avons au final regroupé les informations les plus pertinentes pour en tirer les paramètres électriques les plus favorables à l'électrofusion.

2. L'électroperméabilisation

Ces premières expériences ont pour but de prouver la capacité de notre microsystème à électroperméabiliser la membrane des cellules. Pour mettre en évidence ce phénomène, nous avons employé des cellules fluorescentes, suite à l'insertion d'un marqueur : la calcéine. Cette molécule a la particularité de rentrer dans la cellule, mais ne peut en sortir suite à une réaction chimique. Toutefois, si on perméabilise la membrane, celle-ci pourra s'échapper de la cellule et on observera ainsi une chute de la fluorescence de la cellule. Pour provoquer la perméabilisation de la membrane nous avons appliqué des impulsions de tension électrique, ce qui nous a permis de mettre en évidence le phénomène de perte de fluorescence (voir *Figure IV-11*), prouvant théoriquement, l'aptitude de notre dispositif à électrofusionner. Nous avons aussi provoqué l'éclatement de certaines cellules en appliquant des pics de tension

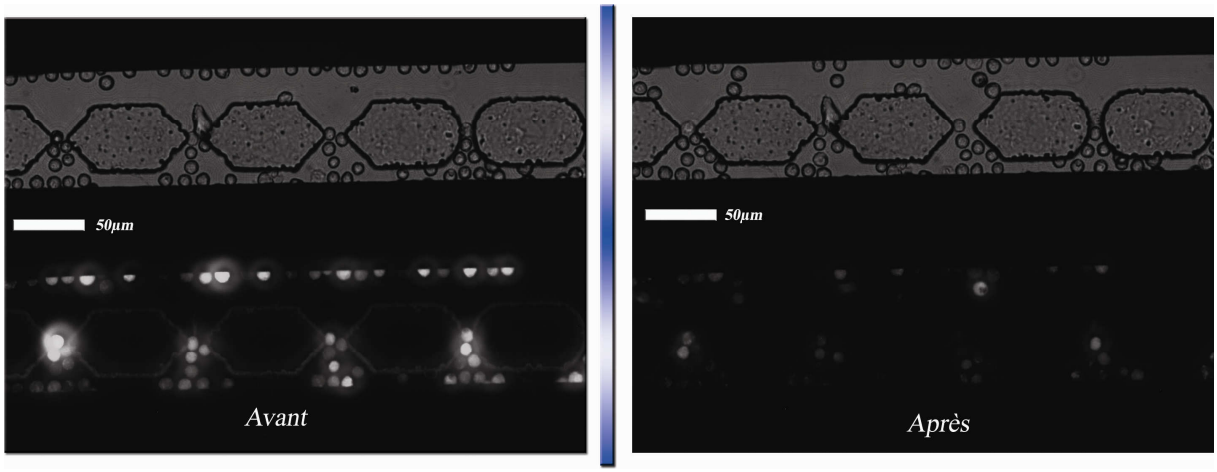

Figure IV-11 : Expérimentation d'électroporation sur des cellules DC-3F marquées par de la calcéine. À gauche : cellules avant application des pulses. À droite : cellules après application de deux pulses de tensions de 100µs et de 20V. On constate une perte importante de la fluorescence des cellules.

élevés (voir *Figure IV-12*), ce qui nous a donné une première approximation de l'amplitude à ne pas dépasser (pour une durée d'impulsion et un nombre de pulsations donné). Ces expériences nous ont aussi permis de mettre en évidence que les parois centrales en SU-8 ne posent aucun problème d'autofluorescence pour une excitation dans le bleu.

3. L'électrofusion

Notre dispositif étant à même de perméabiliser des cellules, nous avons commencé les expérimentations d'électrofusion. Pour ce faire, nous avons employé des cellules B16 immergées dans une solution hypotonique contenant du sorbitol et de conductivité d'environ 100µS/cm. Pour les paramètres électriques, nous avons fixé le temps d'une impulsion à 80 µs et le nombre d'impulsions envoyées à deux (une par seconde). Nous nous sommes ainsi focalisés sur un seul paramètre, la variation de l'amplitude du pulse. Notre protocole expérimental consiste donc à soumettre les cellules à la force de DEPp (5MHz, 5V), pour les placer dans les multiples ouvertures. Ensuite, nous appliquons les deux impulsions de tension, puis nous laissons la force de DEPp active pendant quelques minutes pour garder les cellules en contact. Les observations consistent à prendre une vidéo d'une minute, débutant quelques secondes avant l'envoi des impulsions.

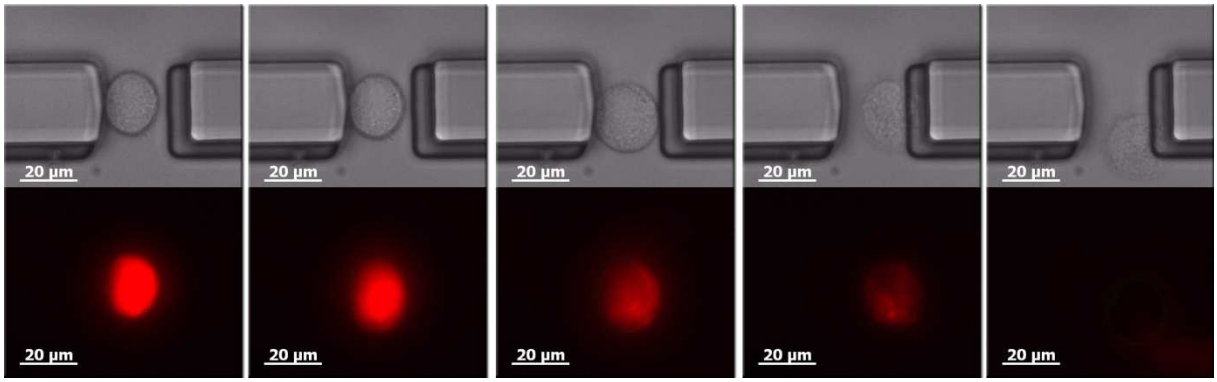

Figure IV-12 : Destruction d'une cellule B16 suite à l'application de deux pulses de tension, de 36V et d'une durée de 80µs chacun. Remarque : les photos de fluorescence sont en fausse couleur.

Les premières séries d'expériences ont mis en évidence quelques phénomènes d'électrofusion (voir *Figure IV-13*). Cependant, dans de nombreux cas il était difficile de conclure ou non à la fusion des membranes cellulaires. Pour remédier à ce problème, nous avons, comme pour mettre en évidence l'électroporation, marqué les cellules avec de la calcéine. Ce marquage permet de mettre en évidence la réaction d'une cellule suite à l'application d'impulsions électriques. Ainsi, on peut discerner nettement sur les photos de fluorescence, si la cellule n'a rien ressenti, si elle est perméabilisée, si elle a fusionné ou enfin, si elle est détruite. Pour aider à la visualisation de la fusion, nous mélangions des cellules marquées avec des cellules non marquées (voir *Figure IV-14*). A noter que même dans le cas où les deux cellules marquées fusionnent, le phénomène reste plus facile à observer que dans le cas où les cellules ne sont pas marquées. Remarquons que la prise d'images par fluorescence demande un temps de pose important, ce qui diminue le nombre d'images par seconde acquises (environ 1 image par seconde, au lieu de 2 ou 3 sans

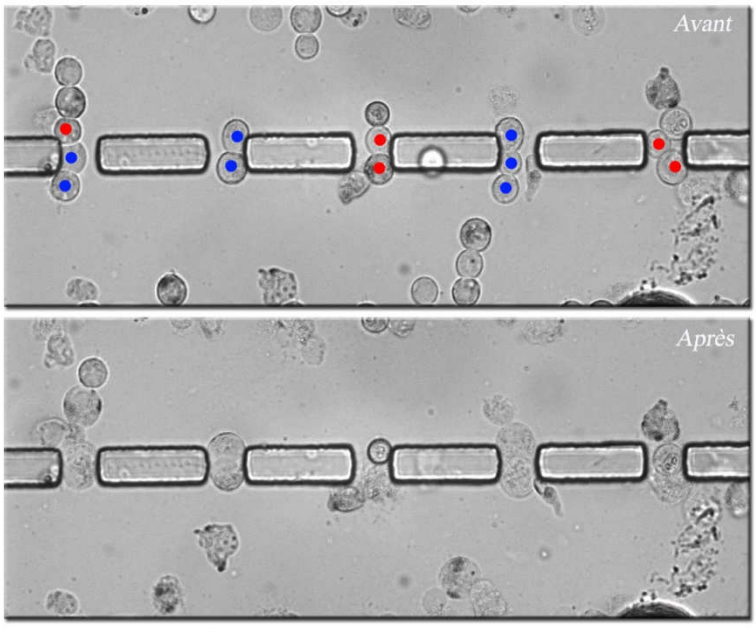

Figure IV-13 : Expérimentation d'électrofusions. En haut : Cellules placées par DEPp. Les cellules marquées d'un point bleu vont fusionner alors que celles marquées d'un point rouge vont être détruites. En bas : 30s après application de deux pulses (80µs, ~25V).

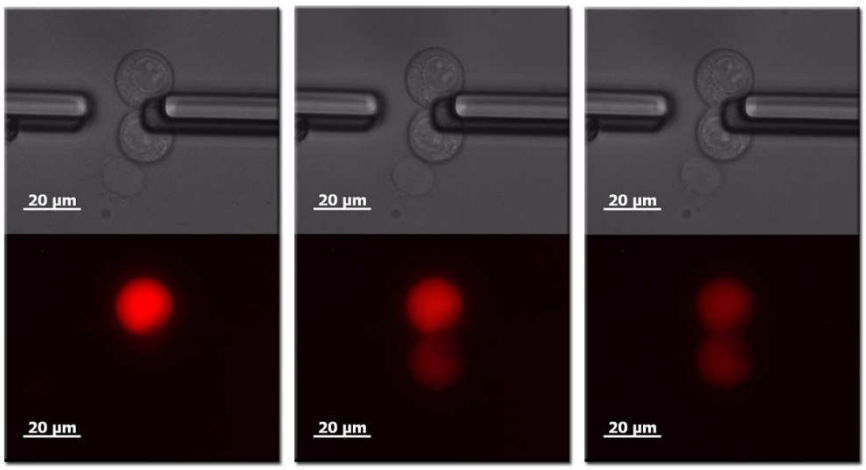

Figure IV-14 : Expérimentation d'électrofusion entre une cellule marquée et une cellule non marquée (2 pulses, 80µs, 30V).

fluorescence).

L'ensemble de ces expérimentations a montré que notre dispositif était adapté à électrofusionner plusieurs cellules en parallèle. De plus, de part son architecture il confirme son aptitude à mettre un petit nombre de cellules en contact, favorisant ainsi la fusion entre seulement deux cellules. Enfin lors des observations nous pouvons zoomer fortement sur un couple de cellules sans perdre trop de luminosité et tout en gardant une bonne résolution, ce qui nous permet d'étudier en détail le phénomène d'électrofusion.

4. Amplitude des impulsions et électrofusion

Précédemment, nous avons vu que seule l'amplitude électrique des impulsions était modifiée d'une expérience à l'autre. La raison était d'accumuler ainsi le maximum d'informations et de déduire quelles étaient les valeurs les plus propices à l'électrofusion. Pour ce faire, nous avons regroupé toutes les expériences réalisées avec un milieu contenant des cellules marquées et non marquées, ce marquage présentant l'avantage de mettre en évidence avec quasi-certitude le phénomène mis en jeux (électroporation, électrofusion, destruction…). Nous avons donc étudié chacune des vidéos en regardant comment réagissaient les cellules présentes dans les ouvertures en fonction de la tension appliquée (voir *Figure IV-15*).

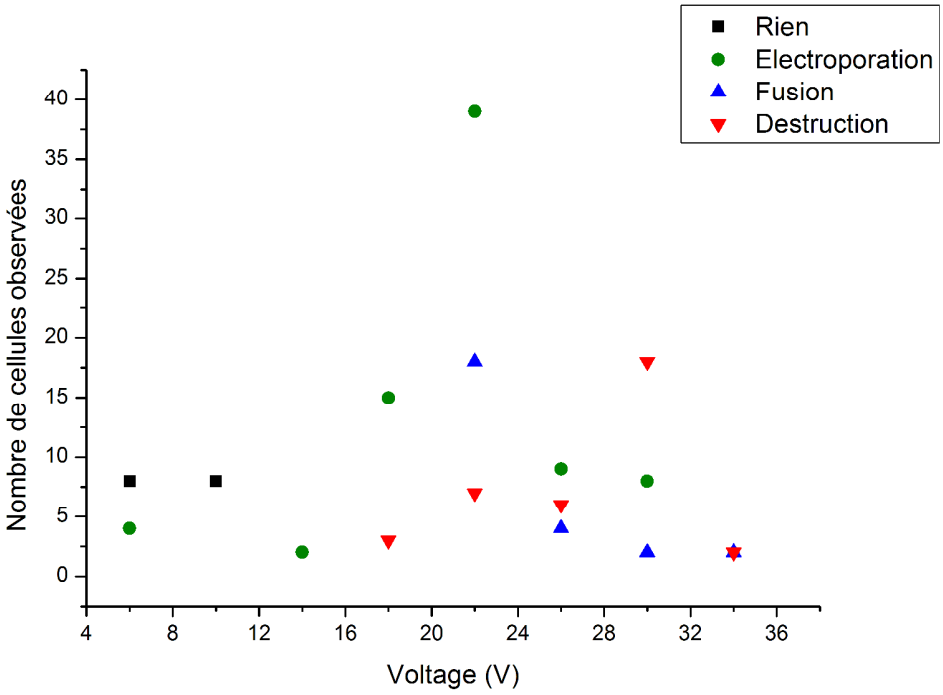

Figure IV-15 : Effet de l'amplitude de la tension électrique sur les cellules placées aux niveaux des ouvertures : pas de réaction (rien), électroporation, fusion ou destruction cellulaire.

Cette étude met en évidence que l'amplitude d'une impulsion de tension la plus adaptée à l'électrofusion est comprise entre 20 et 24V soit l'équivalent d'un champ électrique d'au minimum 1 kV/cm. D'autre part, on note que pour des tensions supérieures à 28 V, les impulsions de tension deviennent fortement délétères pour les cellules B16. Cependant, on constate, comme pour tout phénomène biologique, que si à une tension donnée certaines

cellules fusionnent d'autres seront détruites ou seulement électroporées. Dans la recherche du meilleur compromis, il serait donc intéressant de continuer cette étude, en faisant varier cette fois-ci la durée et le nombre des impulsions.

5. Étude de la fluorescence durant l'électrofusion

Dans le paragraphe précédent, nous avons mis au point un protocole d'électrofusion basé sur l'utilisation d'un milieu comportant des cellules marquées et non marquées. Ce marquage permet de mettre en valeur la fusion entre deux cellules, tout particulièrement quand l'une est marquée et que l'autre non (voir *Figure IV-14*). A l'aide de ces vidéos, nous avons pu en analysant la luminosité image par image, voir comment évoluait la répartition de la calcéine à l'intérieur de cellules ciblées (voir *Figure IV-16*). Ainsi, dans le cas de cette série d'expérience, nous avons suivi tout d'abord la fluorescence de la cellule marquée (A) et de la cellule non marquée (B). Puis, lorsque nous ne pouvons plus les différencier, nous ne mesurons la fluorescence que de l'hybridome (AB traits foncés, remarque : traits clairs somme de A et de B).

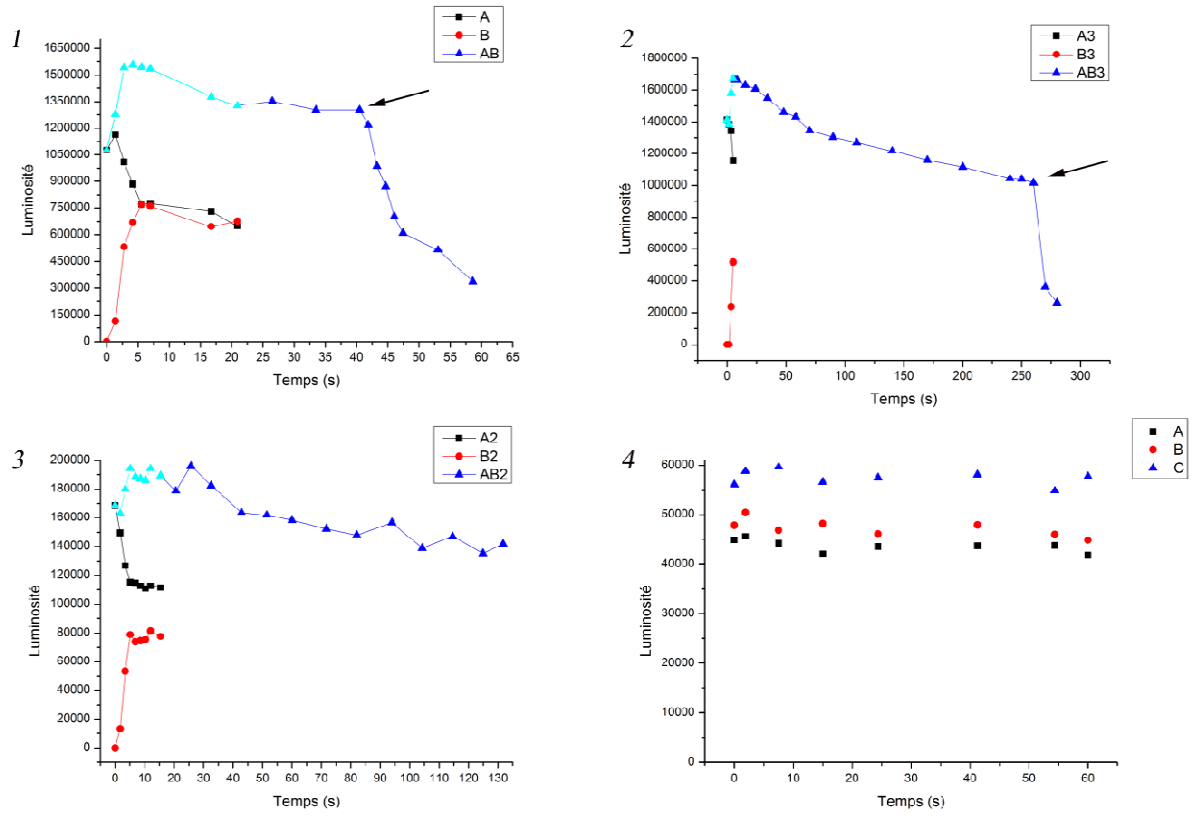

Figure IV-16 : Étude de l'évolution de la luminosité (valeur arbitraire) au court du temps de cellules choisies. 1) Fusion entre deux cellules (A&B), l'une marquée et l'autre pas (2 impulsions de 80µs, 26V). L'hybridome (AB) formé explose 45s après sa formation (flèche). 2) Même chose que pour (1) mais durant une autre expérience (2 impulsions de 80µs, 32V). 3) Idem que (1), mais pour cette expérience l'hybridome reste stable (2 impulsions de 80µs, 22V). 4) Expérience étudiant le photo-blanchiment du marqueur sur 3 cellules (A, B, C).

Cette étude quoique limitée à trois expériences nous révèle plusieurs informations intéressantes. Tout d'abord, elle nous confirme ce que nous avions visualisé sur les vidéos : l'interaction entre les deux cytosols des cellules fusionnées est très rapide. En effet, il faut à

peine 5s pour que la calcéine se répartisse de façon importante dans la cellule non marquée (courbes rouges *Figure IV-16*). Ensuite, si l'on examine en détail l'électroperméabilisation des hybridomes (avant éclatement), on constate que dans le cas où l'hybridome éclate, la perte de fluorescence se fait beaucoup plus rapidement que pour l'hybridome qui reste stable. Ainsi, si l'on calcule la pente des courbes des hybridomes entre le début et la fin de l'expérience (AB2) ou entre le début de l'expérience et avant l'éclatement (AB1 et AB3), on obtient des coefficients directeurs très importants pour les hybridomes éclatés ($coef_{AB1}$=-7550 et $coef_{AB3}$=-2644) et faible pour l'hybridome stable ($ceof_{AB2}$=-422). Pour s'assurer en partie de la pertinence de ces résultats, nous avons aussi analysé le phénomène de perte de fluorescence ou de luminosité par photo-blanchiment (voir *Figure IV-16-4*). On s'aperçoit que cet effet est minime sur la perte de luminosité, preuve en est avec la valeur infime du coefficient moyen des trois courbes issue de la *Figure IV-16-4*, $coef_{ABCmoyen}$=-50.

Ces expérimentations sur la variation de la fluorescence des hybridomes semblent très prometteuses, mais demanderaient plus de données pour être confirmées. Dans le cas où ces expériences futures corroboreraient ces premiers résultats, il serait intéressant de pousser l'étude à des temps plus longs pour analyser la *cicatrisation* de l'hybridome.

6. Conclusion

Tout au long de ces expériences, nous avons montré que notre microsystème était capable de fusionner en parallèle plusieurs cellules et qu'il se révèle un bon outil pour analyser en détail le phénomène d'électrofusion. D'un point de vue biologique, nous devons encore continuer nos études pour trouver les meilleurs paramètres de fusion pour les cellules B16. Il en est de même pour les travaux portant sur l'analyse détaillée de l'électrofusion. Tous ces futurs travaux permettraient d'élaborer un protocole d'électrofusion complet pour les cellules B16, mais qui serait probablement transposable rapidement à d'autres types de cellules.

E. Tests microfluidique et observations

1. Introduction

Les dispositifs permettant de faire des expériences de microfluidique ont été opérationnels sur la fin de ma thèse. Le nombre d'expériences a donc été limité. Toutefois, ces quelques expériences nous ont permis de confirmer des points importants pour l'utilisation de nos dispositifs dans de telles situations.

2. Diélectrophorèse et microfluidique

Les premières expérimentations avaient pour but de montrer que la force de DEPp était suffisante pour capter des cellules entrainées à vive allure par le flux hydrodynamique. L'expérience présentée en *Figure IV-17* nous confirme que cela est possible. Toutefois, nous constatons que la résolution de l'image n'est pas très bonne suite à la présence des tâches dans le film de SU-8. Ce défaut devrait cependant disparaitre avec l'emploi d'un film de bonne qualité.

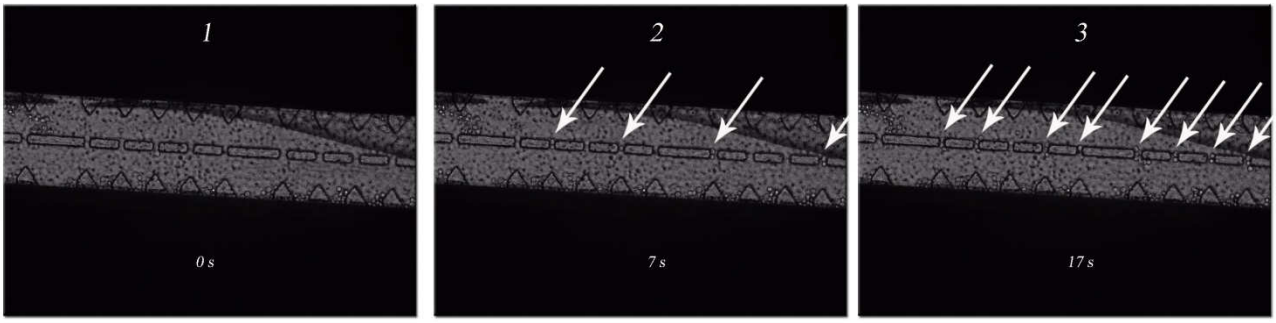

Figure IV-17 : Photos tirées d'une vidéo mettant en évidence la saisie par DEPp (10V, 4MHz) de cellules (voir flèches blanches) entrainées par le flux hydrodynamique.

3. Observation de la fluorescence dans les canaux

Au cours des expériences d'électrofusion avec des cellules marquées, nous avons constaté que nos dispositifs étaient compatibles avec une visualisation des cellules par fluorescence. La *Figure IV-18* montre que cela reste vrai dans le cas où les canaux sont scellés.

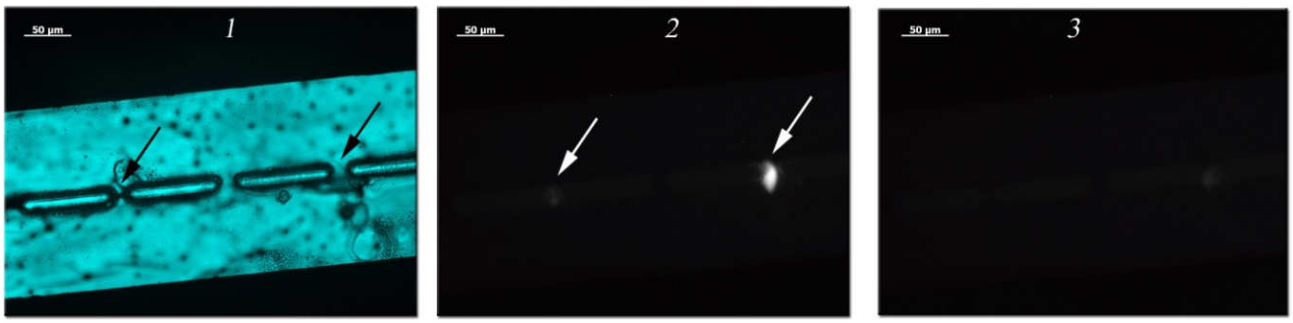

Figure IV-18 : 1) Photo montrant deux cellules piégées par DEPp (flèches noires). La qualité de l'image est assez médiocre en partie à cause de la présence de bulles dans le film de SU-8 et par l'ajout malencontreux d'un filtre bleu. 2) Même endroit que (1) mais avec fluorescence, on distingue deux cellules. 3) Photo prise 1min après l'envoi de 2 pulses (80µs, 20V) pour électroporer les cellules présentées en (2).

F. Conclusion

Nous avons montré que d'un point de vue technologique notre dispositif se prête parfaitement à l'observation dans le visible ou par fluorescence. Grâce à la qualité de ces observations nous avons pu étudier la capture des cellules par diélectrophorèse (étude de la vitesse des cellules) et leur comportement suite à l'application d'une impulsion de champ électrique (étude de la perméabilisation des cellules et de leur fusion). Enfin, nous avons pu valider expérimentalement nos prédictions théoriques sur la cartographie de champ électrique.

Ces expérimentations doivent être complétées par des essais avec des cellules soumises à un flux dans les microcanaux. Enfin, les essais biologiques ici présentés devront être confirmés dans une structure trois canaux et sur les cellules d'intérêt (cellules dendritiques et cellules cancéreuses). Notons que l'on peut envisager de réaliser l'électrode centrale en ITO (oxyde d'indium dopé à l'étain, transparent en couche mince), ce qui permettra une étude par microscope à transmission.

V. Conclusion générale

L'étude présentée dans ce manuscrit représente trois ans et demi de travaux qui avaient pour objectif de réaliser un bio-microsystème pour fusionner en grand nombre des cellules cancéreuses et dendritiques de façon maitrisée. Au début de ce projet, le nombre de microdispositifs élaborés restait anecdotique, malgré des premiers travaux datant du début des années 90 [143, 167]. Cependant, on note depuis deux ans un regain d'activité dans ce domaine avec l'arrivée d'une équipe chinoise [169] et d'une équipe américaine [170], reflétant sûrement le potentiel de cette thématique. Au départ de ce projet, nous nous étions fixés certains objectifs comme : mieux comprendre les phénomènes physiques et biologiques permettant de fusionner avec efficacité des cellules, définir l'architecture du dispositif et enfin, décider de la technologie de fabrication.

A la lumière des travaux existant au début de cette thèse nous avons sélectionné la diélectrophorèse et l'électrofusion pour respectivement, placer et fusionner des cellules ; le tout étant couplé à la microfluidique pour amener, déplacer et évacuer ces cellules. Partant de l'utilisation de ces forces, nous avons pris le parti de développer deux dispositifs : le premier s'inspirant des travaux de Washizu et al devait nous permettre de partir de travaux connus, pour élaborer notre propre protocole expérimental. Le second dispositif, reposant sur une architecture novatrice, dispose de trois canaux et d'une électrode centrale, ce qui le rend potentiellement plus performant, mais en contrepartie plus complexe. Pour valider et optimiser ces différents dispositifs, nous les avons simulés. Une fois les architectures optimales définies, nous sommes passés à leur fabrication. Les différents choix faits précédemment impliquaient de trouver une technologie permettant d'assembler avec précision des réseaux de microélectrodes et de microcanaux. Nous avons alors opté, pour des technologies couplant techniques standards et techniques novatrices. Ainsi, pour la fabrication des électrodes nous avons employé le procédé courant dit de lift-off pour les électrodes fines. En revanche, pour réaliser les électrodes épaisses nous nous sommes basés sur une technique plus récente et peu développée de dépôt électrolytique dans des moules en SU-8. De même, le développement des canaux s'est fait avec un procédé novateur de collage de films souples et de substrats de verre pour obtenir les meilleurs compromis. Toutefois, le développement de toutes ces technologies a demandé plus de temps que prévu initialement. Nous avons donc décidé d'employer des dispositifs non finalisés, mais comportant les structures les plus importantes. Ceci nous a permis de réaliser nos premières manipulations de cellules par diélectrophorèse, puis quelque temps après, d'observer nos premières fusions de cellules par électrofusion. Ces premières expérimentations ont confirmé aussi la robustesse de notre dispositif et son aptitude à permettre des observations de bonne qualité dans le visible ou par fluorescence. Tout ceci nous a poussé à continuer en parallèle de ces expériences, à développer le procédé de fabrication, nous permettant au final de présenter des dispositifs complets et prêts à être utilisés.

Quant aux études de diélectrophorèse et d'électrofusion sur des cellules, elles nous ont permis dans un premier temps de mettre en relation les simulations de champs électriques avec l'expérimentation. Ainsi, pour la diélectrophorèse, nous avons à la fois observé le

placement des cellules dans les zones prédites, mais aussi fait le rapprochement entre les variations du champ électrique simulées pour différentes structures, et les variations de la vitesse des cellules mesurées pour ces mêmes structures. Pour l'électrofusion, nous avons réussi à observer en parallèle la fusion de plusieurs cellules. De plus, l'étude de la fluorescence durant l'électrofusion a mis en valeur des phénomènes intéressants comme : la rapidité à laquelle se mélangent les cytosols des cellules, ainsi que la différence de perte de fluorescence entre un hybridome stable et un hybridome qui va éclater.

Durant cette étude nous avons donc eu la chance de participer à toutes les étapes d'un projet de recherche innovant. Au début, nous sommes partis de plusieurs idées que nous avons ensuite modélisées et ainsi optimisées. Puis nous sommes passés du monde virtuel à la réalité en fabriquant nos dispositifs, pour finir nous les avons soumis à l'expérimentation pour démontrer leur utilité. Pour arriver à ces résultats, nous avons dû acquérir dans un premier temps, le savoir-faire existant dans des domaines aussi variés que la microtechnologie, la diélectrophorèse et l'électrofusion. Puis, nous avons proposé des procédés de fabrication innovants et nous avons étudié de manière approfondie les phénomènes liés à la diélectrophorèse et à l'électrofusion. Toutefois, cette étude ne représente que les prémices de l'objectif initial qui est d'obtenir un très grand nombre d'hybridomes issus de la fusion entre une cellule cancéreuse et une cellule dendritique. De plus, nous devons encore démontrer que ces hybridomes sont plus immunogènes que ceux obtenus avec des dispositifs macroscopiques.

Pour les travaux futurs, il reste un travail expérimental colossal, mais sûrement passionnant. Je pense aussi qu'il ne faut pas se limiter aux architectures proposées. D'autres structures ingénieuses peuvent être imaginées en se basant sur la microtechnologie mise au point qui s'accommode d'ailleurs facilement à de nouveaux designs. On peut par exemple facilement réfléchir à des structures à deux niveaux de canaux ou comportant d'autres géométries d'isolant… Dans tous les cas et comme tout au long de ce projet, il aura fallu et il faudra encore « de l'audace, encore de l'audace, toujours de l'audace » [Danton, 1792].

VI. Annexe I, Le Système Immunitaire

A. Introduction

Notre système immunitaire nous permet de voir notre belle planète comme un endroit propice à la vie humaine. Pourtant, sans lui la planète Terre serait plutôt vue comme un enfer extrêmement infectieux contenant dans chaque parcelle d'eau, d'air ou de terre des milliards de virus, bactéries et autres parasites… Un être vivant (hostile ou non à l'homme) arrivant pour la première fois sur Terre aurait peu de temps à vivre s'il ne restait pas cloisonné dans un environnement stérile (voir « la guerre des mondes » de H. G. Wells). Cette vision de la Terre paradisiaque se transformant en enfer, apparaît malheureusement à toute personne dont le système immunitaire est déficitaire.

Depuis des milliards d'années, l'évolution dicte sa loi sur la vie des espèces. Pour survivre plusieurs possibilités sont offertes : résister en se défendant, détruire en attaquant ou s'allier pour mieux survivre. Dans tous les cas, seuls les plus aptes survivent. Dans cette course effrénée pour la survie, la symbiose se révèle la meilleure voie mais elle demande énormément de temps, et lorsque l'attaque est trop foudroyante, toute une espèce peut disparaître. La symbiose est, en effet, la meilleure voie car elle permet aux deux espèces de continuer à se reproduire et à transmettre leurs gènes, tout en profitant en général l'une de l'autre. Chez l'homme, la flore intestinale est un bon exemple. Tolérée et régulée par le système immunitaire elle permet de faciliter la digestion, de synthétiser certaines vitamines et d'occuper le terrain, empêchant ainsi le développement de bactéries hostiles. La pression environnementale a donc poussé les espèces à se protéger pour survivre des agressions extérieures en particulier des agressions infectieuses.

Cette lutte contre les infections a amené l'évolution du système immunitaire à une extraordinaire complexité en particulier chez les vertébrés. Notre système immunitaire s'est ainsi doté de deux types d'immunités : l'une dite acquise et l'autre adaptative. On regroupe souvent ces cellules sous le nom de globules blancs ou leucocytes. Ensemble, elles combattent toute sorte d'agressions : bactériennes, virales, fongiques, toxiques, tumorales… Bien sûr ce système n'est pas sans faille, preuve en est avec le SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise). Mais dans la grande majorité des cas, il nous protège efficacement d'autant plus que depuis un certains nombres d'années l'homme sait en profiter au mieux, en particulier

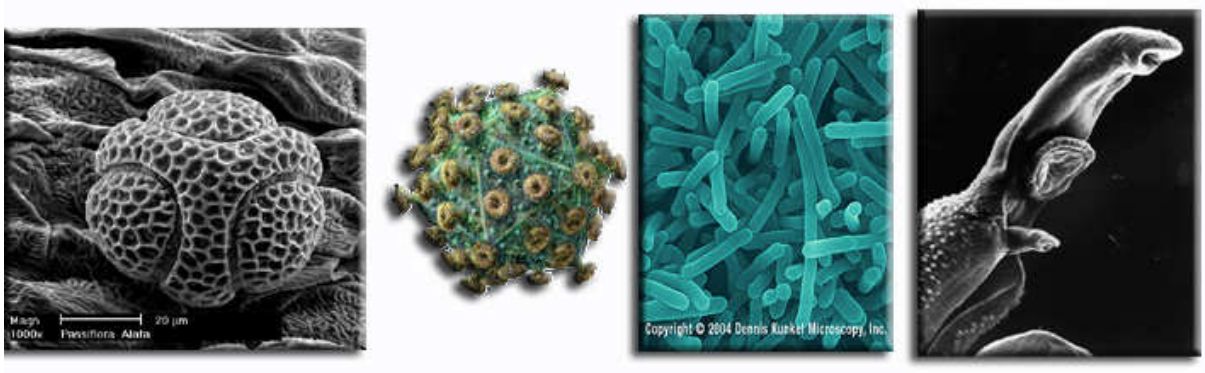

Figure VI-1: Exemple d'antigènes potentiels : Pollen, virus, bactéries, helminthe.

grâce à la vaccination.

Pour mieux cerner le système immunitaire nous verrons quelles sont les stratégies de défense mises en place. Puis, nous rentrerons dans les détails du système immunitaire, de son organisation à son fonctionnement.

B. Stratégies de défense:

Tous les êtres vivants, y compris les virus, sont composés des briques élémentaires suivantes : acides aminés (structures de base des protéines), acides nucléiques (Acide DésoxyriboNucléique, Acide RiboNucléique), lipides et sucres. Chaque espèce a donc développé son propre arrangement lui donnant ses particularités. On retrouve ainsi cette distinction au niveau de la membrane cellulaire. La membrane cellulaire étant exposée directement au milieu extérieur, ces différences qui la caractérisent ont été des cibles de choix de reconnaissance du système immunitaire. Ainsi, les cellules de l'immunité naturelle de la mouche ou de l'homme sont capables de reconnaître certains sucres ou lipides membranaires microbiens. On comprend pourtant qu'il est très difficile d'avoir un récepteur pour chaque espèce hostile : d'une part, au vu de la trop grande variabilité possible, et au temps qu'il faut pour que la sélection naturelle puisse s'adapter à chacune d'entre elles. Pourtant, et c'est ce qui est remarquable, le système immunitaire humain est capable de réagir sélectivement à n'importe quels microbes, toxines… et de garder en mémoire le souvenir de ces infections. Cette particularité est l'apanage du système adaptatif constitué des lymphocytes T (pour Thymus) et B (pour Bone[13]).

A l'inverse, une autre stratégie est d'être capable de reconnaître ce qui est sien et de décider de détruire tout ce qui ne l'est pas. C'est ce que l'on appelle la notion du soi et de non-soi. Cette stratégie est particulièrement intéressante pour les pluricellulaires. C'est pourquoi on la retrouve chez les vertébrés et avec une remarquable complexité chez les mammifères. Ainsi, chez les vertébrés, chacune de ces cellules nucléées exprime à sa surface une molécule commune à tous : c'est le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cette molécule qui joue le rôle d'une carte d'identité propre à l'individu, permet au système immunitaire de discriminer ce qui est le soi et le non-soi. Chez l'homme, le CMH aussi appelé Human Leucocyte Antigen (HLA découvert en 1958 par Jean Dausset) est extrêmement variable d'un homme à l'autre, ce qui explique en particulier les problèmes de rejet d'allogreffe. Le système immunitaire humain a donc cette double particularité de reconnaître ses propres cellules, le soi, et à la fois spécifiquement des molécules propres aux microbes. Intéressons-nous maintenant au détail de ce système si complexe et si efficace.

[13] Os en anglais

C. Immunité acquise ou naturelle :

Notre corps a été façonné pendant des millions d'années pour nous protéger contre les agents infectieux. Notre corps est ainsi entièrement recouvert par un épithélium continu qui joue le rôle de barrière physique et chimique. A l'extérieur, cet épithélium ou épiderme est recouvert de cellules mortes, et d'un sébum légèrement acide, contenant des antibiotiques et antiseptiques naturels. Pour les orifices, ils sont tous recouverts de muqueuses secrétant d'épaisses couches de mucus: larme, cire, salive… ayant les mêmes propriétés que le sébum. Mais nous ne sommes pas à l'abri d'une contamination microbienne suite à une coupure, ou à une résistance à cette première protection. Si nous prenons le cas d'une coupure, deux cas peuvent se produire. Soit la coupure est légère et n'a pas touché de vaisseaux sanguins. Dans ce cas, les cellules blessées secrètent des molécules chimiotactiques qui vont enclencher une inflammation locale. Cette inflammation se traduit par le recrutement de cellules phagocytaires appelées macrophages provenant des tissus voisins. Si le macrophage rencontre des microbes il va alors continuer la cascade inflammatoire en sécrétant des cytokines. Ces cytokines ont une triple action. Elles vont tout d'abord permettre d'activer les cellules de la paroi des vaisseaux sanguins qui vont se dilater et « harponner » les cellules phagocytaires. Elles ont aussi la particularité d'être des chimiokines (cytokines chimioattractantes) qui vont guider les cellules phagocytaires vers le lieu de l'infection. Et enfin elles vont entraîner l'apoptose (mort cellulaire programmée) des cellules avoisinant le site infectieux pour faciliter l'arrivée des cellules phagocytaires.

On distingue dans notre système immunitaire deux types de cellules phagocytaires: les neutrophiles et les monocytes ou macrophages (voir *Figure VI-2*). Les neutrophiles sont très nombreux dans le sang entre 4000 et 10 000 par mm3, et peuvent atteindre rapidement 20 000 en cas d'infection. Dès les premiers signes d'agression transmis, ils sont en général les premiers présents sur le lieu de l'infection. Leur technique d'attaque consiste à ingérer (ou phagocyter) tous les microbes se liant à eux grâce à leur récepteur spécifique. Ils meurent au bout de quelques heures et peuvent former alors, en cas d'infection importante, du pus.

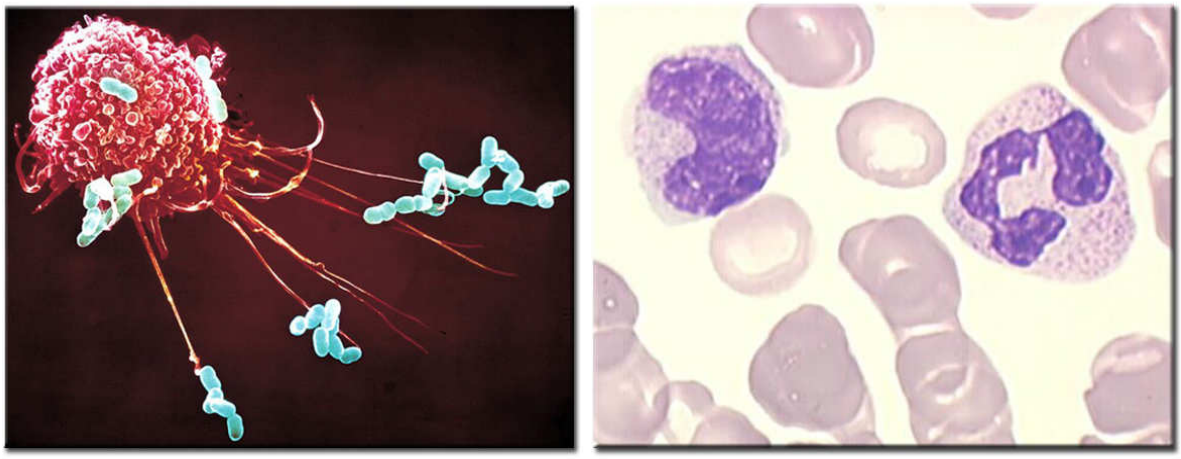

Figure VI-2: A gauche, Macrophage en action (Image obtenue avec un microscope électronique). A droite, Neutrophiles et globules rouges vus au microscope.

Pour leur part, les monocytes sont beaucoup moins nombreux : entre 500 et 1000 par mm3 de sang. Lorsqu'un monocyte se trouve dans un tissu, il se différencie en macrophage. Ils peuvent eux aussi ingérer des microbes, mais à la différence des neutrophiles, ils peuvent survivre sur le site d'infection pendant une période prolongée. Leur rôle principal est surtout celui de médiateur. Pour jouer ce rôle, ils ont besoin de communiquer énormément d'informations. Pour cela, ils utilisent de nombreuses cytokines qui seront leurs messagers. Comme nous l'avons vu précédemment, ces cytokines secrétées peuvent interagir sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et recruter d'autres cellules phagocytaires. Mais elles entraînent encore bien d'autres réactions comme : la fièvre, la prolifération et la stimulation de tous les leucocytes, le recrutement des cellules Natural Killer (NK) et des cellules de l'immunité adaptative. Enfin, une fois l'attaque microbienne finie, ce sont eux qui sécrètent des facteurs de croissance et des enzymes qui permettront de remplacer les tissus lésés par du tissu conjonctif.

Les cellules NK sont les dernières cellules de l'immunité naturelle à intervenir sur le site infectieux. Leur rôle est plus axé contre les attaques virales. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, chaque cellule a une molécule l'identifiant comme le soi : il s'agit du CMH. Le CMH permet aussi de donner l'état de santé de la cellule. Ainsi, si une cellule est infectée par un virus, elle exprimera sur son CMH des peptides viraux. Ces peptides viraux seront alors détectés par l'immunité adaptative, via les lymphocytes T cytotoxiques, dont nous discuterons ultérieurement. Une fois reconnue comme infectée, la cellule est détruite par le lymphocyte. Pour éviter cela, des virus ont mis au point des mécanismes capables de bloquer l'expression de la molécule du CMH. De cette façon, ils peuvent rester invisibles aux yeux des lymphocytes et continuer de se développer au sein de la cellule. Pour pallier cette faille, les cellules NK ont déployé un stratège simple. Si une cellule ne présente pas de molécules du CMH alors elle est détruite directement via une attaque de sa membrane en utilisant des perforines. Les virus ne sont pas les seuls à essayer de se cacher du système immunitaire. Les cellules tumorales essayent elles aussi de limiter l'expression des molécules du CMH. Ce qui fait des cellules NK des agents importants de la lutte antitumorale.

Revenons au cas d'une coupure importante entraînant la lésion de vaisseaux sanguins. La réaction immunitaire est dans ce cas, beaucoup plus forte car le pathogène peut alors se disperser très rapidement dans tout l'organisme et atteindre des organes vitaux. Dans ce cas, toutes les cellules de l'immunité naturelle sont recrutées directement car présentes dans le sang. En plus des cellules phagocytaires et NK, viennent s'adjoindre l'aide d'enzymes et de protéines présentes dans le sang. La plus connue est l'enzyme du complément qui va s'activer lors de l'inflammation et se lier au microbe pour favoriser sa phagocytose ou sa destruction en le lysant (formation de pores membranaires). Enfin, si le microbe est déjà connu du système adaptatif, il sera attaqué et détruit par celui-ci. Dans le cas d'une réaction immune trop violente, la personne peut faire un choc septique, entrainant une cascade de complications pouvant aller jusqu'à la mort du sujet.

L’immunité naturelle n’est cependant pas à même de reconnaître tous les pathogènes. C’est pourquoi est apparu au cours de l’évolution, un apport majeur au système immunitaire : l’immunité adaptative.

D. Immunité adaptative :

Notre système immunitaire adaptatif est scindé en deux parties : l’une à médiation humorale et l’autre à médiation cellulaire. Cette séparation permet au système immunitaire de répondre à deux attaques distinctes. La médiation humorale répond à toutes les attaques présentes dans les muqueuses et la circulation sanguine. Pour cela les lymphocytes B se chargent de secréter des protéines appelées anticorps (connues aussi sous le nom d’immunoglobuline). Ces anticorps reconnaissent avec une grande affinité un fragment du microbe ou de la toxine. Une fois celui-ci détecté, l’anticorps y reste accroché fermement permettant son élimination rapide. Cette immunité permet donc de bloquer et d’éliminer les infections avant même qu’elles aient le temps d’attaquer les tissus. D’un autre côté, si le microbe arrive à passer à travers cette protection et à contaminer une cellule, nous n’avons plus aucun moyen de nous protéger. C’est pourquoi nous avons aussi une immunité cellulaire. Elle est basée sur les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et T cytotoxiques (CD8+). Ce sont en particulier les lymphocytes T cytotoxiques qui se chargent d’éliminer les cellules infectées et ainsi d’éliminer les réservoirs d’infections. Le rôle des lymphocytes T auxiliaires est beaucoup plus complexe. Il n’a en effet pas de moyen direct pour éliminer un microbe. Il va ainsi diriger la réponse immunitaire adaptative et intervenir dans l’immunité naturelle. Son statut est si important que lorsqu’il est la cible d’une attaque microbienne c’est tout le système immunitaire qui s’écroule. Cette maladie virale est connue sous le nom de SIDA (découvert en 1983, par l'équipe du Professeur Jean Claude Chermann de l'Institut Pasteur, sous la direction de Luc Montagnier).

Avant de continuer plus en détail sur l’immunité adaptative, discutons d’abord de la notion d’antigène et donnons quelques informations complémentaires sur le CMH. L’antigène est une macromolécule qui peut être un produit naturel ou synthétique. Il peut prendre la forme de polysaccaride, lipide, protéine, fragment d’ADN… C'est-à-dire être une fraction de la membrane d’une bactérie, de l’ADN ou l’ARN d’un virus, une molécule médicamenteuse, du pollen… Ce sont ces antigènes qui sont reconnus spécifiquement par le système immunitaire adaptatif. Les anticorps sont à même de les identifier directement alors que les lymphocytes T ont besoin que l’antigène leur soit présenté. Cette présentation se fait à travers le CMH de classe I ou de classe II (voir *Figure VI-3*). Jusqu’à maintenant lorsque nous parlions de CMH, il était sous entendu que celui-ci était le CMH de classe I. Comme nous l’avons vu ultérieurement, le CMH de classe I nous sert à la fois d’identifiant du soi, mais a aussi la particularité de part sa forme en corbeille de présenter un peptide, c'est-à-dire un fragment protéique. Si le fragment provient d’une cellule saine alors, il sera reconnu comme du soi. Par contre, si une cellule est infectée par un virus, on verra alors apparaître des fragments inconnus, reconnus comme du non soi. Ce sont les lymphocytes T cytotoxiques qui

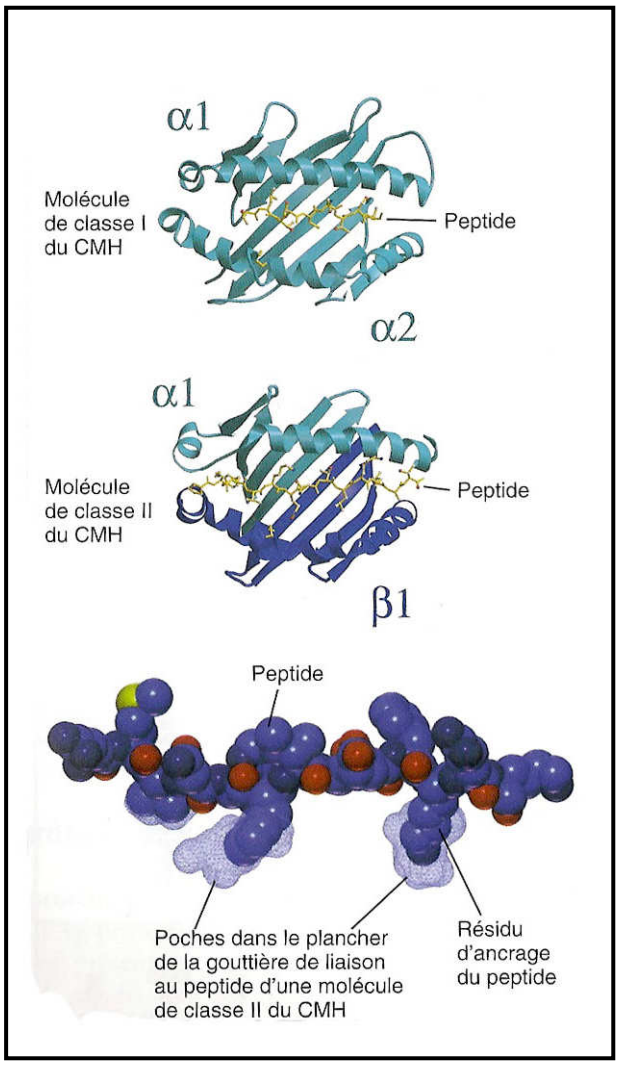

Figure VI-3 : Représentation schématique du CMH de classe I et II, et d'un peptide [Abbas][9].

ont développé leur récepteur pour reconnaitre le CMH de classe I et les peptides antigéniques contenus par celui-ci.

Le CMH de classe II, à l'inverse du CMH de classe I, n'est pas présent sur toutes les cellules nucléées du corps. Il se trouve uniquement sur les cellules dites présentatrices d'antigènes. Ces cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) sont représentées par les familles de cellules dendritiques, les lymphocytes B et les macrophages. Seule une cellule est capable d'interagir avec ce CMH de classe II : ce sont les lymphocytes T auxiliaires. Nous pourrions nous demander à quoi peut servir un tel système, notre corps étant déjà armé pour lutter contre toutes les attaques cellulaires ou extracellulaires.

Notre système immunitaire a besoin d'être maîtrisé et régulé. Ce travail d'activation et de régulation de l'immunité adaptative est dévolu aux lymphocytes T auxiliaires. Ce sont eux qui vérifient que la réaction est bien une réponse à un antigène du non-soi et activent ensuite les cellules ayant réagi à cet antigène. Pour cela, ils sont recouverts à leur surface d'un récepteur sensible à la fois au CMH de classe II et à un peptide antigénique. Suite à une infection, l'immunité adaptative met cependant au moins une semaine à commencer à lutter efficacement contre ce nouvel antigène. Cette latence peut heureusement être supprimée en effectuant une primo infection non létale pour le patient. Ainsi le système immunitaire aura déjà combattu le pathogène et gardera en mémoire cette attaque. C'est le principe de la vaccination.

Comme nous l'avons vu précédemment, les lymphocytes ont chacun à leur surface un récepteur bien particulier. On retrouve ainsi sur la membrane des lymphocytes B un BCR (B Cell Receptor), et logiquement, un TCR (T Cell Receptor) pour les lymphocytes T. Ces récepteurs membranaires sont fabriqués lors de la maturation du lymphocyte. Ils ont une particularité assez exceptionnelle car ils ont un répertoire quasi infini. Ainsi la variabilité des BCR peut atteindre 10^{11} combinaisons, et celle des TCR 10^{16}, ce qui explique que même une molécule purement synthétique, n'ayant jamais été produite dans la nature, puisse être reconnue par notre système immunitaire. Cette diversité des récepteurs est due à une recombinaison au hasard de différents fragments de gènes et par l'ajout aléatoire de

nucléotides entre ces recombinaisons. Une fois pourvu de son récepteur, le lymphocyte est encore immature et doit passer différentes étapes de sélection. Ce *casting* est très important car en cas de mauvaise sélection les conséquences peuvent être dramatiques En effet une mauvaise sélection entraînerait une réaction auto-immune. Les autres étapes de la sélection concernent surtout les lymphocytes T. Celles-ci permettent de ne garder que les lymphocytes T ayant un récepteur reconnaissant le CMH de classe I ou II, et ayant une affinité faible pour les peptides du soi.

Maintenant que tous les protagonistes de l'immunité sont rappelés, développons la réaction immunitaire.

E. La réaction immunitaire :

Tous les acteurs sont en place mais le scénario n'est pas encore bien connu. Intéressons-nous donc dans le détail aux deux réactions immunes possibles : la médiation cellulaire et humorale.

Mais avant de commencer, posons-nous la question de savoir où sont nos lymphocytes. La très grande majorité des lymphocytes attendent dans nos ganglions que leur soit amené un antigène. Les ganglions sont regroupés en zones bien précises. On les retrouve ainsi particulièrement aux endroits fortement exposés à une contamination microbienne que sont les orifices respiratoire et digestif. Ils sont aussi présents à toutes les extrémités de nos membres pour pallier une infection vers les organes vitaux. De plus, tous les ganglions sont connectés entre eux via le réseau lymphatique qui tapisse tout notre corps (*Figure VI-4*). Enfin, tous les ganglions sont reliés aux vaisseaux sanguins ce qui permet de filtrer le sang, d'amener les lymphocytes naïfs (n'ayant pas encore rencontré d'antigène) et de transporter les lymphocytes activés vers le lieu de l'infection. Notre ganglion central est la rate, qui héberge une partie importante de nos lymphocytes.

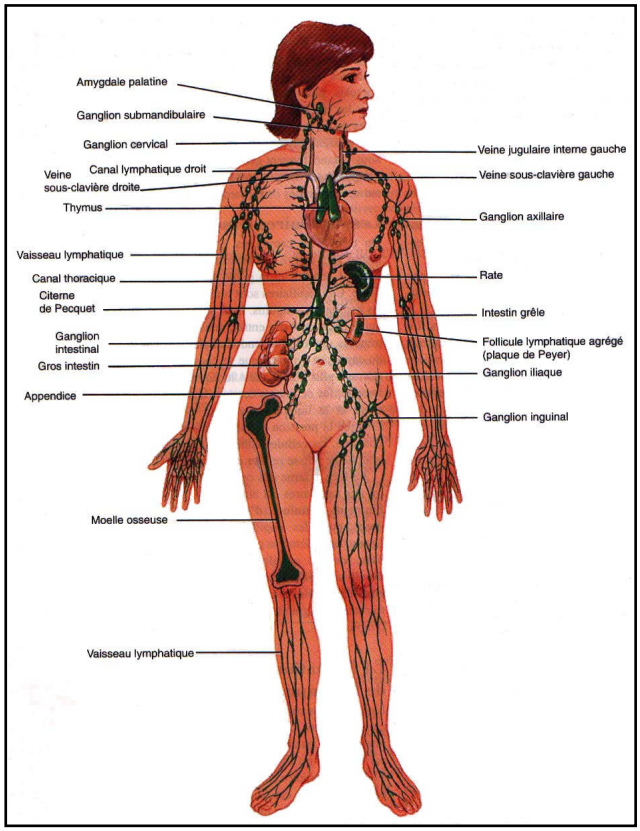

Figure VI-4*: vue antérieure des principaux composants du système lymphatique.*

Nous pouvons maintenant nous demander qui joue le rôle d'entremetteur entre l'antigène et les lymphocytes. Bien sûr, l'antigène peut arriver directement par la circulation sanguine et être ainsi détecté lors de son passage dans un ganglion. Mais heureusement pour nous, les infections

n'arrivent pas toutes jusqu'à la circulation sanguine. Ce rôle, est alors décerné aux cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) et tout particulièrement aux cellules dendritiques. Ces cellules sont de véritables sentinelles, réparties sur l'ensemble de nos tissus. Dès qu'un microbe est détecté, il est phagocyté. Ensuite, la cellule change de morphologie pour migrer rapidement à travers le réseau lymphatique vers les ganglions. C'est là qu'elle présente aux différents lymphocytes les antigènes. L'immunité adaptative peut à présent se mettre en place.

Les différentes étapes qui vont suivre sont surtout basées sur l'activation et la prolifération des lymphocytes. Tout ceci, sous le contrôle des lymphocytes T auxiliaires.

1. La médiation humorale : Lymphocyte B

Les lymphocytes B (LB), une fois en contact avec l'antigène, vont l'ingérer pour permettre sa présentation au lymphocyte T auxiliaire. Cette présentation peut se faire aussi en parallèle par les cellules dendritiques. Cette présentation permet d'autoriser l'activation du lymphocyte B. Cette activation se traduit par une expansion clonale, puis par une différenciation en plasmocyte. Les plasmocytes se mettront alors à synthétiser et à secréter en grande quantité des anticorps, tous dédiés à cet antigène. Différents anticorps ou immunoglobulines peuvent être secrétés, luttant ainsi plus efficacement contre l'infection. Ce sont les lymphocytes T auxiliaires qui induiront via des cytokines particulières une recombinaison génétique du LB, entraînant ensuite la synthèse de telle ou telle immunoglobuline (voir *Figure VI-5*).

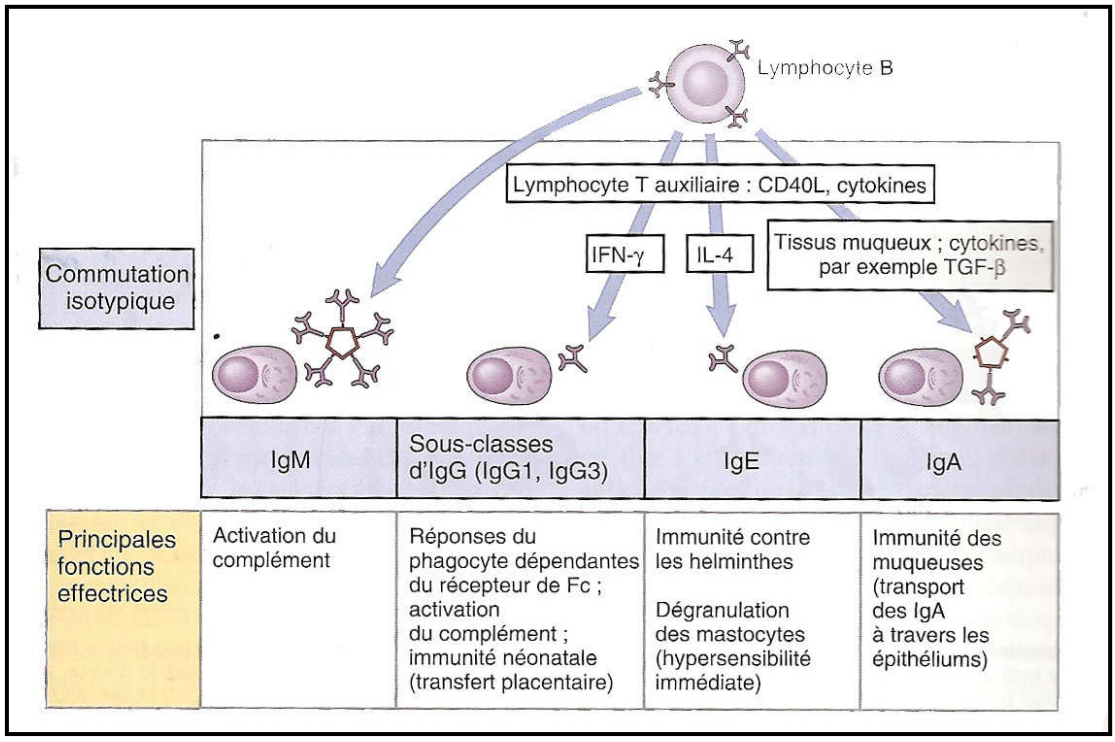

Figure VI-5*:* Les différents anticorps secrétés selon la commutation isotypique [Abbas][9].

Mais la réaction immune ne s'arrête pas là. En effet lors de l'expansion clonale, certains LB ne sont pas exactement des clones et modifient légèrement leurs récepteurs à l'antigène. Cette évolution du récepteur va permettre ainsi d'affiner l'interaction avec

l'antigène. Evidemment, cette évolution du récepteur est aléatoire et entraîne un taux de réussite très faible. Mais lorsque l'interaction s'améliore, on passe alors à une immunité hyper-adaptative. Enfin, quand l'infection est en cours d'être résorbée, des lymphocytes B ne vont pas se différencier en plasmocytes mais évoluer en cellules mémoires. Ils circulent ainsi pendant plusieurs mois ou années à l'affût de l'antigène et permettent ainsi une réaction immédiate contre celui-ci. C'est le principe utilisé pour la vaccination, qui déclenche ainsi une réaction immune pour induire des lymphocytes mémoires. Par contre nous pourrions nous questionner sur l'intérêt de faire un rappel de vaccin quelques mois après la première injection, et non pas se contenter d'un rappel après plusieurs années, qui serait justifié pour refaire simplement les stocks de lymphocytes mémoires. En fait, ce rappel se fait avec une dose infime d'antigènes, permettant d'enclencher une réaction immune, favorisant les immunoglobulines ayant le plus d'affinités avec l'antigène. Ainsi notre immunité humorale est extrêmement bien parée à se défendre contre les antigènes ciblés par le vaccin.

Rappelons comment l'anticorps nous protège du pathogène. La protection de l'anticorps commence dès qu'il s'accroche à son antigène, et va permettre une cascade de réactions menant à l'élimination du porteur de l'antigène. En effet, l'anticorps seul permet uniquement de gêner ou bloquer l'interaction du pathogène avec ce qui l'entoure. Ainsi, une toxine reconnue par des anticorps perd sa toxicité en ne pouvant plus interagir avec ca cible. Se pose maintenant le problème d'éliminer le pathogène. Rappelons-nous que les anticorps ont des récepteurs antigéniques différents s'ils sont issus de diverses lignées clonales. Mais ils ont tous en commun une partie invariable appelée région du Fragment constant (Fc). C'est cette partie de l'anticorps qui va permettre le recrutement de cellules phagocytaires ou NK et activer le complément. Tout ceci entraînera une élimination rapide du microbe.

2. La médiation cellulaire : Lymphocyte T

Précédemment, nous avons déjà vu que les microbes pouvaient déjouer la vigilance de l'immunité innée et des LB en infectant directement la cellule. Pour éliminer ces foyers infectieux intracellulaires, le système immunitaire se base alors sur la médiation cellulaire via les lymphocytes T. Le principe est assez similaire à celui présenté pour les LB. La première étape va consister à reconnaitre les antigènes, puis à autoriser la réaction immune à continuer, pour enfin annihiler l'infection (voir *Figure VI-6*). Le microbe étant cette fois-ci à l'intérieur de la cellule, il n'est pas possible de le détecter directement. C'est pour cela que les Lymphocytes T cytotoxiques analysent en permanence le CMH de classe I des cellules pour repérer un antigène du non-soi. En effet, un virus va entraîner des modifications importantes à l'intérieur de la cellule. Le virus essayant de se dupliquer va produire un grand nombre de protéines virales qui seront par la suite découpées en fragments et présentées via le CMH de classe I. Mais avant de partir à la recherche de cellules infectées, le LT cytotoxique doit être activé.

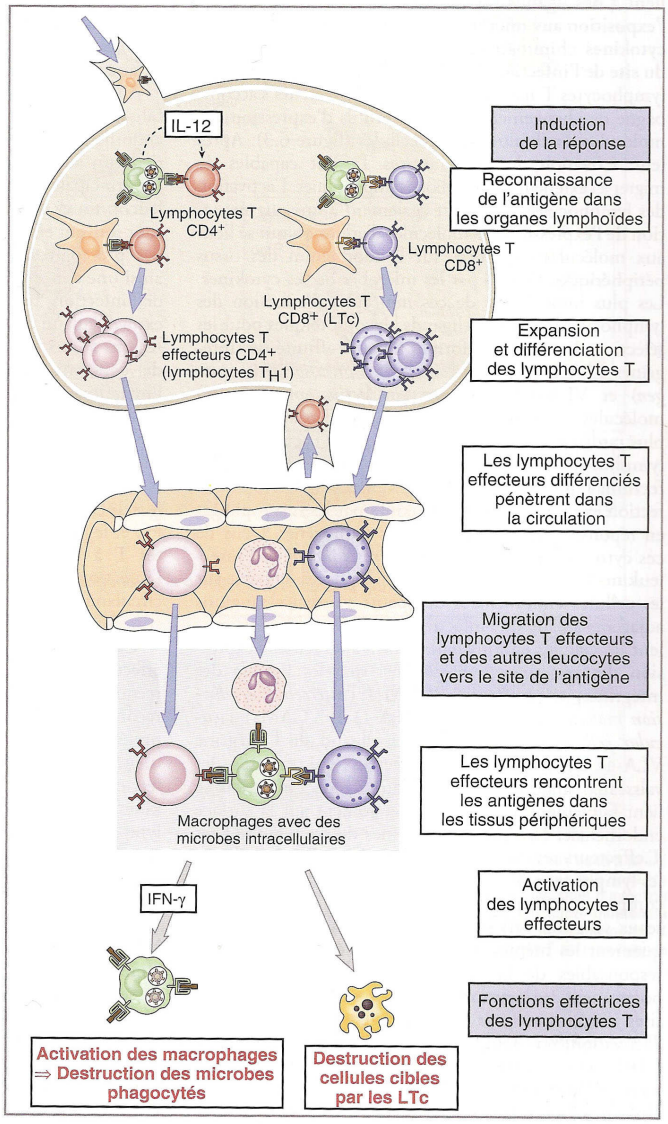

Figure VI-6*: Les différentes phases de la médiation cellulaire [Abbas][9].

Dans les organes lymphoïdes où attendent les LT naïfs, la réaction à médiation cellulaire commence lorsqu'une CPAg présente des antigènes sur son CMH de classe I et de classe II. Elle va activer simultanément les LT auxiliaires et LT cytotoxiques. Les LT cytotoxiques vont alors secréter sur la membrane des récepteurs sensibles à certaines cytokines qui, lorsqu'ils sont activés permettront la maturation complète du LT et son expansion clonale. Ce sont les lymphocytes auxiliaires qui une fois activés par la CPAg vont alors s'auto-stimuler et secréter en parallèle ces cytokines. Les lymphocytes sont maintenant prêts à migrer dans tout le corps à la recherche de l'antigène. Les LT auxiliaires ne détruisent pas directement le microbe mais permettent d'activer les macrophages pour faciliter la destruction des microbes phagocytés. Les LT cytotoxiques vont eux rechercher toutes cellules infectées en scrutant leur CMH de classe I. Dès que l'antigène est reconnu, le LT cytotoxique va alors s'accrocher à la cellule cible et la détruire en utilisant des perforines, qui vont former des pores sur la membrane de la cellule cible, et d'autre part, des molécules toxiques qui vont, via les pores, entrer dans la cellule et entraîner l'apoptose de celle-ci (voir *Figure VI-7*).

Mais notre système immunitaire n'est pas sans faille. Nous avons déjà noté qu'il faut du temps pour que la réaction adaptative se mette en place. Mais les microbes ont développé bien d'autres parades à nos multiples défenses. La première est leur grande variation antigénique. Les microbes, en particulier les virus, mutent énormément leur génome ce qui entraîne une grande variation d'antigène. Ainsi, une fois l'antigène reconnu par le système immunitaire, le virus ayant déjà muté continuera à se dupliquer sans être menacé. Il s'ensuit alors une course effrénée entre le système immunitaire et le microbe. Un exemple bien connu est le virus de la grippe qui a un pouvoir mutagène et immunogène important. Heureusement, le système immunitaire réussit la grande majorité du temps à repousser l'attaque mais pas assez rapidement pour empêcher le virus de se propager chez d'autres personnes via les gouttelettes provenant de la toux ou des éternuements. Du fait de sa grande facilité à muter, le

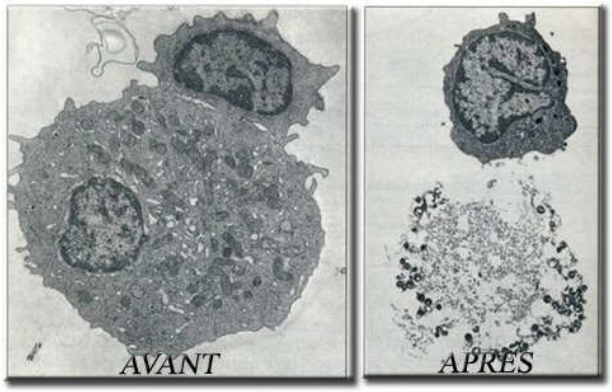

Figure VI-7: Lymphocyte cytotoxique en action.

virus est différent chaque année, nécessitant une nouvelle vaccination avant chaque épidémie. Une autre parade, développée par le virus de l'herpès simplex (HSV), consiste à empêcher la présentation des antigènes sur le CMH de classe I. Ainsi le virus peut rester dans la cellule sans activer les LT cytotoxiques. Il existe encore de nombreuses parades déployées par les virus, les bactéries, les parasites...

Mais heureusement, l'homme a su prendre en main sa sélection naturelle et développer ses propres contre-offensives : antibiotiques, vaccinations, antiviraux… Pourtant, il reste de nombreux combats encore à gagner : SIDA, Ebola, … et ils ne devraient pas diminuer au vu de la déforestation des forêts équatoriales, du réchauffement climatique, de la mondialisation des échanges… qui poussent de nouveaux pathogènes au contact de nouvelles espèces.

F. Conclusion

Durant ces quelques pages nous avons rappelé les mécanismes de base du système immunitaire, toutefois bien des sujets non pas été abordés. Ainsi, à la lecture de ce chapitre des questions restes en suspends, comme par exemple : que se passe t-il quand le système immunitaire se retourne contre le soi ? Le système immunitaire joue t-il un rôle contre les cellules cancéreuses ?... Toutes ces questions sont aujourd'hui, plus ou moins bien comprises car n'oublions pas que l'immunologie est une science jeune avec encore de très nombreuses inconnues, et c'est d'ailleurs ce qui en fait tout son intérêt.

VII. Annexe II, Le cancer ou les cancers

A. Introduction

Le « Cancer » est la maladie la plus redoutée des Français (86%, étude Sofres 2004), mais étrangement très peu comprise du grand public. Cette crainte est en partie justifiée car le cancer est la deuxième cause de décès (28%), juste derrière les maladies cardiovasculaires (33%). Derrière le mot cancer, ce sont des centaines de maladies qui se cachent, bien différentes les unes des autres, avec des pronostiques vitaux tous aussi différents. Les médecins ont bien sûr donné un nom au cancer en ajoutant le nom de l'organe touché : cancer de l'estomac, du sein, ... car le cancer est avant tout une maladie localisée, et peut, s'il prolifère devenir une maladie généralisée. Grâce aux avancées sur le cancer, les médecins savent maintenant que l'on peut classer un type de cancer en sous-familles. Ainsi, un cancer du sein pourra être dit à adénocarcinome canalaire infiltrant ou carcinome lobulaire… Il n'est pas facile d'appréhender le cancer, maladie complexe et malheureusement propre à chacun de nous. Dans cette partie nous décrirons brièvement la pathologie du cancer et les chiffres associés (statistiques, études épidémiologiques). Puis nous finirons sur les techniques de diagnostiques, et les différentes façons de soigner ces cancers.

Figure VII-1:« Impression d'un cancer levant ». Impression soleil levant, huile sur toile, Claude Monet, 1873.

B. Courte histoire du cancer

On imagine souvent que le cancer est une maladie de l'homme moderne, due à son mode de vie : tabac, Tchernobyl, *mal bouffe*, bronzage, pesticides, pollution… Comme nous le verrons plus tard, ceci a eu une incidence sur le nombre de cancers mais pas sur son apparition. Le cancer est avant tout une maladie qui suit malheureusement tous les êtres vivants pluricellulaires et cela, depuis sûrement leur origine.

Ainsi, chez l'homme, on a retrouvé sur un guerrier de l'âge de fer (10 000 ans av JC) un cancer osseux de l'humérus. Plus intéressant encore, on a découvert des papyrus vieux de plus de 5000 ans, qui décrivent des symptômes d'un cancer du sein. Un traitement est même proposé. Il consiste à cautériser les ulcères induits par la tumeur. Par contre, la première trace écrite où il est donné un nom au cancer, vient d'un papyrus égyptien le papyrus d'Ebers, datant de 1500 av JC (voir *Figure VII-2*). Il faudra attendre un peu plus de mille ans pour retrouver une étude sérieuse du cancer. C'est Hippocrate (460-370 av JC) qui s'en est chargé en décrivant un grand nombre de cancers et en lui donnant son nom. Le nom proviendrait de la forme de certaines tumeurs et par le rapprochement du comportement du crabe. Celui-ci ne relâche jamais sa proie, et il n'est jamais rassasié. Dans la même lignée qu'Hippocrate, on retrouve Celsus (25 av – 50 ap JC) et son traité de Medicina ainsi qu'Aretaeus (1er siècle après JC) qui apportent une distinction dans l'évolution de la tumeur et de son traitement. Ainsi, dans le cas d'une lésion trop avancée, ils déconseillent d'intervenir. La période antique se finit avec Galien (~129 - ~201 ap JC) qui considère le cancer comme un excès «d'humeur », et en particulier de la bile noire qui en se solidifiant de préférence au niveau des lèvres, de la langue ou des seins forme alors une tumeur (*oncos* en grec). Le traitement consiste alors à effectuer une saignée pour dissoudre cette bile solidifiée. Si la lésion ne régresse pas, il préconise alors l'ablation. Durant le moyen âge, une partie du savoir sera perdu, jusqu'à la relecture des écrits antiques par les médecins arabes au début du millénaire. Ce sont des médecins comme Avicenne (980-1037), Albucasis (~Xème-XIème), Avenzoar (1070-1162) qui permettent ce renouveau du savoir sur le cancer, tout en l'enrichissant de leurs expériences personnelles. Leurs connaissances s'éteignent malheureusement petit à petit, mais certains de leurs écrits réussiront à influencer certaines écoles de médecine, comme l'école de Montpellier.

Figure VII-2: Papyrus d'Ebers.

Figure VII-3: Gravure d'une mastectomie, et couverture du livre [Schultes Johann,1655] [5].

Il faudra réellement attendre le début de la Renaissance (XVIème siècle), et l'engouement des écrits antiques, pour qu'une médecine un tant soit peu scientifique ré-émerge. La lutte contre le cancer ne sera pas oubliée pour autant, et renaîtra en même temps que la relecture des anciens écrits. Preuve en est, ce livre traduit du Latin en François de 1580, intitulé : « la Chirurgie » écrit par Maitre Jean Tagault docteur en médecine (imprimé avec privilège du roi tout de même) [205]. Ce livre est un vrai trésor pour plus d'une raison. Il contient tout d'abord plusieurs chapitres (plus de 150 pages !) sur *les tumeurs contre nature*. On y apprend aussi quelles sont les références médicales de l'époque. On retrouve ainsi dans la très grande majorité des cas, Galien, mais aussi Avicenne, Hippocrate, Albucasis… et des médecins *modernes* comme Guy de Chauliac (chirurgien français, 1298-1368). A sa lecture, on découvre tout d'abord, un chapitre nous expliquant la cause du cancer. Cette théorie est entièrement basée sur les idées de Galien qui stipule la fluxion (congestion) des humeurs comme en étant la cause. Ensuite, l'auteur se consacre à un grand chapitre sur les différentes tumeurs contre nature. Ce chapitre en mentionnant les travaux d'Avicenne, nous rappelle à quel point celui-ci les avait fortement bien décrites. Enfin, on peut lire à travers différents chapitres, comment soigner ces tumeurs *contre nature*.

A la lecture difficile de ceux-ci, on peut trouver quelques descriptions opératoires dont voici un extrait : « faites coucher le malade sur un lit : car s'il est assis, il pourrait facilement tomber en défaillance de cœur … faites lui tenir la tête bien ferme à quelques valets. Apres vous ferez une incision droite, ou oblique du cuir (la peau) qui est sur la dite tumeur … Mais il ne faut tout d'un coup couper toute la grosseur du cuir, car il ne faut en cette œuvre faire rien avec violence… Il faut faire une section … et lors séparez doucement et peu à peu les veines et artères … et écorchez les membranes avec les doigts et manché de la lancette (petit instrument comportant une lame plate et pointue) … puis après que la scrofule sera dénuée et désenveloppée de ses membranes, tirez la peu à peu … Mais si en faisant la section l'effusion du sang retarde votre opération il faut lier le vaisseau avec une petite corde. Parce que la base de la scrofule sera étroite coupez le fragment en y mettant premier le doigt nommé index et

Figure VII-4 : La leçon d'anatomie du docteur Tulp, huile sur toile, Rembrandt(1606-1669), 1632.

cherchant s'il n'y a point d'autres scrofules adioustées, lesquelles s'ils se trouvent vous les arracherez à la manière que dessus… Albucasis commande que ce soit consumé en remplissant la plaie de coton ou de quelque autre chose semblable trempée en eau salée … etc… ». Ce récit nous plonge directement dans la dure réalité des opérations chirurgicales de l'époque : pas d'hygiène, pas d'anesthésiant (voir *Figure VII-3*)… Mais dans le même temps, on trouve des précautions pour limiter les hémorragies et beaucoup de belles paroles, nous rappelant le malade imaginaire de Molière.

Durant cette période de la Renaissance, les connaissances en médecine vont être particulièrement fertiles, tout particulièrement, dans le domaine de l'anatomie (voir figure II.C.4) avec les travaux d'André Vésale (1514-1564) [206] ainsi qu'un siècle plus tard, en 1651, par la découverte du système lymphatique chez l'animal par Jean Pecquet (1622-1674), puis chez l'homme, un an plus tard, par Thomas Bartholin (1616-1680). Ces nouveaux savoirs remettent en partie en cause le dogme de la médecine selon Galien, permettent une nouvelle vision du corps humain et le début de la médecine moderne.

Pourtant, malgré ces avancées, le cancer reste une maladie toujours aussi mal comprise et surtout incurable. Ce pose alors le problème des malades. Les médecins de l'époque savent assez bien diagnostiquer un cancer, mais n'arrivent pas à le soigner ou même à ralentir sa progression. Les hôpitaux se retrouvent alors avec un grand nombre de patients très mal en point, avec des plaies suppurantes, des abcès... donnant pour image du *cancéré* (comme on le dit à l'époque), une personne fortement contagieuse. Cette croyance populaire, soutenue malheureusement aussi par certains médecins, va conférer aux *cancérés* le même statut que les pestiférés : c'est-à-dire persona non grata dans les lieux publiques, hôpitaux compris. Pourtant certains hôpitaux, par ordonnances royales, se doivent de les accueillir.

C’est ainsi le cas de l’Hôtel-Dieu de Reims. Mais malgré cela, on n’essaye à tout pris de ne pas les accueillir, allant même jusqu’à leur proposer de petites sommes d’argent pour qu’ils retournent chez eux. Au vu des conditions déplorables dans lesquelles sont traités les *cancérés*, un esprit charitable le chanoine Jean Godinot propose en 1738 à un hôpital de Reims la coquette somme de 10 000 livres pour assurer l’entretien à perpétuité de deux cancéreux. Son offre sera rejetée par l’hôpital prétextant le trop grand risque infectieux de la maladie. Etrangement, c’est l’Hôtel-Dieu de Reims qui accepte l’offre, sensible peut être à la donation qui s’élève maintenant à 25 000 livres. Les administrateurs de l’hôpital proposent alors de transformer une maison leur appartenant en petit hôpital réservé exclusivement aux cancéreux. Ce sera ainsi le premier centre anticancéreux de France et surement l’un des premiers d’Europe. Pour la petite anecdote, il est bon de savoir que les habitants avoisinant le futur hôpital s’opposeront à sa réalisation et présenteront une requête au roi pour qu’il soit établi ailleurs. Leur requête sera rejetée car si l’on reconnait « la mauvaise odeur des suppurations du cancer » [207] on dénie le fait qu’il soit contagieux, « la preuve en est que ni les domestiques d’un riche bourgeois atteint de cancer, ni les dames charitables qui s’occupent de cancéreux, ne sont en général touchés par le mal» [208]. Preuve toute aussi peu scientifique que le risque infectieux du cancer n’existe pas.

A la même période, le chirurgien Henri François le Dran (1685-1770) réalise que le cancer est avant tout une maladie locale qui par la suite se propage via les canaux lymphatiques. Peu de temps après, le père de l’histologie (étude des tissus), Xavier Bichat (1771-1802) montre que les tumeurs cancéreuses touchant un patient en de multiples endroits sont en fait toutes issues d’un même tissu. C’est le début de la cancérologie moderne. On comprend que le cancer est tout d’abord une maladie de la cellule, qui deviendra ensuite une maladie locale, pour finir par être une maladie généralisée. Malgré ces avancées importantes sur la compréhension du cancer, les résultats cliniques se font toujours attendre. Pour preuve cette enquête du chirurgien de Leroy d’Etiolles datant de 1844. Rappelons qu’à cette époque, la découverte il y a peu des anesthésiques (chloroforme et éther) permet aux chirurgiens de se lancer plus facilement dans l’opération de tumeurs cancéreuses. Cette enquête montre que la survie à trente mois est moins fréquente chez les femmes opérées que celles ayant suivi un traitement par médicament ou aucun traitement (18 sur 1192 pour celles non opérées, et 4 sur 804 pour celles opérées). Ces résultats postopératoires montrent encore les progrès que devront réaliser les médecins du XIXème et du XXème siècles [208]. Avant de finir sur cette courte histoire du cancer, penchons nous sur une dernière étude menée en 1775 par le chirurgien anglais Percivall Pott. Celui-ci s’intéresse aux petits ramoneurs de Londres, et une maladie que nombre d’entre eux développaient : le cancer du scrotum. Il montre ainsi qu’un contact cutané régulier entre le scrotum et les suies imprégnées sur la corde peut provoquer un cancer. En effet, pour nettoyer les cheminées, les petits ramoneurs se tiennent à une corde sur laquelle ils glissent. C’est la première étude épidémiologique sur le cancer, et aussi le premier cancer professionnel. Malgré cette étude, il faudra attendre 1840 pour que le ramonage soit interdit à toute personne de moins de 21 ans.

C. Le cancer, une maladie génétique

Aujourd'hui, les connaissances sur le cancer ont explosé. Pourtant la maladie ou les maladies cancéreuses restent encore une pandémie mondiale.

1. Du gène au cancer

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent sur l'immunité, tous les êtres vivants, virus compris sont constitués d'acides nucléiques. Ces acides sont les briques élémentaires de notre information. Nous pourrions les comparer aux bits utilisés en informatique, l'information élémentaire prenant 4 états et non seulement deux. Ces quatre acides ont pour acronyme A, C, G et T pour Adénine, Cytosine, Guanine et Thymine. Lorsque ces acides se lient entre eux, ils forment alors une double chaine plus connue sous le nom d'ADN (Acide Désoxyribonucléique, voir *Figure VII-5*). Ces deux chaines ne sont pas pour autant indépendantes. En effet, si l'on y regarde de plus près, on s'aperçoit qu'une certaine complémentarité existe entre elles. Une Adénine se retrouve toujours en face d'une Thymine, et il en va de même pour la Cytosine et la Guanine. Ceci permet une redondance de l'information et donc d'augmenter la fiabilité des données. Ainsi, si une des chaines perd des acides nucléiques, la cellule pourra reconstituer ces lésions en plaçant les acides complémentaires à ceux provenant de l'autre chaine. Dans le noyau nos 3.2 milliards d'acides nucléiques sont compactés en 48 lots distincts appelés chromosomes. Si l'on examine en détails notre ADN, on constate que l'on peut classer ces chromosomes en 24 paires (sauf pour les hommes qui n'ont que 23 paires symétriques et deux chromosomes sexuels non identiques). Ce classement en paires vient du fait que nous recevons 24 chromosomes de notre mère et les 24 autres de notre père (brassage génétique). Nous ne sommes pas en effet des clones de nos parents, mais une somme de leur patrimoine, formée aléatoirement parmi leurs 48 chromosomes.

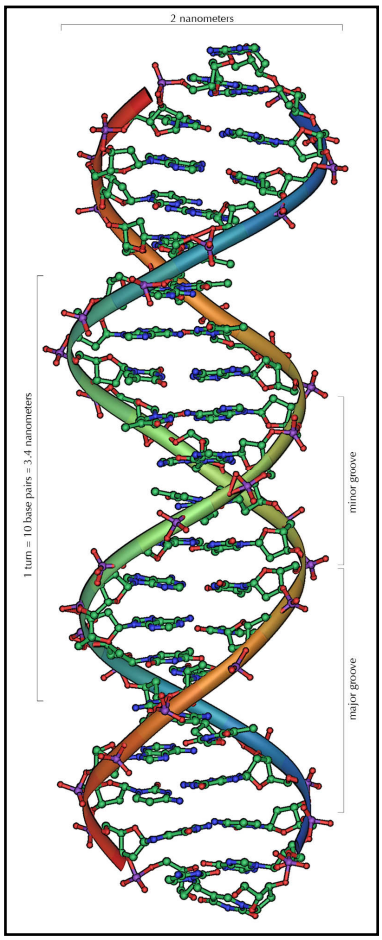

Figure VII-5 : Structure de l'ADN en double hélices.

Seule une petite partie de l'ADN est traduite en une information exploitable par la cellule. Cette information utile est regroupée en petites entités formées par une suite d'acides nucléiques bien organisés : avec un début et une fin. Cette entité est appelée un gène. Pourtant les données contenues par le gène ne sont pas exploitables directement, elles ont besoin d'être transcrites et envoyées par un messager en dehors du noyau cellulaire. Ce rôle est attribué à l'ARN (Acide Ribonucléique). Une fois en dehors du noyau, l'ARN va permettre à la cellule de synthétiser une protéine selon l'information contenue par celle-ci. Elle peut aussi, dans certains cas, être directement utilisée comme catalyseur enzymatique ou même comme ARN interférent (limite ou empêche l'expression d'un ARN et donc indirectement celle d'un gène).

Les protéines synthétisées via l'ARN messager sont les principaux constituants de notre corps. On les retrouve partout : enzyme, hémoglobine (transport de l'oxygène), hormones, récepteurs membranaires, anticorps, cytosquelette…

Combien de gènes sont alors nécessaires pour contrôler un corps aussi complexe que le nôtre ? Ce défi lancé au début des années 90, aura pris un peu plus d'une dizaine d'années pour aboutir et nous permet de connaitre la grande majorité du génome humain. Au début de ce programme, les scientifiques espéraient trouver au moins 100 000 gènes pour notre espèce, d'autant qu'au cours de ces années, le séquençage de la bactérie Escherichia coli nous apprend qu'elle possède un peu plus de 5000 gènes [209]. Puis en 2000, on découvre que la mouche Drosophile a environ 13 000 gènes [210]. Deux ans plus tard le séquençage de la souris est annoncé à plus de 24 000 gènes [211]. A la fin de l'année 2003, le nombre de gènes pour l'espèce humaine est annoncé, et étonnamment il ne serait qu'au maximum de 25 000 [212]. Ce séquençage aura permis une avancée cruciale dans la compréhension du cancer car lorsque l'on observe avec attention ce que devient un gène modifié, on constate que l'ARN messager sera lui aussi touché, entrainant une cascade de disfonctionnements selon la nature du gène. Prenons le cas d'un gène dont la protéine associée permet de surveiller l'état du génome de la cellule. Cette protéine permet entre autres de vérifier si l'ADN n'a pas était lésé. Si c'est le cas, elle arrête la division cellulaire pour permettre à celle-ci de se réparer. Dans le cas où la réparation est impossible, elle pousse la cellule à la mort par apoptose. Ce gène est connu sous le nom de *p53*. Lorsqu'il est inactivé suite à une mutation génétique, il augmente considérablement les risques de cancer. On retrouve ainsi cette mutation dans plus de 50% des cancers humains.

2. Gènes suppresseurs de tumeur et proto-oncogènes

Nous touchons enfin la cause du cancer, c'est une maladie du génome, ou plus simplement une ou des erreurs dans le code génétique de la cellule. Toutefois, quand nous regardons avec attention le Téléthon au mois de décembre, nous découvrons un grand nombre de maladies génétiques. Mais ces malades ne souffrent pas en général (heureusement) de cancer. Il semble donc que la maladie « cancer » soit localisée à un certain nombre de gènes. Reste à savoir comment identifier cette famille d'oncogènes parmi les 25 000 gènes que compte notre génome. Le travail consiste alors à séquencer le génome de cellules cancéreuses et à le comparer à celui d'une cellule saine. Ce travail fastidieux débouchera en 2004 sur l'identification de 291 oncogènes [14]. A la base, ces gènes sont essentiels à la vie de la cellule. Chacun de ces oncogènes apportera selon sa nature une perte ou un ajout de fonction à la cellule. Malheureusement, cette perte ou cet ajout ne sera pas un atout pour notre corps. En effet, cette cellule ainsi modifiée perdra des restrictions ou gagnera des capacités par rapport autres cellules. En particulier, celle de se multiplier indéfiniment.

Intéressons-nous tout d'abord au cas où la cellule perd une fonction de son métabolisme. Dans cette éventualité, ce sont en général des gènes dit suppresseurs de tumeur qui sont mis en cause. En effet, ces gènes ont pour fonction de protéger la cellule contre les mutations en réparant si possible les erreurs ou en entrainant la mort de celle-ci en cas

d'erreurs trop importantes. Le gène *p53*, dont nous parlions précédemment fait partie de cette famille de gènes suppresseurs de tumeur. Lorsque ces gènes sont mutés, les protéines issues de ceux-ci seront généralement inactives, ceci, entrainant la cellule dans un cercle vicieux de mutations génétiques. Heureusement, ces gènes sont si vitaux à notre survie qu'ils sont dit co-dominants. Cela signifie, que les deux copies de ces gènes sont autonomes. Dans l'hypothèse où une des copies est touchée et du coup inactive, l'autre pourra la remplacer. Si la cellule est de nouveau touchée par une mutation sur le dernier gène encore sain, alors dans ce cas la cellule basculera très probablement vers le cancer.

Chez certains individus, leur génome ne possède qu'une copie du gène suppresseur de tumeur ce qui les rend plus susceptibles de développer un cancer. On parle alors de mutation germinale (qui touche la cellule œuf). Dans les autres cas on parle de mutation somatique. Par exemple, les individus ne possédant qu'une copie du gène *p53* souffrent du syndrome de Li-Fraunemi qui malheureusement augmente leur risque de cancer de 80% pour les femmes à 50 ans et de 40% pour les hommes au même âge. Cependant, une mutation des gènes suppresseurs de tumeur ne suffit pas à rendre la cellule cancéreuse. Elle rend certes la cellule instable génétiquement et insensible à cette mutation, mais ce sont les mutations qui touchent les proto-oncogènes qui vont entrainer définitivement la cellule vers le cancer (*Figure VII-6*).

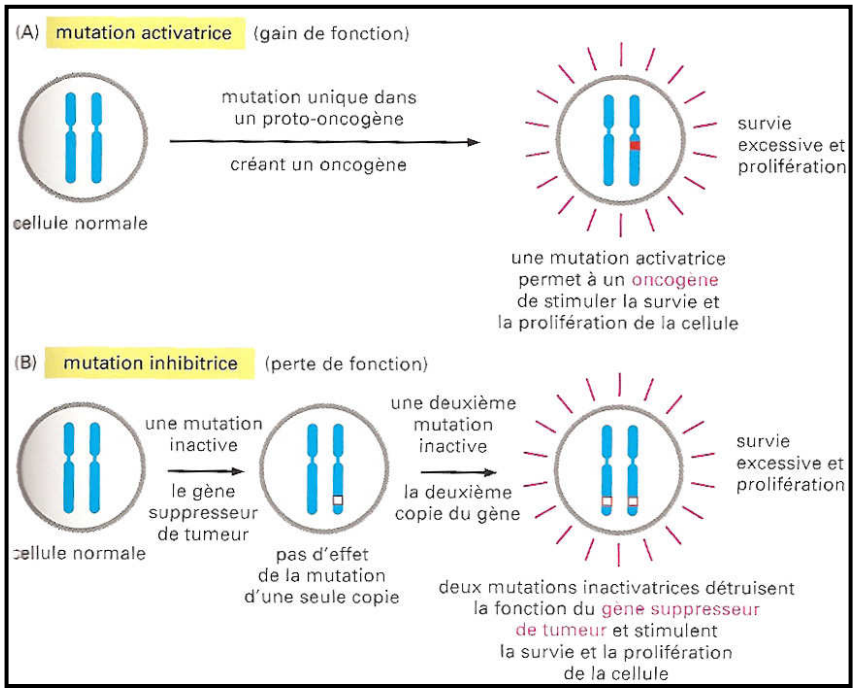

Figure VII-6 : Proto-oncogènes et gène suppresseur de tumeur [Alberts][11].

Nos cellules sont en permanence en relation les unes avec les autres. Ainsi, comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'immunité, les cellules peuvent mettre fin à leur vie pour faciliter le passage des globules blancs ou inversement, elles se divisent pour reconstruire les tissus endommagés après une blessure. Tout ceci est régulé via des signaux provenant des autres cellules : immunes, endothéliales, neuronales… Ces signaux interagissent directement avec les récepteurs de la cellule, entrainant une cascade de réactions à l'intérieur de celle-ci.

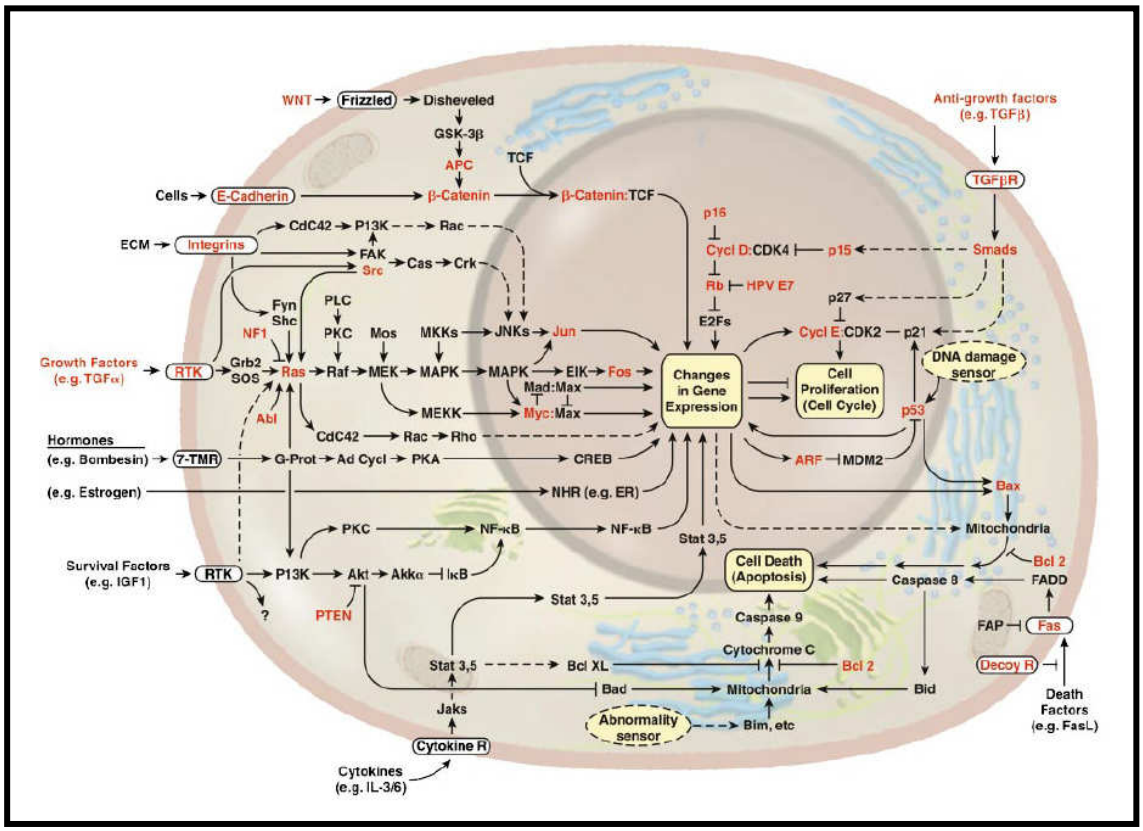

Figure VII-7: Diagramme décrivant les principales voies de signalisation impliquées dans le cancer. En rouge, les protéines issues de proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur. [Hanahan][17].

Si un des gènes participant à ces voies de signalisation est touché, il pourra entrainer des conséquences désastreuses pour la cellule.

Prenons l'exemple, du proto-oncogène *Ras*. La protéine issue de ce gène fait partie du chaînon signalant à la cellule la nécessité de se diviser. En cas de mutation de ce gène, la protéine peut devenir en permanence active, ne nécessitant plus de stimulation extracellulaire. La cellule rentre alors dans un cycle de division incontrôlable par notre métabolisme. De plus, lors de la division cellulaire, elle transmettra cette nouvelle fonction à toutes ses filles, créant ainsi une lignée cellulaire cancéreuse. D'autres proto-oncogènes pourront proférer à la cellule la perte de molécules d'adhésion permettant à ces cellules d'envahir le tissu environnant. D'autres encore rendront la cellule immortelle en reconstituant à chaque division ses télomères (extrémités des chromosomes) évitant sa mort, normalement après quelques divisions. Il y a encore de très nombreux proto-oncogènes qui interviennent dans le cancer, la *Figure VII-7* [17] représente une partie déjà bien complexe de cette diversité.

3. De la perte d'un gène à la métastase : le Cancer colorectal

Pour mieux comprendre l'évolution d'une cellule cancéreuse suivons pas à pas la progression d'un cancer colorectal (inspiré de [213]). L'histoire de la maladie commence avec une inactivation des deux copies d'un gène suppresseur de tumeur dit *APC* (Polypose Adénomateuse du Côlon). Cette première mutation va empêcher l'inhibition d'une protéine qui intervient dans la voie *Wnt*. Cette mutation aura pour conséquence la prolifération de la cellule souche intestinale ainsi touchée. Cette cellule mutante et ses clones formeront alors un polype. A ce stade, on parlera de tumeur bénigne. Ces cellules proliférant plus que la normale augmenteront leurs chances de mutation. Une mutation aura de plus grande chance d'apparaitre sur le gène *K-ras*. Celui-ci fait partie de la famille *ras* qui participe à la régulation des facteurs de croissance. Une fois muté, ce proto-oncogène augmente la prolifération de cette nouvelle lignée cellulaire qui commence à envahir les tissus environnants. A ce moment, la tumeur constitue un adénome de stade très avancé, qu'il faudrait impérativement opérer pour éviter toute complication. Si la tumeur n'est pas supprimée, une de ses cellules risquent fortement de muter encore une fois. Un autre gène suppresseur de tumeur comme le gène p53 risque d'être touché. La tumeur devient alors extrêmement invasive aussi bien dans les tissus que dans la lumière intestinale. La tumeur est maintenant maligne, et s'apparente à un carcinome. Les divisions cellulaires sont de plus en plus nombreuses dans ces cellules génétiquement instables, accélérant l'accumulation des mutations. D'autres proto-oncogènes sont donc touchés à leur tour, rendant les cellules cancéreuses si invasives qu'elles peuvent maintenant migrer dans d'autres organes pour former d'autres tumeurs (métastases). Le cancer est maintenant généralisé (voir résumé *Figure VII-8*). Cette succession d'événement met 10 à 30 ans à se réaliser, et heureusement un grand nombre de polypes restent cantonnés à cet état, n'étant alors que de simples tumeurs bénignes.

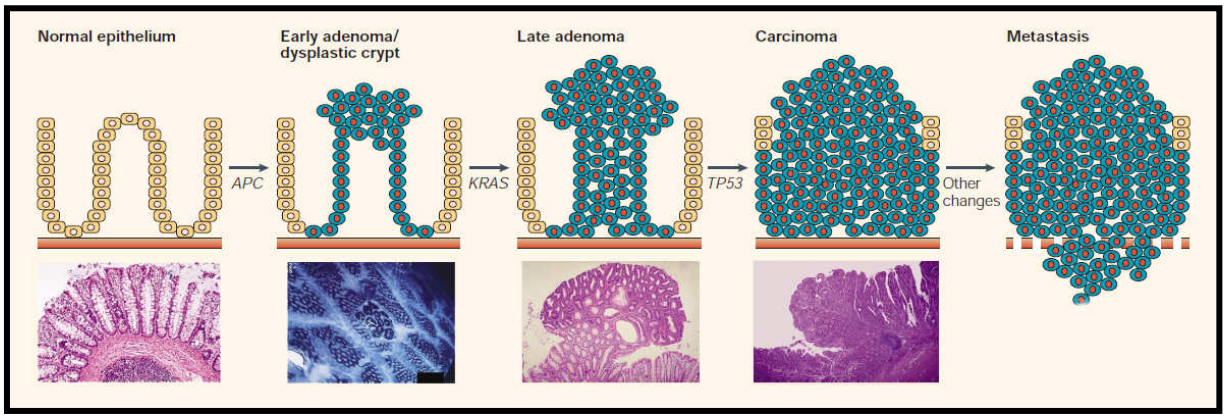

Figure VII-8 *:* Modéle et coupe histopathologique de l'évolution du cancer colorectal [44, 45] [Lengauer, Fodde].

4. La cause de la cause…

Examinons ce qui conduit à la mutation d'un oncogène. Pour cela intéressons nous d'abord à un calcul simple. Considérons une masse de 70Kg (poids d'un humain moyen) composée uniquement de cellules. Nous approximons une cellule à un cube d'arêtes de 10µm, son volume est alors égal à $V_c=10^{-15}m^3$. En faisant l'approximation que notre masse est quasiment due à l'eau contenue dans les cellules, nous pouvons en déduire une valeur

approchée du nombre de cellules (N_c) que contient notre corps en connaissant la densité de l'eau (D_e).

D_e= 1kg/litre, 1000 L=1m3,

D'où $V_c=10^{-12}$L, donc le poids d'une cellule vaut $P_c=10^{-12}$Kg

On en déduit le nombre de cellules contenu dans le corps $N_c = \frac{70}{10^{-12}} = 7\times10^{13}$ cellules

En arrondissant volontairement à une valeur inférieure (nous ne sommes pas constitués uniquement de cellules), nous garderons surtout à l'esprit l'ordre de grandeur suivant : 10^{13} cellules.

Revenons maintenant à la source du problème : la division cellulaire. Lors de la division cellulaire (appelé mitose), l'intégralité du code génétique de la cellule mère est recopiée dans celui de la cellule fille. Malheureusement (ou heureusement pour l'évolution) rien n'est parfait, et malgré une grande précision lors de la copie de l'ADN, des mutations peuvent naturellement apparaitre. Ce taux de mutation spontané a été quantifié entre 10^{-6} et 10^{-7} mutations par gène et par division cellulaire. Environ 10^{16} divisions surviennent au cours de notre vie, exposant un gène donné à au moins un milliard de mutations. Ce qui est surprenant avec ce chiffre, c'est la très forte exposition que nous avons face au cancer. Pourtant, même si nous pouvons développer un cancer au cours de notre vie, nous ne développons pas des millions de cancers, ou tout du moins nous ne nous en rendons pas compte. En fait, une des explications est qu'il faut plusieurs mutations sur une même cellule pour quelle devienne cancéreuse (voir évolution du cancer colorectal), ce qui réduit dans ce cas énormément les chances de développer un cancer, ou prendra beaucoup de temps pour se produire. Ensuite, notre système immunitaire nous protège en partie contre les cellules cancéreuses en les détruisant. Enfin, toutes les mutations sur un proto-oncogène ne mènent pas forcément vers une mutation oncogénique. Une partie des mutations sera très probablement létale pour la cellule.

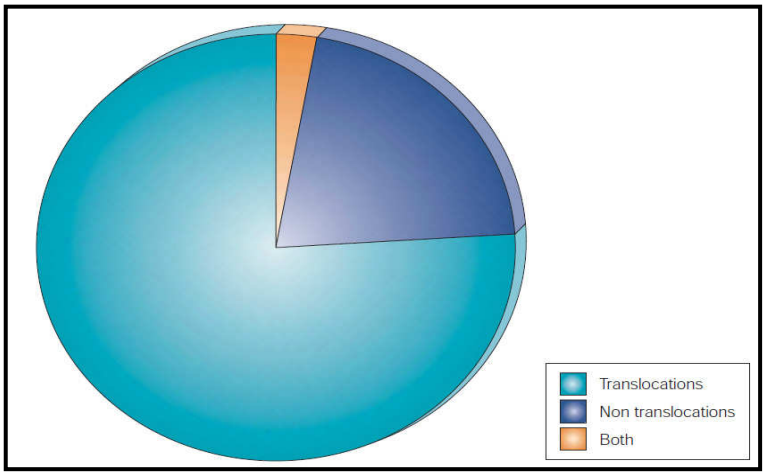

Figure VII-9 : Proportion de gènes touchés par une translocation dans les cancers humains. *[Futreal]*[14]

Trois mutations peuvent toucher notre ADN pendant la division cellulaire : la délétion, la substitution et l'addition. La délétion est une perte d'acides aminés, et inversement l'addition, l'ajout d'acides aminés. La substitution est le remplacement d'acides aminés par d'autres. Ces phénomènes apparaissent en particulier lorsqu'une translocation se produit entre deux chromosomes (*Figure VII-10*). Cette translocation aura pour conséquence de créer un gène chimère ou d'apposer un gène régulateur à un autre gène, entrainant une modification de l'expression de celui-ci. C'est ce type de mutations qui touche à lui seul plus de 75% des cellules cancéreuses (*Figure VII-9*) [14].

Toutefois, la division cellulaire n'est pas le seul acteur pouvant induire une mutation génétique. Les virus, les radiations ionisantes, les produits carcinogènes peuvent, eux aussi jouer un rôle important dans l'apparition de mutations. Mais connaitre leurs impacts sur le cancer se révèle extrêmement compliqué et nécessite des études épidémiologiques. Celles-ci, permettent à l'aide de grandes cohortes, de mieux appréhender l'impact d'un agent extérieur sur une population donnée.

Aujourd'hui, le fait que le cancer soit issu d'une ou plusieurs mutations génétiques fait consensus parmi les experts, le débat n'est pas encore clos et de nouvelles hypothèses seront peut être proposées…

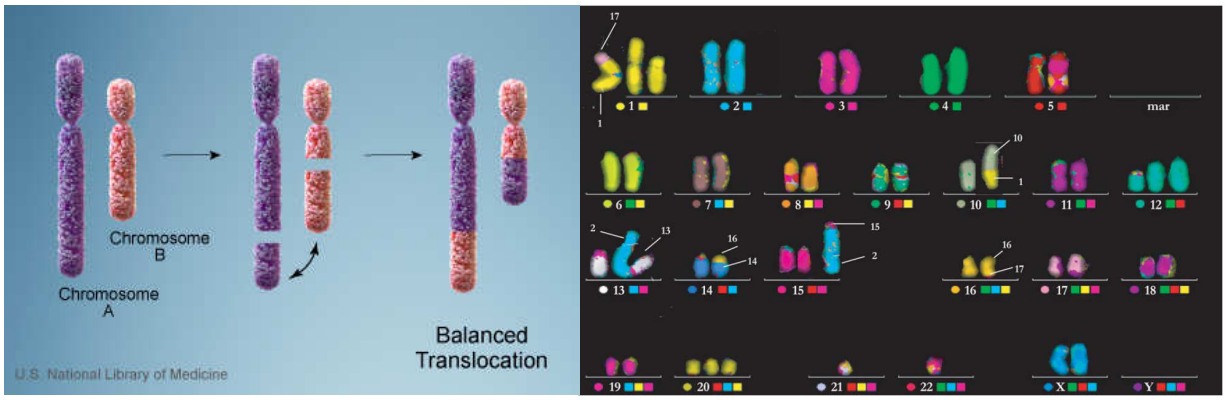

Figure VII-10: Schéma d'une translocation chromosomique (U.S National Library of Medecine) et caryotype d'un neuroblastome avec ses différentes translocations (issu du bulletin du cancer 2004).

D. Études épidémiologiques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'histoire du cancer, la première étude épidémiologique dans ce domaine, nous vient de l'anglais Percivall Pott. Celui-ci avait démontré la relation entre les suies contenues sur les cordes des petits ramoneurs, et le risque élevé pour eux, de développer un cancer du scrotum. Malgré son étude, rien ne sera fait pour protéger les jeunes ramoneurs. Il faudra attendre plus de 70 ans pour voir une loi interdire ce travail aux jeunes hommes. Ceci se passait il y a deux siècles, et aujourd'hui la situation, à bien des égards, n'a pas beaucoup évolué. Les scandales sur le tabac, puis l'amiante au siècle dernier nous montrent à quels points il est difficile de prouver la toxicité d'un produit car montrer qu'un agent est carcinogène chez l'homme relève du défi. En effet, comme nous

l'avons vu précédemment notre corps est tout de même armé pour se défendre contre les mutations génétiques (gènes suppresseurs de tumeur, système immunitaire…). Il faut donc réaliser une étude longue dans le temps (plusieurs dizaines d'années) et sur une population importante (évite les biais), pour démontrer la nocivité d'un produit. De plus, l'étude doit être dirigée par un organisme réellement indépendant.

1. Grandes études épidémiologique et nouvelle législation européenne

Toutes ces contraintes font que de telles études ne peuvent être aujourd'hui financées que par un état développé. Et même dans ces conditions, il arrive que les lobbyings industriels soient si puissants qu'ils arrivent à empêcher la bonne tenue de telles études ou tout simplement à les discréditer ou occulter. Pour la France, l'exemple flagrant fut la gestion de l'amiante. Ce matériau *magique* massivement utilisé un temps dans le BTP (Bâtiment Travaux Publique), regroupe en fait une famille de minéraux à texture fibreuse. L'inhalation de ces fibres durant une longue période entraine l'apparition de différents cancers touchant les organes respiratoires. Plusieurs études scientifiques prouvent la toxicité et dénoncent son utilisation (voir le rapport très intéressant du sénat sur l'amiante [214]). Les industriels français créèrent alors le CPA (Comité Permanent Amiante). Ce comité sera si puissant qu'il imposera massivement ces idées aux différents gouvernements de l'époque. Le titre d'un chapitre du rapport du sénat résume bien la chose : « L'état « anesthésié » par le lobby de l'amiante. CPA, un lobby remarquablement efficace » [214].

La question que l'on peut se poser alors est : comment gérer au mieux toutes ces substances chimiques existantes et nouvelles ? La réponse est venue non pas de notre gouvernement, mais de la commission européenne sous le nom de règlement REACH (Enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques ou en anglais : *Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*). Adopté en décembre 2006 et appliqué en France en juin 2007, il permet de centraliser l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques fabriqués et importés en Europe. Pour cela, une Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA) a été créée. Ce règlement est très complet et très ambitieux [215]. Il couvre toute la vie du produit chimique de sa découverte à son recyclage en passant par sa toxicité, son impact sur l'environnement, son étiquetage etc..

La grande nouveauté de ce règlement est qu'il incombe à l'industriel ou à l'importateur d'évaluer les risques et les dangers liés à ses substances chimiques : Alinéa 25 : « La responsabilité de l'évaluation des risques et des dangers liés aux substances devrait incomber, en premier lieu, aux personnes physiques ou morales qui fabriquent ou importent ces substances, mais uniquement lorsque les quantités fabriquées ou importées dépassent un certain seuil, afin que les intéressés puissent assumer la part de responsabilité qui leur revient. Les personnes physiques ou morales qui manipulent des substances devraient prendre les mesures nécessaires de gestion des risques, conformément à l'évaluation des risques liés aux substances, et transmettre les recommandations pertinentes le long de la chaîne d'approvisionnement. Elles devraient notamment décrire, documenter et communiquer d'une

manière appropriée et transparente les risques liés à la production, à l'utilisation et à l'élimination de chaque substance. » [215]. L'industriel se doit donc de tester son produit en effectuant des tests in vitro et in vivo, et d'appliquer le principe de précaution si nécessaire. Ainsi un produit cancérigène aura de forte chance d'être rejeté ou mis en vente sous des conditions draconiennes. Tout ceci permettra peut-être d'atteindre le souhait de ce règlement : « assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement, y compris la promotion de méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers liés aux substances, ainsi que la libre circulation des substances dans le marché intérieur tout en améliorant la compétitivité et l'innovation » (Article 1er, alinéa 1 [215]).

Pour finir sur cette directive, rappelons juste que le lobby des industriels chimiques français (UIC), farouche opposant à cette directive, a fait évaluer par le cabinet Mercer en 2003 l'impact économique de ce règlement : il revenait à 28 milliards d'euros rien que pour la France. Il semblait donc que REACH allait pousser nos entreprises chimiques droit vers la faillite. Pour éviter toute désinformation, en octobre 2004, le conseil européen a évalué l'impact total de REACH à 4 milliards d'euros soit 0,2% du chiffre d'affaires de la chimie européenne (inspiré de l'article « La Chimie européenne passe aux tests » La Recherche n°392 01/12/2005).

2. Étude de la mortalité par cancer

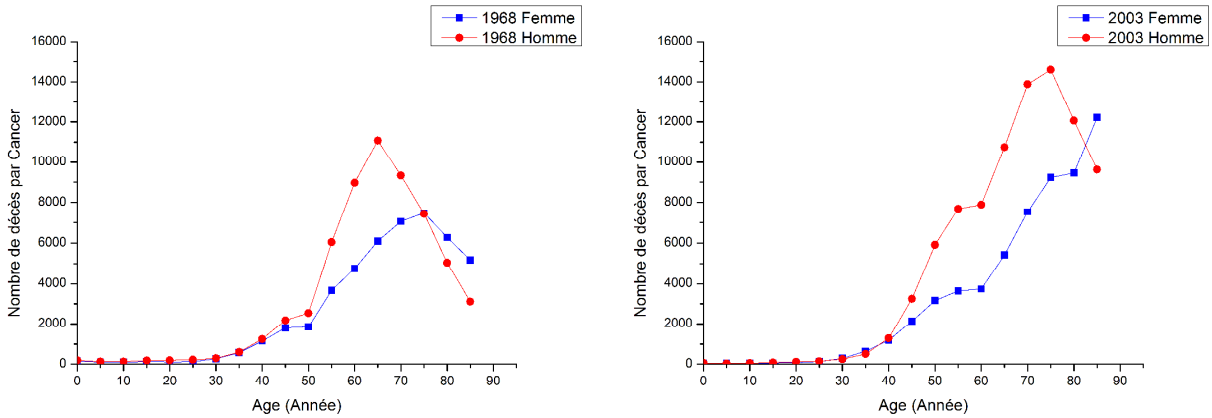

Figure VII-11: Nombre de décès par cancer en France en 1968 et 2003 [IARC][12].

Les graphes présentés dans cette partie ne sont qu'en deux dimensions ne reflétant qu'une partie de l'information. Il faudra donc penser lors de la comparaison entre deux graphes, à bien les mettre dans un contexte identique.

Intéressons-nous aux graphes issus de la *Figure VII-11*. La première chose que nous pouvons remarquer est l'apparition tardive de décès par cancer. Le cancer est donc bien une maladie du vieillissement, nécessitant l'accumulation de mutations génétiques pour devenir dangereux pour l'organisme. Ensuite, nous constatons que les hommes meurent plus de cancers que les femmes. Ceci s'explique par un comportement à risque (alcool, cigarette…) plus important chez les hommes que les femmes. Mais nous pouvons remarquer qu'en 2003 malheureusement, l'écart de mortalité entre les femmes et les hommes a diminué. Ceci étant

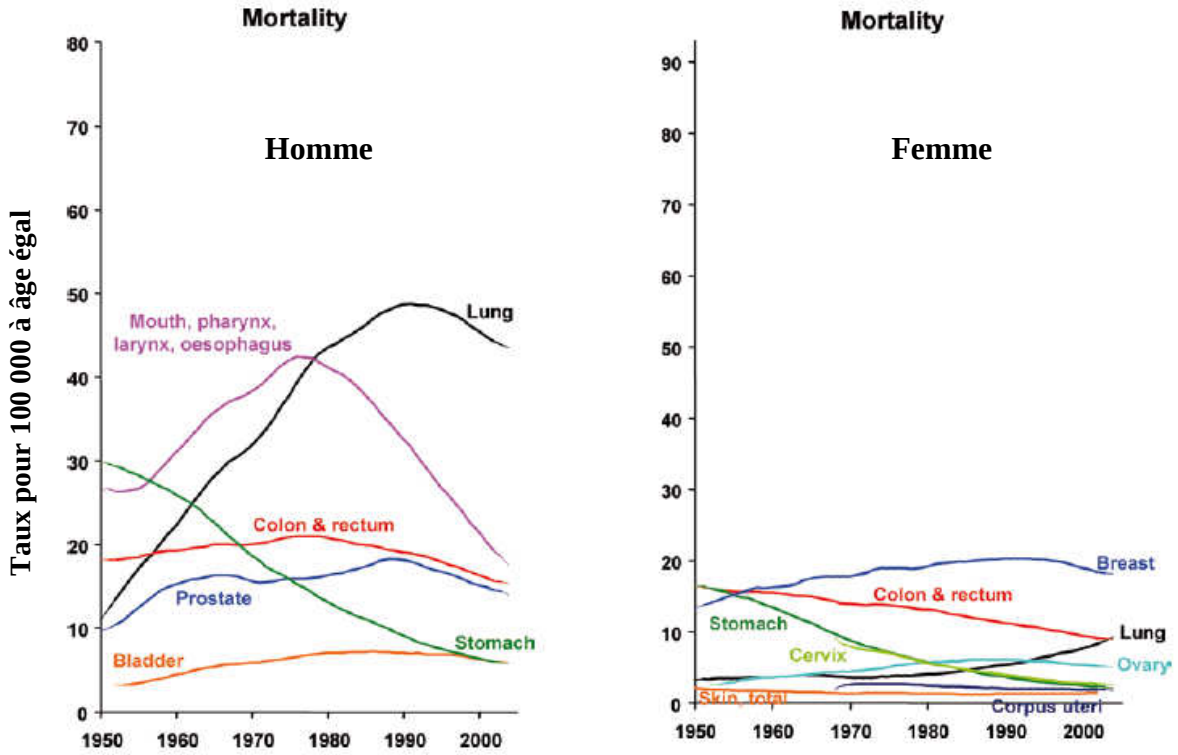

Figure VII-12: Evolution de la mortalité (1950-2004) des principaux cancers en France pour les hommes et pour les femmes [IARC][12].

dû au fait qu'elles fument de plus en plus alors que le nombre d'hommes tabagiques a quant à lui eu tendance à baisser. Enfin, on remarque que le nombre de morts par cancer est beaucoup plus important en 2003 qu'en 1968 (tous sexes confondus). Cette analyse est un artéfact car la population a depuis 1968 énormément augmenté passant de 50 millions à 60 millions en 2003. Et d'autre part, l'espérance de vie a elle aussi augmenté. On explique ainsi logiquement cette augmentation du nombre de décès par cancer. D'ailleurs, si l'on considère une population dans laquelle la proportion d'habitants dans chaque tranche d'âge serait restée constante entre 1968 et 2003, on observe une diminution du nombre de décès par cancer de 8% chez les hommes et de 19% chez les femmes.

Rentrons maintenant dans le détail de ces morts par cancer (*Figure VII-12*). Chez l'homme, on retrouve les principaux cancers dus à la cigarette et à l'alcool: cancer du poumon, de la bouche, du pharynx, du larynx et de l'œsophage. Mais heureusement, grâce aux campagnes d'informations sur la toxicité de la cigarette et la diminution de la consommation d'alcool, ces cancers sont en baisse. Chez la femme, le cancer du sein reste prédominant. Cependant l'accroissement du cancer du poumon suite à une augmentation de la consommation de cigarettes reste préoccupant. Enfin, la chute très importante des cancers de l'estomac chez les deux sexes seraient due à l'utilisation du réfrigérateur (limitation de la contamination bactérienne..) ainsi qu'à l'amélioration du traitement de l'eau.

En général, lorsque l'on étudie la mortalité des différents cancers, on met en parallèle leurs incidences respectives. C'est volontairement que nous ne les avons pas rapprochés car l'incidence du cancer est très difficile à interpréter pour plusieurs raisons. D'une part, la population a une espérance de vie de plus en plus importante. Ensuite, les meilleurs

dépistages de cancers comme ceux de la prostate, du foie, du sein et de la thyroïde font exploser leur incidence artificiellement. Pourtant, leur étude permet de remarquer une augmentation de certains cancers au fil des années comme ceux touchant le cerveau, les testicules et les lymphocytes. Ces augmentations, mêmes si elles semblent aujourd'hui se stabiliser, restent en l'état actuel, des connaissances inexpliquées.

Cette première étude nous permet de voir l'impact désastreux de l'utilisation d'agents carcinogènes comme le tabac sur notre corps. Cependant, il aura fallu plusieurs études pour en prendre conscience : montrer tout d'abord que fumer pouvait provoquer un cancer et prouver ensuite que l'on retrouve bien ce lien dans une grande partie de la population (impact réel). Plongeons-nous dans cette fumée opaque qui perdura pendant longtemps.

3. Tabac et cancer

Aujourd'hui, nous savons que le tabac contient plus de 40 carcinogènes (dont le goudron, le polonium 210…). La nicotine est l'agent de dépendance mais n'est pas un cancérigène. A la base, la nicotine est un insecticide naturel, qui protège la feuille de tabac des attaques des chenilles. Qui aurait pu imaginer qu'en fumant cette feuille, la nicotine passerait dans le sang puis dans le cerveau et interagirait avec un récepteur de certains neurones, provoquant une addiction ?

L'histoire commence en 1950 à Londres. A cette époque, on s'alarme de la forte augmentation du nombre de cancers des poumons. Mais comment déceler l'agent qui provoque cette épidémie ? On pense alors aux émanations des pots d'échappement des voitures, la fumée due à la combustion du fuel, etc.. L'étude est menée dans 20 hôpitaux, et portera sur 649 hommes et 60 femmes ayant un carcinome des poumons [216]. La conclusion est sans appel, 99,7% des hommes étaient des fumeurs et il s'agit du seul lien entre tous les patients. Pourtant, les auteurs ne peuvent pas conclure que le tabac contient l'agent carcinogène et ils ne se permettent pas de conclure que la consommation de tabac est liée à l'augmentation du nombre de cancers du poumon dans tout le pays. Ils lancent alors une étude de plus grande envergure comprenant 40 000 hommes et femmes. Ces hommes et ces femmes sont tous des docteurs anglais, d'où le nom de l'étude : « *La mortalité des docteurs en relation avec leur habitude à fumer..* » [217]. Cette étude sera poussée à 50 années supplémentaires ce qui permettra en 2004 de publier une étude encore plus complète que la première [24]. En particulier, cette dernière permettra de mieux comprendre l'impact de l'arrêt de la consommation de tabac sur l'espérance de vie. Cette dernière étude confirmera encore un peu

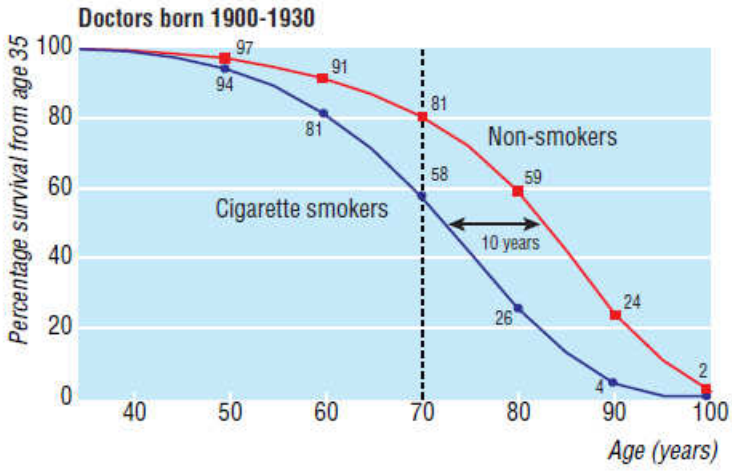

Figure VII-13: Survie des docteurs mâles anglais nés entre 1900-1930 selon qu'ils soient fumeur ou non [Doll][24].

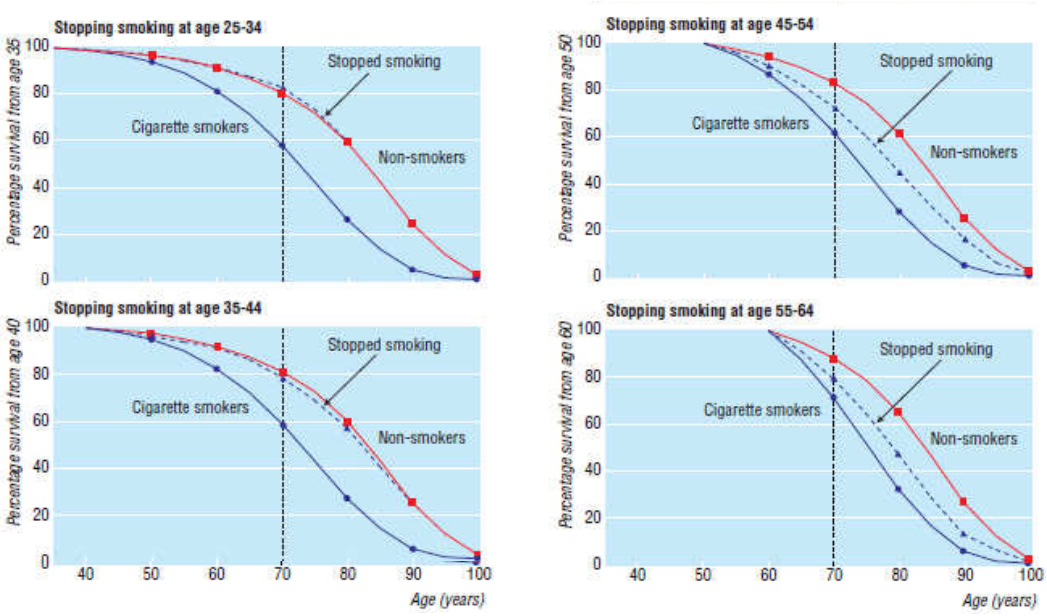

Figure VII-14: Effets sur la survie de l'arrêt de fumer selon différents âges de l'arrêt [Doll][24].

plus toutes les études précédentes sur la relation entre l'excès de cancers des poumons et les personnes tabagiques. Dans cette étude, on apprend qu'en moyenne un fumeur meurt 10 ans plus jeune qu'un non fumeur (*Figure VII-13*). On peut y lire aussi, que l'arrêt de la cigarette permet d'augmenter significativement son espérance de vie (*Figure VII-14*). Il n'est donc jamais trop tard pour arrêter.

D'autres études épidémiologiques ont permis de montrer l'augmentation du risque pour les tabagiques passifs de développer un cancer du poumon. D'autres encore, montreront que le risque de cancer est décuplé quand la personne boit de l'alcool et fume. Toutes ces études pousseront les différents gouvernements à taxer fortement le tabac et à interdire sa consommation dans les lieux publics. Pourtant, aujourd'hui encore, le tabac est la première cause de mortalité par cancer (33,4% des décès par cancer chez les hommes en France).

Nous devons ces études principalement au médecin épidémiologiste anglais Richard Doll (1912-2005). Ces travaux auront permis de sauver des millions de vie en prouvant la toxicité du tabac. Pourtant, une ombre est venue assombrir le tableau. Un an après sa mort, en 2006, le Guardian publie des informations très surprenantes indiquant qu'il était *sponsorisé* par des entreprises ou lobbys [218]. Malgré tout, nous lui devons de grandes études, dont la première tentative de synthèses des facteurs de risque pouvant induire un cancer.

4. Facteurs de risque et décès par cancer

En 1981, Doll et Peto proposent de regrouper les différents facteurs pouvant être la cause d'un décès par cancer. Cette première étude reste très vague avec parfois des incertitudes énormes (fourchette d'estimation entre 10 et 70% pour les cancers liés à la nutrition). Mais elle a le mérite de donner une vision générale des facteurs à risque. Ce type d'études a eu des suites, comme on peut le voir dans le tableau à la *Figure VII-15*, issue du

Facteurs de risque	Doll et Peto 1981 USA		Olsen et al 1997 Pays nordiques		Doll et Peto 2005 UK		Danaei et al 2005 pays niveau de vie élevé	Présent rapport 2007	France	
	% morts par cancer	fourchette d'estimation	% cas de cancer hommes	% cas de cancer femmes	% morts par cancer	Limites d'estimation	% morts par cancer	% morts par cancer hommes	% morts par cancer femmes	% de morts par cancer
Tabac	30	25-40	19	9	30	27-33	29	33,4	9,6	23,9
Alcool	3	2-4	2	1	6	4-8	4	9,4	3	6,9
Agents infectieux	10 ?	1-?	2 (g)	3 (g)	5	4-15	<1,5 (h)	3,3	4,4	3,7
Nutrition	35	10-70	? (d)	? (d)	25	15-35	3 (i)	NI	NI	NI
Obésité et surpoids			<1	1		15-35	3	1,2	2,3	1,6
Inactivité physique			NI	NI	<1	0-1	2	0,5	3,2	1,6
Profession	4	2-8	3	<1	2	1-5	NI	3,7	0,5	2,4
Pollution	2	<1-5	<1 (e)	<1 (e)	2	1-5	NI	0,04-1	0,3	0,1-1
Pollution urbaine			NI	NI			1	NI	NI	NI
Produits industriels	<1 (b)	<1-5	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Additifs alimentaires	<1	0,5-2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Médicaments et procédures médicales	1(a)	0,5-3	NI	NI	<1	0-1	NI	NI	NI	NI
Hormonothérapie substitutive et contraceptifs oraux		0,5-3	NI	NI		0-1	NI	NI	2,2	0,9
facteurs liés à la reproduction	7 (s)	1-13	NI	NI	15	10-20	NI	NI	1,1	0,4
Rayonnements ionisants non médicaux	3 (c)	2-4	<1 (f)	<1 (f)	4	3-5	NI	NI	NI	NI
Rayons ultraviolets		2-4	4	5	1	1	NI	0,6	0,6	0,6
Rayonnements ionisants d'origine humaine	NI (r)	NI	2	3	<1	<1-1	NI	NI	NI	NI

NI : facteur considéré non un facteur de risque de cancer par l'étude - * Figures, limites et « ? » dans le tableau sont rapportés comme dans la publication d'origine
(a) Inclu les irradiations médicales, les agents chimiothérapiques, les contraceptifs oraux, l'hormonothérapie de substitution – (b) Inclut les agents chimiques et physiques introduits dans la vie quotidienne par l'industrie contemporaine. (c) Appelés facteurs géophysiques par Doll et Peto 1981 et incluant les rayonnements non médicaux et les ultraviolets. (d) Les auteurs ont considéré que les données sont insuffisantes pour calculer la fraction attribuable – (e) Limité au tabagisme passif – (f) Limité au radon – (g) Limité aux infections par hélicobacter pylori. – (h) Limité aux relations sexuelles sans précaution (1%) et seringues contaminées dans le cadre des soins (<0.5%) – (i) Peu de fruits et légumes – (r) Inclus dans la catégorie « médicaments et procédures médicales » - (s) Inclut les comportements sexuels tels que les agents infectieux impliqués dans le cancer du col utérin

Figure VII-15: Contribution des différents facteurs de risque sur le nombre de décès par cancer depuis la publication de Doll et Peto (1981) [IARC][12].

rapport sur les causes du cancer en France [12]. Ce tableau rassemble des études récentes, de chercheurs et de pays différents. Le premier constat que l'on peut faire est le faible écart entre les études récentes, tous facteurs confondus. Ce qui est plutôt réconfortant : mêmes effets, mêmes causes.

Dans ces études, on retrouve les principaux facteurs de cancer que sont l'alcool et le tabac (~30% à eux deux). Mais surtout, nous voyons déjà les effets de l'obésité et de l'inactivité physique sur l'apparition de cancers. Ces effets sont d'ailleurs surement sous-estimés, car n'oublions pas qu'il faut plusieurs dizaines d'années pour qu'un cancer se développe. On peut donc craindre une envolée du nombre de décès par cancer causés par l'obésité dans les années 2020. Pour illustrer cet effet « bombe à retardement », prenons le cas des rayonnements UV. En France l'incidence des décès par cancer des suites à une exposition au rayonnement UV est encore faible (0,6%) mais elle reflète un mode de vie des années 80. Hors, depuis une dizaine d'années le nombre de personnes allant en institut se faire bronzer a considérablement augmenté (13% des Français ont utilisé ces installations en 2000). On devrait donc bien mieux évaluer l'impact de ce comportement d'ici quelques années.

D'autres causes de décès par cancer sont connues depuis bien longtemps, comme les agents infectieux (un peu moins de 4% des décès par cancer). Ces agents infectieux sont principalement des virus, qui lorsqu'ils contaminent la cellule, vont injecter leur génome. Celui-ci, va ensuite migrer vers le noyau pour s'insérer dans notre génome et utiliser notre machinerie cellulaire avec ses propres informations. Le problème survient quand le génome viral s'intègre à notre ADN. Il peut alors transformer un proto-oncogène en oncogène.

Aujourd’hui, la plupart des virus ayant un pouvoir oncogénique sont bien connus, ce qui a permis en 2006, de lancer un vaccin contre une famille de papillomavirus responsable de cancers du col de l’utérus. Grâce à ce vaccin, on espère éviter à terme, le décès d’un millier de femmes françaises.

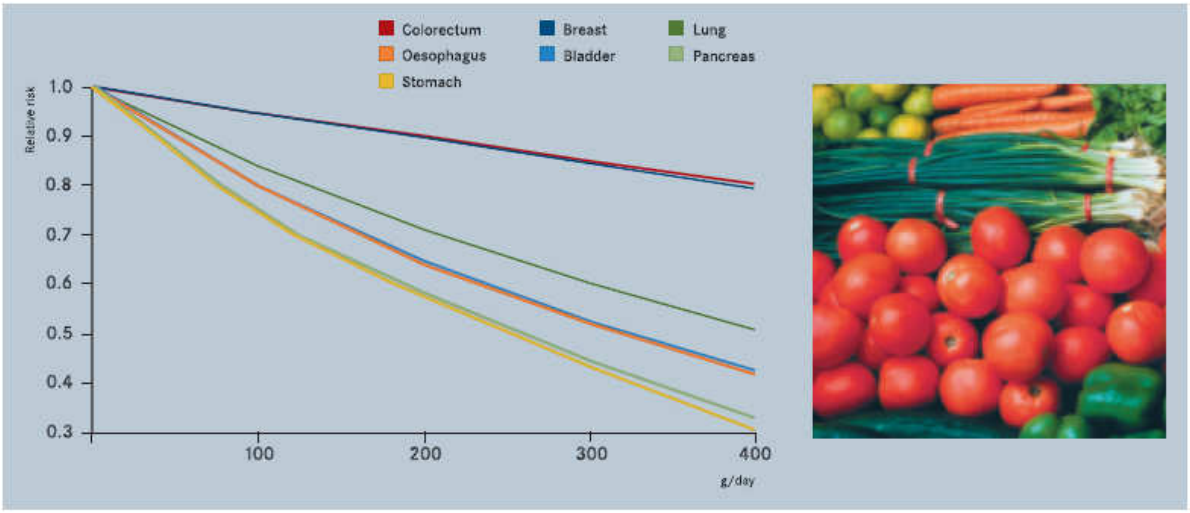

Figure VII-16: Consommation de fruits et légumes associée à la réduction de risque de différents cancers (Colorectal, Sein, Poumon, Œsophage, Vessie, Pancréas, Estomac) [IARC][7].

E. Dépister, trouver, diagnostiquer

Depuis plus de 2000 ans, un *bon* médecin est capable de diagnostiquer certains types de cancers. Pour autant, c'était le patient qui se plaignant de gênes ou de douleurs, pouvait amener le médecin à diagnostiquer un cancer. Mais depuis une vingtaine d'années on cherche à provoquer sa découverte dans les populations à risque. Cette pratique du diagnostic systématique est plus connue sous le nom de dépistage. Ce dépistage a été rendu possible avec l'avancée des technologies de l'imagerie et de la biologie. Pourtant, depuis quelques années le dépistage du cancer est en pleine tourmente : coût important, effet peu convaincant pour certains, mal utilisé… D'un autre côté, il est primordial de suivre une population à risque pour prévenir au mieux l'apparition de tumeurs malignes. Toujours est-il, que faire une fois le cancer découvert ? Le médecin s'évertuera à faire un bilan détaillé de la tumeur : type et état clinique. Une fois ce bilan dressé, le médecin sera à même de prévoir un pronostic et d'adapter la meilleure thérapie. Commencera alors un long combat pour le malade.

1. Trouver ?

Avant même de lancer un dépistage ou de diagnostiquer un cancer, que doit-on chercher ? La réponse peut paraître évidente : une tumeur ! Mais comment différencier une tumeur du reste des tissus ? Rappelons-nous qu'une cellule cancéreuse est avant tout, une cellule qui va proliférer plus que la normale. De ce fait, elle va envahir un tissu ou un espace libre. Cette invasion, se faisant de plus, de façon inorganisée, il sera possible d'observer un contraste entre le tissu sain et la tumeur. Il parait donc évident que si la tumeur se développe localement, elle prendra de plus en plus de place, permettant si elle affleure, à un œil averti de discerner une déformation locale des tissus. Si elle est un peu plus en profondeur, une palpation ou un toucher peut permettre de la déceler. Évidemment, dans ce cas précis, il faut que la tumeur ait atteint une taille déjà importante pour être repérable. A ce moment, le patient ne ressent peut-être aucune gêne venant de la tumeur. Il revient donc au médecin d'ausculter son patient si celui-ci fait partie de la population à risque. Les exemples les plus courants sont la palpation des seins par la/le gynécologue et l'examen des grains de beauté par la/le dermatologue. Ce premier type de dépistage est accessible partout si le personnel est formé et que le patient a connaissance et accès à ce type de soins. Le patient peut aussi consulter son médecin pour signaler des troubles persistants. Dans ce cas, certains signes peuvent être révélateurs de la présence d'une tumeur. On peut citer en plus des deux précédemment signalés (masse et modification d'un grain de beauté) : saignements et écoulements anormaux, modifications du transit intestinal ou des mictions (uriner), plaie qui ne cicatrise pas, toux persistante ou enrouement et enfin trouble digestif ou de la déglutition. Si le patient se révèle avec un de ces symptômes, le médecin se retrouve avec une présomption de l'existence d'une ou plusieurs tumeurs. Mais comment recueillir plus d'informations sans recourir à la chirurgie (laparotomie exploratrice) ?

2. L'imagerie médicale

La réponse est l'imagerie médicale, qui a fait depuis une vingtaine d'années un bon technologique impressionnant. On peut classer celle-ci en cinq techniques différentes, basées

chacune sur un phénomène physique différent : les rayons X, les champs magnétiques, la radioactivité, les ultrasons et enfin la lumière visible. Leur utilisation permet d'obtenir des informations sur l'anatomie de la zone étudiée. On parle alors d'imagerie structurelle. Dans certains cas, on peut aussi recueillir une information dans le temps et l'espace, permettant d'avoir une imagerie fonctionnelle. Regardons un peu plus dans le détail chacune de ces technologies.

L'utilisation des rayons X pour l'imagerie médicale est la plus ancienne des techniques. Elle a débuté avec son découvreur, Wilhelm Röntgen (1845-1923) en 1895, qui pour présenter ces travaux sur les rayons X, décide de faire une image de la main de sa femme. La radiologie est née. Aujourd'hui encore, on utilise ce type de technique qui consiste à illuminer la zone d'intérêt et de regarder sur film photosensible (ou photodiode pour les appareils récents) le passage des rayons X à travers le corps. Les rayons X étant fortement absorbés par les tissus denses (les os), et peu par les tissus dits « mous » (peau, graisse, muscles..), on obtient alors une image contrastée. Cette technique est utilisée pour la radiographie pulmonaire et osseuse, et la mammographie. Depuis une trentaine d'années est apparue dans les hôpitaux la tomodensitométrie (TDM) ou scanner. Cette fois-ci, on va utiliser un faisceau de rayons X qui va balayer le patient, formant ainsi une suite de coupes (principe de la tomographie). Ensuite, grâce à la puissance de calcul d'un ordinateur, il est possible de faire une reconstruction 3D de la zone scannée. Avant la radio, on injecte souvent un produit de contraste (en générale de l'iode) qui absorbe les rayons X, améliorant ainsi l'image du réseau vasculaire ou de certains organes. La résolution de cet appareil peut être submillimétrique, ce qui permet de discerner facilement des tumeurs supérieures à 1cm, même si celles-ci sont localisées profondément dans le corps. De plus, en s'appuyant sur la reconstitution 3D, il est possible de proposer le meilleur chemin pour effectuer une biopsie pour la suite des examens. Enfin, le TDM est utilisé aujourd'hui en standard dans les hôpitaux, et il permet un suivi efficace de l'évolution de la tumeur. Le TDM utilisant une source ionisante, il est important de respecter les règles de radioprotection.

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRMN) est basée sur l'utilisation des champs magnétiques pour interagir sur le moment magnétique de spin des atomes. Elle est plus connue sous le nom d'IRM, le N étant supprimé pour que les patients ne fassent pas l'amalgame avec les rayonnements ionisants ou les bombes nucléaires. L'IRM est

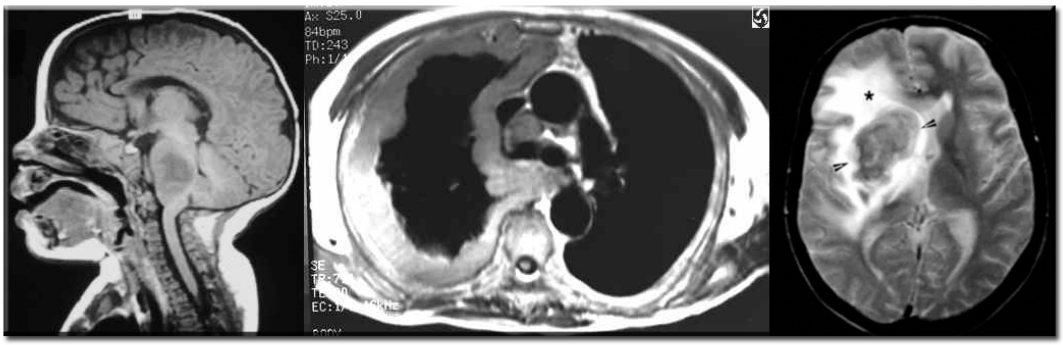

Figure VII-17: Image IRM : à gauche enfant avec une tumeur du pont, au centre travailleur de l'amiante avec un mésothéliome pleural, à droite gliome cérébral.

principalement utilisée à la fréquence pour interagir avec l'atome hydrogène. Cet atome étant présent dans l'eau (H2O) et les tissus organiques, on peut obtenir une image de qualité de presque tout le corps, sauf des poumons (air), des tendons et des tissus osseux. Le principe d'acquisition de l'image est le même que le TDM, s'effectuant par coupes, reconstruites ensuite via un ordinateur (voir *Figure VII-17*). La résolution s'améliore d'année en année permettant aujourd'hui d'avoir une résolution de l'ordre du millimètre. Cet appareil est l'outil privilégié pour l'étude du cerveau. Il permet d'une part, de discerner les parties profondes de celui-ci (le TDM est fortement limité pour ces zones). Et d'autre part, en utilisant le principe de l'IRM fonctionnelle on peut suivre l'évolution du débit sanguin d'une zone du cerveau et le relier ainsi à son activité cérébrale. En ce qui concerne la localisation des tumeurs, l'IRM est particulièrement utilisée pour le cerveau, mais aussi pour le thorax, l'abdomen et l'appareil génital. Il n'y a pas de contre indications majeures, hormis la présence de métaux dans le corps (agrafes, balles, stimulateur cardiaque…). L'utilisation entre un TDM et une IRM (hors étude du cerveau) n'est pas encore bien définie et dépendra du choix du médecin et de l'équipement disponible.

L'utilisation de la radioactivité est basée sur la fixation d'un marqueur radioactif par les tumeurs. Ce marqueur radioactif, en se désintégrant va émettre un rayonnement très énergétique qui sera détecté par une caméra ou un film photosensible. Cet examen est appelé une scintigraphie. Les principaux types de scintigraphies sont la scintigraphie osseuse et la scintigraphie thyroïdienne. Le but de ces examens n'est pas d'avoir une image détaillée de la tumeur mais de détecter sa présence ou non. Elle est donc principalement utilisée pour la recherche de métastases. Depuis une dizaine d'années est apparu le tomographe par émission de positons (TEP). Cet appareil est constitué d'un capteur sensible au rayonnement gamma, qui permet d'identifier la position de la source de ce rayonnement. Comme pour le TDM et l'IRM on effectue des coupes qui sont ensuite reconstituées par un système informatique à

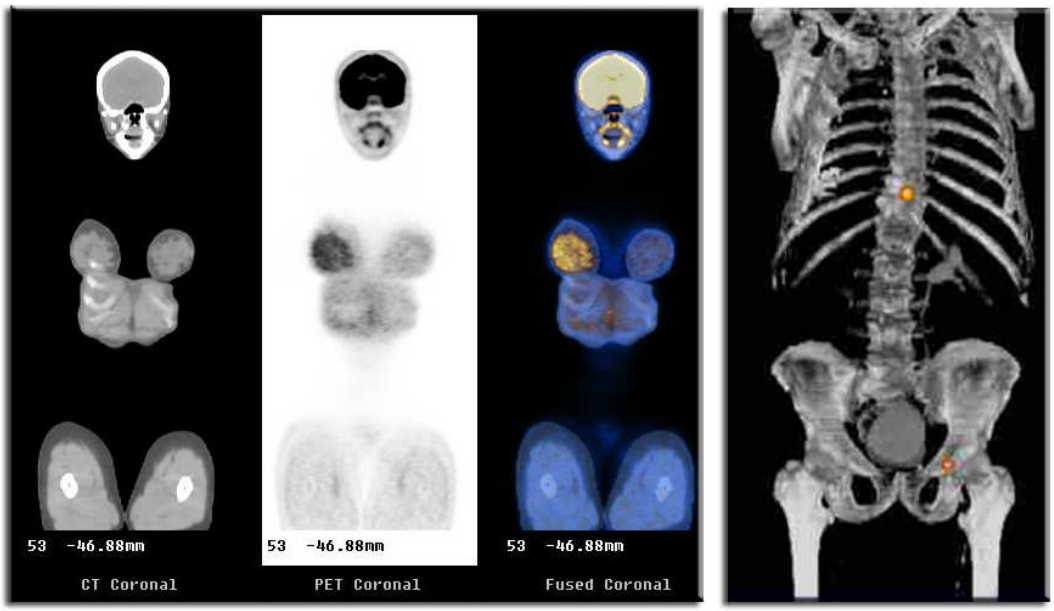

Figure VII-18: image PET-TDM : à gauche cancer du sein droit (TDM, PET, TDM+PET), à droite reconstruction 3D PET-TDM présence de deux métastases osseuses.

l'aide d'algorithmes de reconstruction. Pour la recherche de tumeurs, le principe repose sur le fort métabolisme de celles-ci qui consomment une grande quantité de sucrose. L'idée est alors, de marquer une molécule de sucrose à l'aide d'un isotope radioactif du fluor (18F). On dispose alors d'un traceur qui sera assimilé par la tumeur mais restera bloqué à l'intérieur de celle-ci car il n'est pas métabolisable. Si un patient, ayant absorbé un tel traceur, passe un TEP, on pourra découvrir s'il a des tumeurs ou non (voir *Figure VII-18*). Certains traceurs utilisent les dernières technologies en couplant un anticorps spécifique d'un antigène tumoral à un isotope radioactif. Un tel traceur permet d'avoir une meilleure sélectivité et donc une image plus contrastée. Les derniers TEP sont maintenant couplés à un TDM (bientôt avec une IRM) pour avoir directement un très bon repérage anatomique des tumeurs. La principale contrainte de la TEP est la fabrication des isotopes radioactifs qui ont une demi-vie très courte, nécessitant la présence d'un cyclotron à proximité.

Le TDM, l'IRM et le PET ont révolutionné l'imagerie médicale et malheureusement les coûts hospitaliers par la même occasion. Il faut compter un peu moins de 1 million d'euros pour un TDM, 1,5 million d'euros pour une IRM et 2,5 million d'euros pour un équipement TEP-TDM. S'ajoute à cela un coût d'entretien très élevé dû à la haute technicité des appareils. La palme du coût d'utilisation revient tout de même au TEP, avec l'achat très coûteux, des traceurs radioactifs.

Nous finirons ce paragraphe sur l'imagerie médicale avec l'échographie et l'endoscopie. L'échographie repose sur l'utilisation des ultrasons. Elle est souvent assimilée à un appareil d'imagerie pour les applications obstétriques. Mais elle peut être aussi utilisée pour la détection de certaines tumeurs : cancer de la thyroïde, métastases hépatiques et tumeurs ovariennes principalement. L'avantage de cette technologie est sa rapidité d'exécution et le caractère non contraignant pour le patient. Cependant, le diagnostic est très dépendant de l'opérateur, nécessitant un médecin bien entraîné. Récemment, des améliorations technologiques permettent de mieux visualiser la vascularisation tumorale et de réaliser des images en trois dimensions. L'appareil ayant un coût relativement modeste et étant potentiellement transportable, il sera peut-être à l'avenir un appareil de dépistage fort intéressant.

L'endoscopie est basée sur l'utilisation de la fibre optique. On envoie à travers la fibre de la lumière par intermittence. Pendant les pauses lumineuses, on récupère la lumière réfléchie. La fibre optique se comporte un peu comme un périscope, sauf qu'elle est très mince et flexible. Grâce à cet appareil, on peut explorer les voies respiratoires, digestives, urinaires et génitales. L'examen peut se faire sous anesthésie générale ou non. On a donc la possibilité de localiser et de décrire la lésion (voir *Figure VII-19*). De plus, les endoscopes sont souvent équipés d'appareillages permettant d'effectuer des biopsies des tissus ou même des excisions de petites tumeurs. Il est aussi possible de coupler une sonde échographique pour analyser en profondeur les tissus environnants. Tout ceci fait de l'endoscopie un acteur majeur du dépistage du cancer du colon.

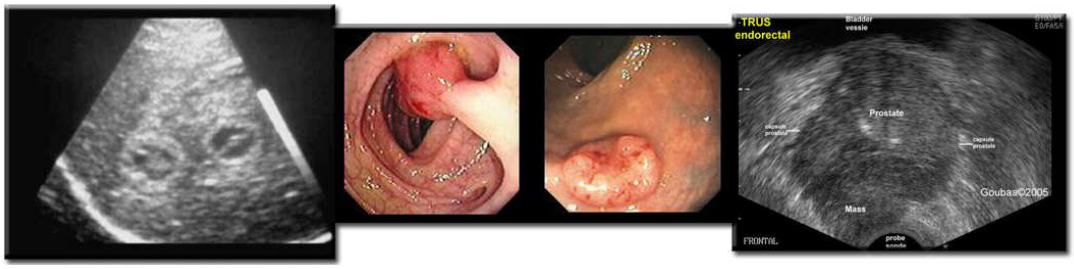

Figure VII-19: Aux extrémités, échographies : à gauche métastase hépatique, à droite tumeur touchant la prostate. Au centre, endoscopies du colon : à gauche polype pédiculé, à droite carcinome.

3. Diagnostiquer pour mieux guérir

Le diagnostic de la ou des tumeurs sera vital pour le patient car c'est lui qui dictera la stratégie thérapeutique. De plus, il doit être rapide et de qualité. C'est principalement sur ce premier diagnostic, que se joueront les chances de guérison du malade. Mais comment arriver aux meilleurs diagnostics ?

L'imagerie médicale apporte déjà son lot d'informations : présence de métastase ou non, forme et délimitation de la tumeur.. Tout ceci permet de dresser un premier bilan, qui va mener à l'examen le plus important pour le diagnostic : la biopsie. Une fois le prélèvement des tissus suspects effectués, celui-ci est envoyé à l'anatomo-pathologiste. Celui-ci, a à sa disposition une armée de tests, du plus simple : analyse histologique au microscope, aux plus modernes : PCR, cytométrie de flux ou encore puce à ADN. Tout ceci lui permet de décrire au mieux la tumeur. Cette description va permettre de donner un nom au cancer et ainsi de l'identifier. En parallèle de l'analyse des tissus, le médecin demandera des tests biologiques. Certains de ces examens biologiques sont essentiels pour aider à définir le type de tumeur, en particulier les dosages hormonaux. L'équipe médicale se retrouve maintenant avec un grand nombre d'informations sur la tumeur, qu'il faut ordonner. Pour ce faire, il existe une classification des tumeurs. Cette classification est très importante car elle va permettre de prévoir le pronostic et d'adapter la thérapeutique la plus indiquée. Par la suite, elle servira aussi à comparer les résultats thérapeutiques entre mêmes groupes de malades, ceci permettant d'améliorer ou d'invalider un traitement donné. Pour réaliser cette classification, on utilise le système de classement TNM. Le T représente l'atteinte locale et il va de 1 à 4 selon l'extension de la tumeur. Le N signale si les ganglions sont touchés (N+) ou non (N- ou N0). On ajoute si besoin, un chiffre compris entre 1 et 3 selon la taille et le siège des ganglions. Enfin le M correspond à la présence de métastase (M1) ou non (M0). Une fois ceci fait, un staff médical va être organisé avec tous les intervenants ayant participé au diagnostic (radiologue, anatomopathologiste, chirurgien..) et aussi avec les futurs intervenants qui participeront au traitement (chirurgien, oncologue, radiothérapeute..). Ils débattent alors du meilleur traitement à prescrire au vue des derniers résultats cliniques connus. Dans le cas où l'équipe médicale participe à un essai clinique, ils pourront juger de la candidature du patient ou non à cet essai.

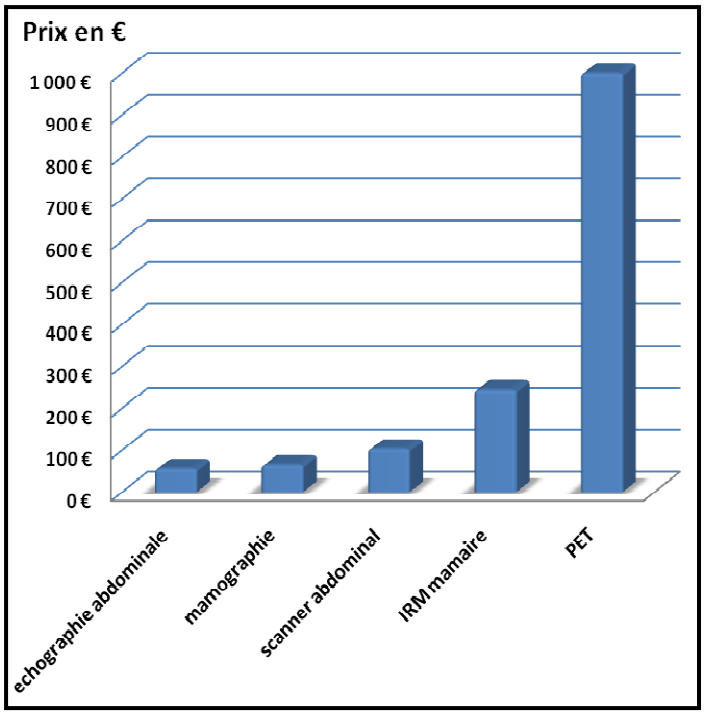

Figure VII-20 : Prix de différents examens d'imagerie médicale.

Le traitement a été décidé, il faut maintenant l'annoncer au patient et lui expliquer comment celui-ci va se dérouler. Les clefs de la suite des événements sont alors entre les mains du patient… en attente de son consentement.

4. Dépister

Avant de nous focaliser sur les différentes façons de guérir un cancer, attardons nous sur son dépistage. Grâce aux progrès technologiques dans l'imagerie médicale et dans les tests biologiques, le diagnostic du cancer devient de plus en plus précis et rapide. On peut se demander pourquoi ne pas faire passer ce type d'examen en routine à une population à risque. Il sera ainsi possible de diagnostiquer un cancer très précocement, et intervenir avant qu'il ne se développe en tumeur maligne. L'idée paraît bonne, mais reste sur une vision du problème un peu simplifiée. Tout d'abord, toutes les tumeurs ne se transformeront pas en tumeurs malignes ou tout du moins, au vu du temps nécessaire pour y arriver, le patient sera depuis longtemps mort de vieillesse. Ensuite, se pose le problème du cout du dépistage (voir *Figure VII-20*). Il paraît impensable de faire en routine un PET pour un dépistage de masse. Il faut donc trouver un bon compromis.

Rappelons d'ailleurs les bases d'un bon examen de dépistage. Celui-ci doit permettre de suspecter un cancer avant l'apparition des symptômes cliniques. Il doit donc être sensible tout en ayant un nombre de faux positifs faibles. De même, le nombre de faux négatifs, doit lui aussi être très faible pour rassurer le patient sur son état de santé. Bien sûr, il faut que les cancers ciblés par le dépistage aient un traitement existant efficace. Des études doivent prouver, que ce dépistage amène une survie plus longue, avec une diminution de la mortalité. L'examen doit être facile à mettre en place et accepté par la grande majorité des patients. Enfin, tout n'étant pas gratuit, il doit engendrer une diminution du coût total de la prise en charge.

Comme nous venons de le voir, lancer un dépistage d'une population à risque relève du défi. Le dépistage du cancer du sein est à bien des égards un exemple de la complexité d'un tel processus [219]. Lancé dans les années 1990 suite à des études épidémiologiques montrant l'intérêt pour les femmes de faire une mammographie régulièrement après 50 ans, il devait permettre de diminuer la mortalité de 30% chez les femmes le suivant. Aujourd'hui, ces études épidémiologiques sont fortement remises en cause et auraient été manipulées. Mais le problème ne s'arrête pas là, car un autre problème inhérent aux dépistages a été montré. Ce

sont les femmes de moins de 50 ans qui passent le plus ce dépistage, alors qu'elles sont les moins visées par celui-ci. En effet, les femmes de moins de 50 ans sont suivies par leur gynécologue qui leur rappelle l'intérêt de la mammographie. Mais une fois ce stade passé, l'information n'étant plus transmise, la plupart des femmes ne passent plus de mammographies alors qu'elles sont la population la plus à risque. Le dépistage de masse du cancer reste donc très compliqué à mettre en place, il doit être proposé de façon réfléchie et surtout en informant régulièrement la population concernée de passer ce dépistage ou même parfois aller à sa rencontre (mammographie mobile…).

F. Guérir ou vivre dans de bonnes conditions avec son cancer

Quels sont les traitements mis à la disposition des médecins pour guérir le cancer? Trois traitements coexistent, pouvant être utilisés séparément ou simultanément. Historiquement, l'un des seuls moyens mis à la disposition des patients souffrant de cancer fut la chirurgie. Puis, avec la découverte des rayons ionisants à la fin du XIXème siècle apparut la radiothérapie. Ensuite, il faut attendre la fin de la seconde guerre mondiale pour que les premiers médicaments anti-cancéreux sortent sur le marché : c'est le début de la chimiothérapie.

1. La chirurgie :

La chirurgie reste le traitement de prédilection du cancer. Avec l'évolution des technologies et des études cliniques, elle a beaucoup progressé. Jusqu'au début des années 90, on privilégiait toujours l'exérèse dit large monobloc. C'est-à-dire que l'exérèse comprendra : la tumeur, une large proportion de l'organe touché par celle-ci, les tissus conjonctifs environnants ainsi que les vaisseaux lymphatiques et les ganglions (lymphadénectomie). Le but étant de s'assurer au maximum de la non dissémination de cellules tumorales dans les tissus avoisinants. On peut citer comme exemple de ce type d'opération une oesophagectomie radicale, une mastectomie radicale, une orchidectomie.. Ces opérations sont évidemment très invalidantes pour le patient et peuvent entraîner une morbidité importante. Heureusement, une alternative a été proposée, consistant à une ablation de la tumeur et des tissus justes environnants (tumorectomie). Durant l'opération, le chirurgien peut pratiquer une ablation du ganglion sentinelle (appelé ainsi car il est le premier en contact direct de la tumeur). Ce ganglion est alors directement transmis à l'anatomo-pathologiste qui confirme ou non sa contamination par des cellules cancéreuses. Si le ganglion est touché, le chirurgien continuera le curage ganglionnaire, sinon il s'arrête là, limitant les risques de lymphoedèmes. L'étude du ganglion sentinelle permettra aussi d'ajuster la suite du traitement selon sa contamination ou non. Pour s'assurer que toutes les cellules cancéreuses ont été éliminées, les médecins couplent la tumorectomie avec une radiothérapie ou une chimiothérapie adjuvantes. Des études cliniques ont montré que ce type de traitement (tumorectomie + radiothérapie) n'augmentait pas le taux de mortalité par rapport à une exérèse large bloc [220].

Il peut arriver que malgré tous les traitements chirurgicaux et autres, le cancer n'arrive pas à être endigué. Dans certains cas, on peut alors proposer au patient une chirurgie

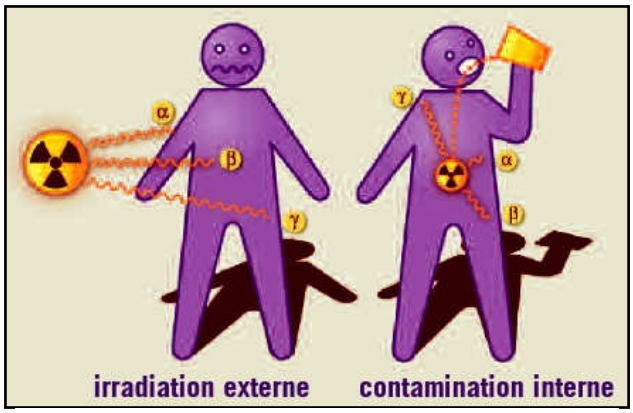

Figure VII-21 : Sources des radiations ionisantes externes ou internes.

palliative. Celle-ci permettra de limiter la progression du cancer, ou la gêne qu'il provoque. Enfin, la chirurgie cancéreuse restant une chirurgie mutilante (physiquement et moralement), on proposera au patient une chirurgie reconstructive si nécessaire.

2. La radiothérapie

Deuxième traitement le plus utilisé après la chirurgie, elle peut être prescrite seule ou couplée (chirurgie généralement). On distingue trois techniques de radiothérapie : la radiothérapie externe, la curiethérapie, et la radiothérapie métabolique. La radiothérapie externe est la plus courante, et se dénomme ainsi car la source de rayonnement est située à l'extérieur du corps du patient. La curiethérapie est basée sur l'utilisation de sources radioactives scellées, placées directement dans les tissus tumoraux ou à proximité dans une cavité naturelle (vagin, utérus, bouche..). Enfin, la radiothérapie métabolique utilise une source radioactive non scellée qui ira spontanément se fixer sur l'organe ciblé. L'exemple le plus connu dans ce cas, est l'utilisation de l'iode radioactive (iode 131) dans le cancer de la thyroïde, l'iode se fixant très fortement aux tissus thyroïdiens.

La radiothérapie est basée sur l'utilisation des rayonnements ionisants. Ceci paraît surprenant, quand on sait que ce type de rayonnement peut induire un risque important de cancers. En effet les rayonnements ionisants peuvent être toxiques ou létaux mais tout dépendra de la zone touchée et de la dose absorbée. Les phénomènes les plus présentés dans les médias sont bien sûr les cas extrêmes d'exposition aux rayonnements ionisants et sont le plus souvent mortels. On peut citer les explosions des différentes bombes atomiques, les accidents de site nucléaire (Tchernobyl en tête), ou l'empoisonnement volontaire au polonium 210 d'un ex-agent russe. Ces cas malheureux, restent heureusement exceptionnels. Pour ce qui est des cas plus réels, nous avons vu précédemment, dans le chapitre sur les causes du cancer, que l'impact des rayonnements ionisants (humain ou non) est infime (voir *Figure VII-15*). Ceci s'explique par notre bonne robustesse aux rayonnements ionisants. Rappelons que la principale source de rayonnements ionisants provient de la radioactivité naturelle (rayonnement cosmique, radioactivité naturelle des sols..) et que celle-ci s'est exercée sur l'évolution du monde animal depuis tout temps. La sélection naturelle a donc favorisé une résistance à ce type de rayonnements. Cette résistance s'est faite de différentes façons : redondance de l'information vitale (double brin d'ADN), réparation possible des informations lésées (gène p53..), première couche cellulaire exposée aux rayonnements extérieurs déjà morte (pas de risque mutagène)… Pourtant, malgré toutes ces protections, notre corps ne peut pas lutter contre un rayonnement trop long dans le temps et/ou trop fort. Mais en quoi le rayonnement ionisant peut-il être délétère pour notre organisme et plus encore pour une cellule cancéreuse ?

Figure VII-22: Accélérateur linéaire pour la radiothérapie : à gauche l'appareil, au centre vue en coupe, à droite collimateur multi-lames permettant de conformer le faisceau à la forme voulue.

Quand on parle d'un rayonnement ionisant, on entend par là que ce rayonnement peut induire lors de son interaction avec un atome, l'éjection d'un électron, produisant ainsi l'ionisation de l'atome touché. Pour réussir à ioniser un atome, l'apport d'énergie par le rayonnement doit être très important. Lorsque celui-ci va toucher une cellule, il va principalement ioniser l'eau, entraînant par réaction chimique la production de radicaux libres. Parmi ces radicaux libres, certains sont particulièrement réactifs, en particulier ceux formés via l'interaction avec l'oxygène (production de peroxyde d'hydrogène, H_20_2). Ces radicaux libres interagiront avec les molécules du milieu comme l'ADN provoquant des effets délétères. Dans le même temps, le rayonnement touche aussi directement l'ADN, l'ionisant, et provoquant ainsi un endommagement local de la molécule. Toutes ces interactions produiront diverses lésions de l'ADN : pontages protéine-ADN, pontage ADN-ADN, cassure simple brin ou double brin. C'est en particulier les cassures doubles brins (non réparables) qui seront des mutations létales pour la cellule. Le rayonnement aura donc un effet plus ou moins nocif sur la cellule selon l'exposition de son ADN, sa concentration en oxygène et ses capacités de réparations (ADN et autres). Si l'on regarde de plus près le métabolisme d'une cellule cancéreuse, on s'aperçoit que celle-ci est souvent en division, ce qui induit une exposition importante de son ADN (dédoublé et décompacté). Ensuite, pour se diviser elle a besoin de beaucoup d'oxygène. Enfin, suite à ses mutations affectant les gènes suppresseurs de tumeurs, son pouvoir réparateur est faible. Tout ceci, fait de la cellule cancéreuse, une cellule très sensible au rayonnement ionisant. On soignera alors le mal par le mal.

Reste maintenant à choisir et à produire un rayonnement ionisant. Historiquement, ce sont les rayons X qui ont été utilisés. Ensuite, sont apparus les accélérateurs de particules permettant le bombardement ionisant à l'aide d'électrons puis récemment de protons et de neutrons. Dans certains cas, les rayons γ sont aussi utilisés. Le choix du rayonnement dépend de la localisation de la tumeur (profonde ou non), de la présence d'organes sensibles et de l'existence de l'appareillage nécessaire. Par exemple, on utilisera en priorité les électrons pour une tumeur affleurant, car ceux-ci interagissent très fortement avec la matière, mais préserveront du coup, les tissus situés en profondeur. Les protons seront plutôt utilisés lorsque l'on aura besoin d'une irradiation très précise. Leur utilisation est néanmoins très limitée car leur production nécessite un cyclotron. Pour mesurer la dose de rayonnement reçue par le

patient, une unité a été imposée c'est le Gray (Gy). Un Gray représente une énergie d'un Joule absorbé par 1 kilogramme de matière. Pour donner un ordre d'idée, une irradiation corporelle totale de 5 Gy chez l'homme, entraîne 50% de décès en 15 jours. Pourtant, lors du traitement du malade la dose moyenne est plutôt aux alentours de 60 Gy. Comment le malade fait-il alors pour survivre ? Tout d'abord, la dose est fortement localisée à la tumeur. Ensuite, la dose n'est pas délivrée en une fois mais est fractionnée. Ceci a pour avantage de laisser le corps récupérer et en même temps, facilite l'accès à l'intérieur de la tumeur car celle-ci est beaucoup moins radiosensible du fait de sa mauvaise vascularisation (angiogénèse anarchique). A chaque cure de rayonnement, on tue donc la couche externe de la tumeur. Au fur et à mesure, on arrive ainsi à stériliser complètement les tissus cancéreux. Une séance classique de radiothérapie externe est de 2 Gy par jour, 5 fois par semaine pendant 4 à 6 semaines selon la dose prescrite. Dans le cas de la curiethérapie, le fonctionnement est un peu différent. Étant directement en contact, voir dans la tumeur, on peut soit injecter un radioélément de très forte intensité ponctuellement (quelques minutes) ou laisser un radioélément de faible intensité pendant plusieurs jours.

Les effets secondaires sont importants surtout au niveau des tissus à renouvellement rapide (sensibilité accrue aux rayonnements). On peut citer les réactions aiguës de la peau et des muqueuses mais aussi une asthénie, des nausées, une anémie, une leucopénie… Ces effets secondaires nécessiteront un bon suivi des patients pendant plusieurs mois après leur traitement aux rayons.

La radiothérapie peut être utilisée seule pour lutter contre le cancer. On parle alors de radiothérapie exclusive. Ce cas est tout de même prescrit dans des cancers encore limités et radiosensibles. La radiothérapie est le plus souvent couplée à la chirurgie, soit en préopératoire pour faire régresser le volume tumoral et ainsi faciliter l'opération ou en postopératoire pour réduire les risques de récidives. Dans certains cas, on peut associer la radiothérapie à la chimiothérapie, pour des tumeurs présentant un grand potentiel de dissémination et chimiosensibles. Enfin, comme la chirurgie, la radiothérapie peut être envisagée pour des soins palliatifs ou symptomatiques. Les doses seront généralement plus faibles pour limiter la morbidité, mais permettront de freiner pendant un temps l'évolution de la maladie.

3. La chimiothérapie

Il s'agit sûrement du traitement le plus appréhendé par les patients. Il est pour eux, une prise de conscience de leur maladie bien difficile à admettre. Avant la chimiothérapie, le patient pouvait ne souffrir que très légèrement de son cancer. En prenant ce traitement, il va subir de plein fouet les effets secondaires et se sentir réellement malade. Cependant, si les chimiothérapies n'ont pas trop évolué depuis 20 ans, leurs effets secondaires sont beaucoup mieux compris et traités. Mais comment se fait-il que ce traitement soit aussi nocif pour notre corps ?

La chimiothérapie a pour principe de jouer sur la différence de sensibilité à un principe médicamenteux, entre la cellule cancéreuse et la cellule saine. Le but étant que l'effet délétère

soit exacerbé chez la cellule cancéreuse. Quelle cible choisir alors contre le cancer ? Simplement, ce qui fait sa principale différence : son taux de division cellulaire anormalement élevé. La chimiothérapie est donc un poison pour les cellules en division. Le principe est alors de *brûler* toutes les cellules en division cellulaire dans le corps, saines ou cancéreuses. Pour cela, le médecin a de nombreuses molécules antimitotiques à sa disposition dont voici les plus connues. Les antimétabolites auront pour but d'inhiber la synthèse des acides nucléiques (brique de base de l'ADN) empêchant ainsi la duplication de l'ADN lors de la division cellulaire. Dans cette famille, on peut citer les anti-foliques tels que le Méthotrexate ou les molécules mimant les acides nucléiques tel le 5-Fluoro-Uracile. Une autre famille est basée sur l'utilisation des Alkylants, qui vont venir s'accrocher très fortement à l'ADN. Limitant son dédoublement et bloquant aussi sa transcription, tout cela aboutira à l'échec de la division cellulaire. Le cyclophosphamide et le cisplatine sont ce type de médicaments. Une autre famille très importante est l'utilisation d'anti-topo-isomérases I et II. En bloquant l'action de la topo-isomérase, la cellule sera alors incapable de décompacter (démêler) son ADN et donc de commencer sa division. Le médicament le plus connu de cette famille est le VP-16. Enfin, nous pouvons citer les poisons du fuseau (permettant aux cellules de se diviser) qui empêchent sa synthèse (exemple : vincristine) ou le stabilise de manière irréversible (famille des Taxanes : Taxotère^{TM}..).

Avec toutes ces molécules, on pourrait se dire que plus aucun cancer ne pourrait résister. Pourtant, les cellules cancéreuses développent très rapidement une résistance à un anticancéreux. Le principe de résistance est très proche de celui des virus ou des bactéries face à un médicament. En se multipliant énormément, on entraîne l'apparition de lignée légèrement différentes, qui par sélection naturelle pourront alors devenir résistantes à un antibiotique, à un antiviral ou à un anticancéreux. La réponse à cette résistance est comme pour le SIDA, la poly-thérapie ou poly-chimiothérapie dans le cadre du cancer. Ces traitements demandent de longues études cliniques pour juger de l'effet bénéfique par rapport aux effets indésirables.

La chimiothérapie reste une technique très agressive. Étant un traitement systémique, les effets secondaires sont très nombreux et touchent tout le corps. Les premières cellules touchées sont les cellules de l'hématopoïèse entrainant anémies, thrombopénies, leucopénies. On peut contrecarrer ces toxicités aiguës avec l'administration d'hormones (exemple : érythropoïétine ou plus connue sous le nom d'EPO) ou de facteurs de croissance (G-CSF). D'autres effets secondaires comme les vomissements, l'alopécie (perte des cheveux) sont aujourd'hui bien pris en compte et des traitements efficaces permettent de les limiter. La liste des effets secondaires est encore longue et dépend de la chimiothérapie choisie. Dans tous les cas, le patient sera suivi et sa cure sera ajustée selon sa résistance à la chimiothérapie.

Comme la chirurgie et la radiothérapie, on peut prescrire la chimiothérapie dans un but curatif, adjuvant ou palliatif. En 50 ans d'existence, la chimiothérapie aura permis de guérir certains cancers (cancers des testicules, maladie de Hodgkin…) (voir *Figure VII-23*), de prolonger la survie (cancer du sein, du colon, de l'ovaire…), de réduire le volume tumoral (effets palliatifs) ou n'aura rien apporté de plus (cancer du pancréas). Heureusement, depuis maintenant une quinzaine d'années, de nouvelles molécules sont apparues, soulevant de grands espoirs.

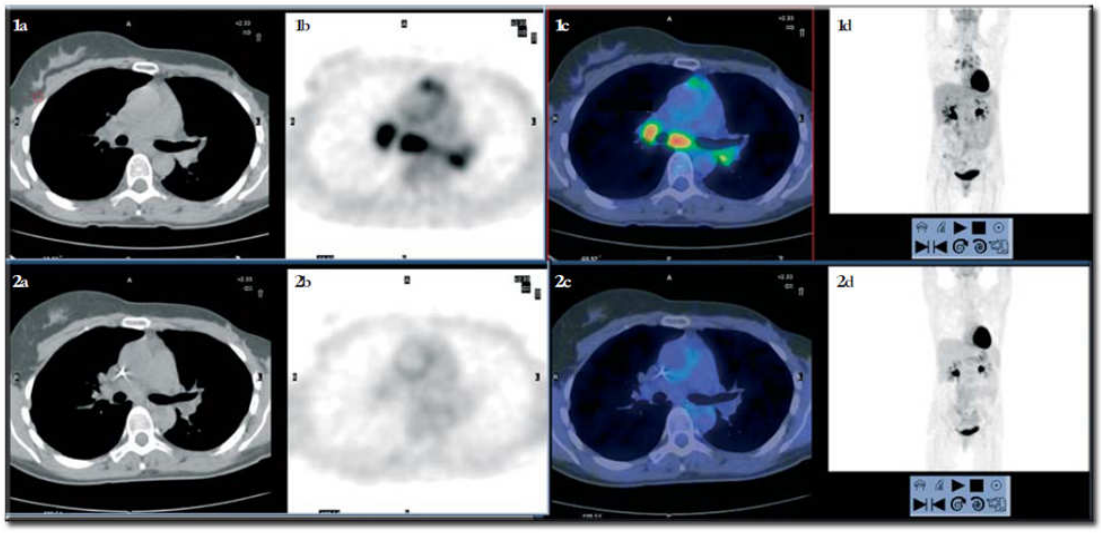

Figure VII-23: Patiente présentant une maladie de Hodgkin. Série 1 : TEP-TDM présence d'une masse ganglionnaire visible sur les coupes TDM (1a**). Les coupes TEP, TDM de fusion (**1b, 1c**) et le volume scintigraphique 3D (**1d**) montrent que les cibles ganglionnaires fixent très intensément le 18FDG. Série 2 : Coupes TDM, TEP, TDM de fusion (**2a, 2b, 2c**) et volume scintigraphique 3D (**2d**) réalisés** après chimiothérapie **montrant un aspect de réponse métabolique complète [Cachin][28].**

4. Nouvelles molécules, grands espoirs, mais localisés

Les travaux fondamentaux sur les mécanismes du cancer et le développement des biotechnologies ont permis l'apparition de nouveaux médicaments. Ces médicaments sont différents de ceux issus de la chimiothérapie. Cette fois-ci, on cible une faille dans le métabolisme de la cellule cancéreuse mais pas de toutes les cellules cancéreuses, uniquement d'un type de cellules cancéreuses possédant une mutation bien particulière. Ces recherches ont donné naissance à deux courants : les médicaments à petites molécules actives et les anticorps monoclonaux.

Le premier médicament nouvelle *génération* mis sur le marché fut le Trastuzumab (Herceptin^{TM}) en 1998. C'est un anticorps monoclonal murin humanisé, c'est-à-dire, que la réaction immunitaire a été faite chez une souris qui a produit des anticorps contre un antigène précis. Les plasmocytes qui ont produit ces anticorps ont été ensuite immortalisés. Ceci permet de secréter des doses quasi infinies d'un même anticorps d'où le nom monoclonal. Puis on a humanisé l'anticorps en supprimant la partie constante de l'anticorps murin par une partie constante humaine. On obtient ainsi, un anticorps chimère homme-souris ciblé pour un antigène donné. Le Trastuzumab a pour cible un récepteur membranaire (HER2) surexprimé par les cellules mammaires cancéreuses. L'anticorps, en se fixant sur ce récepteur va bloquer une voie de signalisation qui permettait la surexpression d'un facteur de croissance. Ceci aura

pour effet d'inhiber la prolifération des cellules tumorales. Cette surexpression HER2 est présente chez 20% des malades traités pour un cancer du sein. Les résultats de l'utilisation de ce médicament en traitement adjuvant, après une chimiothérapie sont remarquables (voir *Figure VII-24*). Cette étude portant sur plus de mille femmes, montre que l'espérance de vie des femmes HER2 positives, traitées avec Trastuzumab, passe de 4 ans à plus de 95% d'espérance de vie alors qu'elle n'est que de 75% sans ce traitement. De plus, ce traitement s'avère très bien toléré par les patients.

Dans la même lignée des anticorps monoclonaux, on peut citer : le Bevacizumab (Avastin^{TM}). Celui-ci va se lier à la protéine VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et inhibe ainsi l'angiogénèse (apparition de nouveaux vaisseaux). Ceci a pour conséquence de bloquer l'évolution et la progression des tumeurs. De plus, réduisant la vascularisation anarchique des tumeurs, elle permet d'augmenter la concentration localement des chimiothérapies. Ce médicament a surtout rallongé la survie des patients dans des cancers ayant un très mauvais pronostic (cancer du colon métastatique par exemple). La liste des anticorps monoclonaux est encore longue et s'allonge d'année en année.

Parallèlement à leur développement sont apparues des petites molécules actives. Leur développement technologique est le même que les molécules standards mais leurs cibles thérapeutiques sont le fruit de l'avancement des connaissances sur le cancer. Nous prendrons l'exemple du STI-571 (Glivec^{TM}). Cette molécule est donnée dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC). La LMC est due à la mutation d'une protéine de signalisation intervenant dans la voie tyrosine kinase. Le but de cette molécule est donc de bloquer cette protéine, et ainsi d'arrêter la prolifération de la maladie (voir *Figure VII-25*). Le dernier rapport de l'IRIS (International Randomized Study of Interferon versus STI-571) confirme les excellents résultats du Glivec avec une survie globale à 7 ans, de 86% des patients [221]. Avant le Glivec, la médiane de survie était de 5 ans. Pour finir, la toxicité du Glivec est faible, permettant de prescrire le traitement sur de très longues périodes (> 7ans).

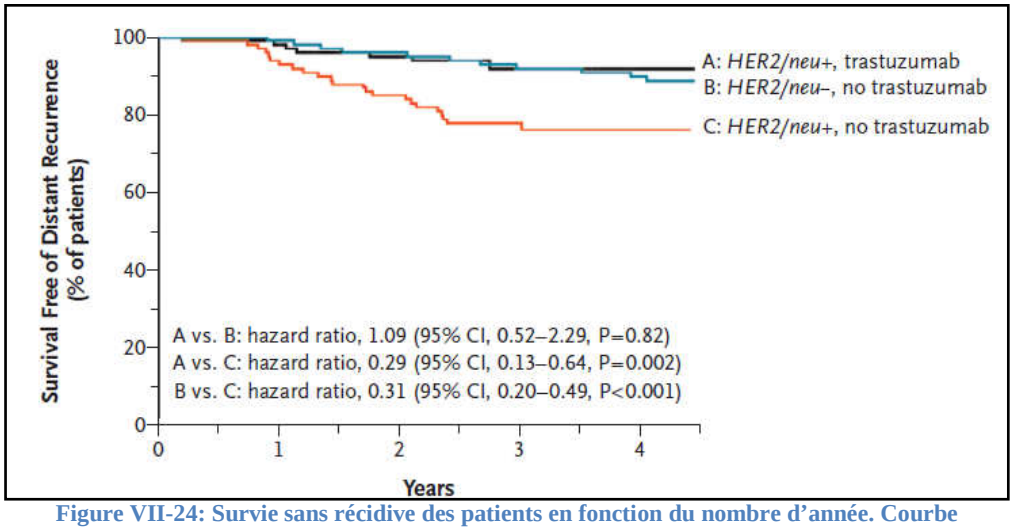

Figure VII-24: Survie sans récidive des patients en fonction du nombre d'année. Courbe noire possédant HER2 et traité avec Trastuzumab. Courbe bleu pas HER2 donc pas de Trastuzumab. Et courbe rouge possédant HER2 mais pas de Trastuzumab [Joensuu][35]

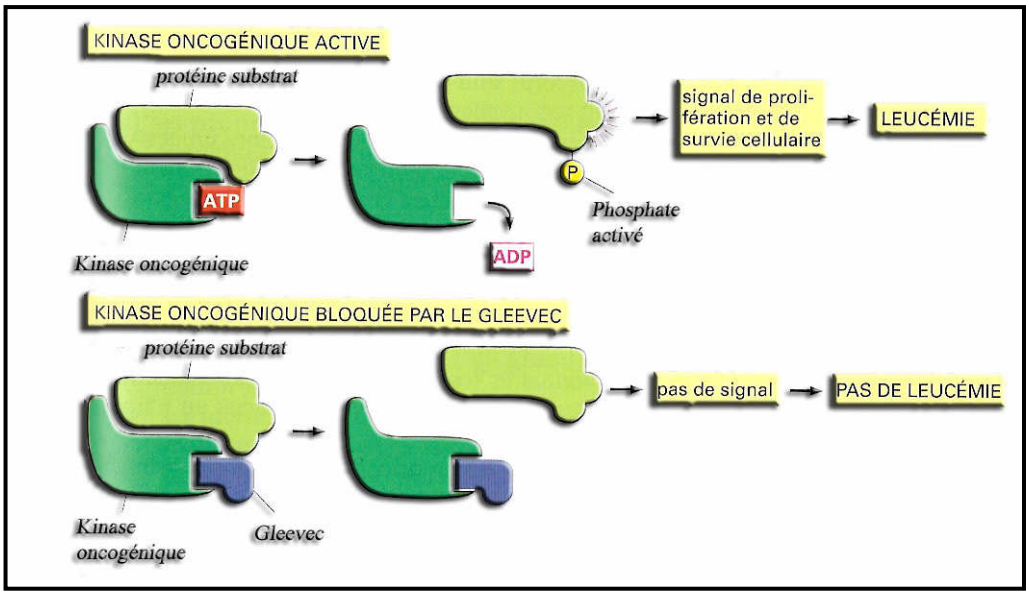

Figure VII-25: Principe du Glivec™ dans la lutte contre la leucémie myéloïde chronique (inspiré de [Alberts][11]).

Ces nouveaux médicaments ont donc changé le diagnostic de certains cancers. C'est grâce à leur ciblage très précis d'un processus oncogène qu'ils arrivent à avoir d'aussi bons résultats. Mais ce ciblage à un contrecoup, le médicament a un effet restreint à un type bien particulier de cancers (possédant la même mutation ou sensibilité), ce qui se traduit pour le laboratoire pharmaceutique par un nombre de patients-clients réduit. Le laboratoire pharmaceutique se retrouve donc avec des médicaments très efficaces mais avec une cible de patients limitée. Le calcul de l'amortissement du médicament implique un coût de vente extrêmement onéreux. Pour donner un ordre d'idée, un traitement annuel à l'Herceptin est de 12 000€, pour le Glivec il faut compter 30 000€…

Ces coûts éliminent directement les patients des pays en voie de développement, poussant certains pays comme l'Inde, à ne pas respecter par exemple la fin du brevet du Glivec pour le génériquer et entrainant une multitude de procès. Toujours est-il que nous pourrions penser que dans un peu moins de 10 ans (durée de vie moyenne d'un brevet d'un médicament), tous ces médicaments seront génériqués et donc peu onéreux. Si ceci s'applique pour les molécules qu'en est-il des anticorps monoclonaux ? En effet, on ne peut pas les produire par simple réaction chimique. Il faut à la base, induire une réaction immunitaire sur une cible bien précise d'où une complexité très importante. Comment prouver alors que l'anticorps générique aura exactement la même cible et donc les mêmes effets, sachant que les essais cliniques sont impensables au vu du coût de développement qu'il induirait ?

Les nouveaux médicaments donnent de grands espoirs aux patients, mais demanderont beaucoup de patience avant de pouvoir cibler la grande majorité des cancers. Ils posent aussi de nombreux problèmes économiques et sociaux. Comment les organismes sociaux vont-il pouvoir les rembourser ? Comment les patients encore sous traitement (durant plusieurs années) pourront ils demander un prêt, etc... ?

La recherche de nouveaux traitements anticancéreux ne se cantonne pas seulement aux médicaments. D'autres voies sont en cours de développement, comme l'immunothérapie du cancer que nous traiterons en détail dans le prochain paragraphe.

G. Conclusion

Le cancer ou les cancers ? Même à la fin de ce chapitre, la réponse ne paraît toujours pas évidente. Si nous parlons du cancer comme une maladie qui englobe tous les gènes (proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur) pouvant entraîner un cancer, alors oui, on pourra parler du cancer. Par contre, si on parle d'une maladie qui touche spécifiquement quelques gènes, induisant le développement d'un type particulier de tumeur, alors, dans ce cas bien précis, on parlera des cancers. Cancer ou cancers, dans tous les cas le patient lui, n'attend pas un nom, mais un pronostic et un traitement. Le nom de la maladie intéresse surtout le médecin qui va tout mettre en œuvre pour le découvrir le plus rapidement possible car c'est le diagnostic de cette tumeur qui permettra de décider de la thérapeutique. On peut espérer que dans un futur proche, les puces ADN identifieront le génome de la tumeur avec rapidité, efficacité et pour un prix raisonnable. Les médecins ont à leur disposition un arsenal de traitements anticancéreux : chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie et plus récemment les anticorps monoclonaux et petites molécules. Tous s'améliorent et évoluent d'année en année permettant de mieux traiter le patient, mais aussi de limiter au maximum son mal-être. Tout ceci a forcément un coût, qui est de plus en plus difficile à gérer pour la sécurité sociale. Comment peut-on alors espérer gérer cette explosion des coûts médicaux pour soigner une population qui vieillit, et donc potentiellement plus exposée aux cancers ? Une solution viendra peut être d'un nouveau traitement, basé par exemple sur l'immunothérapie du cancer.

VIII. Annexe III, Projet Aiguilles

Ce petit projet a été lancé suite à la discussion avec un doctorant de mon équipe qui travaillait à l'époque sur le projet européen Angioskin. Ce projet a pour but d'injecter de l'ADN à travers la peau et de la faire rentrer dans les cellules par électroperméabilisation. Pour se faire, elle nécessite la mise au point d'aiguilles fines (limitant la douleur lors du transpercement de la peau), longues (pour traverser une grande partie de l'épiderme) et conductrices pour délivrer les impulsions électriques. L'idée était donc d'employer le savoir-faire mis au point pour la fabrication des électrodes épaisses, pour réaliser des aiguilles. L'état de l'art dans ce domaine était principalement représenté à l'époque par les travaux de l'équipe de Prausnitz et al [222]. Toutefois, leurs techniques restent très complexes : il leur faut au moins 5 étapes de fabrication. De plus, il n'est pas possible d'appliquer un champ électrique avec de telles électrodes, car elles sont toutes reliées électriquement entre elles.

Pour pallier ces différents problèmes, nous proposons une conception en 4 étapes qui devait nous permettre d'obtenir des aiguilles prêtes pour l'injection et l'électroporation. Pour cela, nous partons d'un wafer de Si oxydé sur lequel nous déposons via lift-off notre réseau d'électrodes en Ti(50nm)/Cu(900nm). Ensuite, nous réalisons notre moule en SU-8 pour guider la croissance électrolytique. Pour faciliter sa destruction dans l'étape finale, nous déposons préalablement une sous-couche d'Omnicoat™. L'Omnicoat™ servant à la fois de promoteur d'adhérence et de couche sacrificielle. Une fois le moule préparé sur notre wafer nous procédons à l'électrodéposition du cuivre. Il ne nous reste plus alors qu'à plonger le wafer dans une solution chaude de Nano™ Remover PG pour retirer le moule. Nous devons obtenir alors des aiguilles trouées reliées directement à un réseau d'électrodes. Cependant, même si nous avons obtenu des aiguilles pouvant atteindre une épaisseur de plus de 50 µm, celles-ci restaient toujours bouchées, suite à la présence du moule en SU-8 qui ne se retirait pas, et cela, malgré plusieurs tentatives. Ce projet s'est donc soldé par un échec, mais nous a permis d'affiner nos procédés dans l'utilisation du dépôt électrolytique, dans la fabrication et dans la destruction du moule en SU-8.

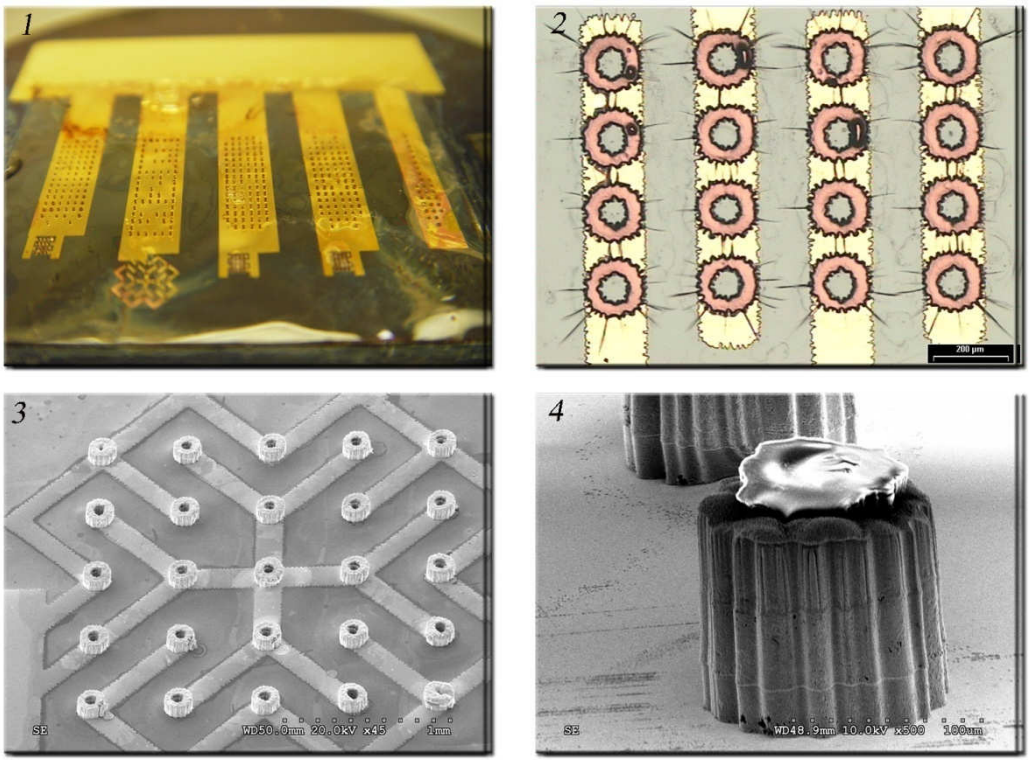

Figure VIII-1 : 1) Photo du moule en SU-8 sur un wafer de silicium oxydé. On distingue les différents trous où se formeront les aiguilles. Notons que nous avons employé la technique de masque en plastique pour ce projet 2) Photo prise après dépôt électrolytique de cuivre. 3) Image MEB après destruction du moule, on distingue un réseau complexe d'électrodes avec des aiguilles. 4) Image MEB d'une Aiguille épaisse de plus de 50µm avec la présence inopportune d'un bout du moule SU-8 au centre de celle-ci.

IX. Bibliographie

1. U. Zimmermann and G. A. Neil, *Electromanipulation of cells*. 1996: CRC Press.
2. Bryan Kolb and Ian Q. Whishaw, *Cerveau et comportement*. 2002: De Boeck Université.
3. Patrick Tabeling, *Introduction à la Microfluidique*. 2003, Paris: Edition Belin.
4. All the People of the World, *Wikipédia*, in *Wikipédia*: World.
5. Schultes Johannes, *Aemamentarium chirurgicum XLIII tabulis* 1655, Ulm: Balthasar Kühnsen.
6. B. Alberts, et al., *Biologie moléculaire de la cellule*. 1995: Flammarion.
7. Bernard W. Stewart and Paul Kleihues, *World Cancer Report* IARC, 2003.
8. Dongquing Li, *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, ed. Springer. 2008.
9. Abul-K Abbas (Auteur), et al., *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. 2005: Elsevier 300.
10. S. Devasenathipathy and J.G. Santiago, *Electrokinetic Flow Diagnostics*. Micro- and Nano-Scale Diagnostic Techniques, ed. Springer-Verlag. 2003, New York.
11. Alberts Bruce, et al., *L'essentiel de la biologie cellulaire 2e édition* Médecine-Science. 2004: Flammarion.
12. IARC, *ATTRIBUTABLE CAUSES OF CANCER IN FRANCE IN THE YEAR 2000.* Working group Reports 2007. **3**.
13. Eli Gilboa, *The promise of cancer vaccines.* Nature Reviews Cancer, 2004. **4**: p. 401-411.
14. Futreal PA, et al., *A census of human cancer genes.* Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(3): p. 177-83.
15. Marion WOYTASIK, *Etude des procédés de fabrication de microdispositifs électromagnétiques sur supports souples pour l'imagerie médicale (IRM) et le contrôle non destructif des matériaux*, in *GÉNIE DES PROCÉDÉS ET HAUTE TECHNOLOGIE*. 2005, UNIVERSITÉ PARIS VI.
16. Richard Feynman, Leighton, and Sands, *Le cours de physique de Feynman, Electromagnétisme 1*, ed. InterEditions. Vol. 1. 1979, Paris.
17. Hanahan D, W.R., *The Hallmarks of Cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
18. Drew PARDOLL, *Does the immune system see tumors as foreign or self?* Annual review of immunology, 2003. **21**: p. 807-839.
19. G. Fuhr, W. N. Arnold, and R. Hagedorn, *Levitation, holding and rotation of cells within traps made by high-frequency fields.* BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS, 1992. **1108**(2): p. 215-223.
20. Marie FRENEA-ROBIN, *MICROMANIPULATION DE PARTICULES PAR DIELECTROPHORESE : APPLICATION AU RANGEMENT MATRICIEL ET AU TRI DE CELLULES SUR PUCE*, in *SATIE*. 2003, ENS de Cachan.
21. Laure Saias, Antoine-Emmanuel Saliba, and Jean-Louis Viovy, *Microfluidic magnetic cell sorting system for cancer diagnosis*, in *µFLU08.* 2008: Bologne.
22. Catherine Coirault, et al., *Les pinces optiques en biologie et en médecine.* Medecine/Science, 2003. **19**.
23. Hiroshi Tanaka, K.S., Takashi Hayashi, and Suyu Shu, *Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells.* Cellular Immunology, 2002. **220**: p. 1-12.
24. Richard Doll, et al., *Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors* Br. Med. J., 2004. **328**: p. 1519.

25. Janina Schaper, *Development of a Technology for Arranged Electrofusion of Mammalian Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy*. 2007, Universit¨at Bielefeld: Bielefeld.
26. Steven A. Rosenberg, et al., *Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy.* Nature Reviews Cancer, 2008. **8**: p. 299-308.
27. Joel Voldman, *Electrical Forces For Microscale Cell Manipulation.* Annu. Rev. Biomed. Eng., 2006. **8**: p. 29.
28. Cachin Florent, Antony Kelly, and Jean Maublant, *évaluation de la réponse thérapeutique en cancérologie : place de l'imagerie isotopique.* Bull Cancer, 2006.
29. Takanori Akagi and Takanori Ichiki, *Cell electrophoresis on a chip: what can we know from the changes in electrophoretic mobility?* Anal Bioanal Chem, 2008. **391**: p. 2433-2441.
30. Kao JY, et al., *Superior efficacy of dendritic cell-tumor fusion vaccine compared with tumor lysate-pulsed dendritic cell vaccine in colon cancer.* Immunology Letters, 2005. **15**: p. 154-9.
31. Patrick Abgrall, *MICROTECHNOLOGIES POLYMERES POUR LES LABORATOIRES SUR PUCES*, in *U.F.R. PHYSIQUE CHIMIE AUTOMATIQUE*. 2006, UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER: Toulouse.
32. Christoph Reichlea, et al., *A new microsystem for automated electrorotation measurements using laser tweezers.* BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS, 2000. **1459**(1): p. 218-229.
33. MAURIZIO RIGHINI, et al., *Parallel and selective trapping in a patterned plasmonic landscape.* Nature Physics, 2007. **3**.
34. Edwin W. H. Jager, Olle Inganäs, and Ingemar Lundström, *Microrobots for Micrometer-Size Objects in Aqueous Media: Potential Tools for Single-Cell Manipulation.* Science, 2000. **288**.
35. Heikki Joensuu, P.-L.K.-L., Petri Bono, Tuomo Alanko, et al, *Adjuvant Docetaxel or Vinorelbine with or without Trastuzumab for Breast Cancer.* The New England Journal of Medecine, 2006. **354**(8): p. 809-820.
36. Trevor, K.C., Cathleen; Ruiz, Yvette; Akporiaye, Emmanuel; Hersh, Evan; Landais, Didier; Taylor, Rachel; King, Alan; Walters, Richard, *Generation of dendritic cell–tumor cell hybrids by électrofusion for clinical vaccine application.* Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(8): p. 705-714.
37. Timothy G. Leonga, et al., *Tetherless thermobiochemically actuated microgrippers.* PNAS, 2009. **106**: p. 703-708.
38. R. V. GODDARD, et al., *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, 2003. **131**: p. 82-89.
39. GALEA-LAURI Joanna, et al., *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, 2002. **51**(6): p. 299-310.
40. Tixier-Mita, Y. Mita, and H. Fujita, *A simple, robust and controllable nano-structures fabrication technique using standard silicon wafers*, in *Transducers 2003*. 2003: Boston.
41. Vijay Shankaran, et al., *IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.* Nature, 2001. **410**: p. 1107-1111.
42. Didier Falconneta, et al., *Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays.* Biomaterials, 2006. **27**: p. 3044-3063.

43. Ken Shortman and Shalin H. NaiK, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.* Nature Reviews Immunology, 2007. **7**: p. 19-30.
44. Harith Rajagopalan, M.A.N., Bert Vogelstein & Christoph Lengauer, *The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer.* Nature Reviews Cancer, 2003. **3**: p. 695-701.
45. Fodde R, Smits R, and Clevers H, *APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer.* Nature Reviews Cancer, 2001. **1**: p. 55-67.
46. Petra S. Dittrich and Andreas Manz, *Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery.* Nature, 2006. **5**.
47. Wei-Heong Tan and Shoji Takeuchi, *A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applicati.* PNAS, 2006. **104**(4): p. 1146-1151.
48. Dertinger SKW, et al., *Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks.* ANALYTICAL CHEMISTRY 2001. **73**(6): p. 1240-1246.
49. Vladimir L. Sukhorukov, et al., *A biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **346**: p. 829-839.
50. Frenea M, et al., *Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis.* MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-BIOMIMETIC AND SUPRAMOLECULAR SYSTEMS, 2003. **23**(5): p. 597-603.
51. Philip J. Leea, Paul J. Hunga, and Luke P. Lee, *Microfluidic application-specific integrated device for monitoring direct cell-cell communication via gap junctions between individual cell pairs.* APPLIED PHYSICS LETTERS, 2005. **86**.
52. Jean-Michel Escoffre, et al., *What is (Still not) Known of the Mechanism by Which Electroporation Mediates Gene Transfer and Expression in Cells and Tissues.* Mol Biotechnol, 2009. **41**: p. 286-295.
53. B. Graß, et al., *Micro-structured analytical instrumentation for the analysis of liquids.* Spectrochimica Acta Part B, 2002. **57**: p. 1575-1583.
54. F. Dang, et al., *Replica multichannel polymer chips with a network of sacrificial channels sealed by adhesive printing method* Lab on a Chip, 2005. **5**: p. 472-478.
55. boehringer-ingelheim. *Mikrosystemtechnik.* [cited; Available from: http://www.boehringer-ingelheim.de/produkte/mikrosystemtechnik/index.jsp.
56. S A Hoption Cann, J P van Netten, and C van Netten, *Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future.* Postgraduate Medical Journal, 2003. **79**: p. 672-680.
57. WB Coley, *Treatment of inoperable malignant tumors with toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus.* Tram Am Surg Assoc, 1894. **12**: p. 183-212.
58. L.Gross, *Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line.* Cancer Res., 1943. **3**: p. 326-333.
59. EJ Foley, *Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin.* Cancer Res., 1953. **13**: p. 835-837.
60. Thomas, L., *Discussion of Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States.* 1959, Lawrence HS. p. 529-532.
61. FM. Burnet, *The concept of immunological surveillance.* Prog Exp Tumor Res., 1970. **13**: p. 1-27.
62. Prof James J Goedert MD, et al., *Spectrum of AIDS-associated malignant disorders.* The Lancet, 1998. **351**(9119): p. 1833-1839.
63. Odile LAUNAY and Loïc GUILLEVIN, *Épidémiologie des tumeurs malignes associées à l'infection par le VIH.* Bull Cancer, 2003. **90**(5): p. 387-92.
64. Engels EA, et al., *Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980-2002.* AIDS, 2006. **20**(12): p. 1645-54.

65. Giuseppe Barbaro and Giorgio Barbarini, *HIV infection and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy.* Oncology Reports, 2007. **17**(5): p. 1121-1126.
66. Sabine Roithmaier MD, et al., *Incidence of Malignancies in Heart and/or Lung Transplant Recipients: A Single-Institution Experience* The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2007. **26**(8): p. 845-849.
67. DANIEL H. KAPLAN, et al., *Demonstration of an interferon g-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice.* PNAS, 1998. **95**: p. 7556-7561.
68. Lewis L. Lanier, *A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis.* Nature Medecine, 2001. **7**: p. 1178-1180.
69. Weiping Zou, *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy.* Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(295-307).
70. Stefanie Gross and Peter Walden, *Immunosuppressive mechanisms in human tumors: Why we still cannot cure cancer.* Immunology Letters, 2008. **116**(1): p. 7-14.
71. Gabrilovich D, et al., *Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo.* Blood, 1998. **92**(11): p. 4150-4166.
72. Chen WJ, et al., *Conversion of peripheral CD4(+)CD25(-) naive T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.* JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, 2003. **198**(12): p. 1875-1886.
73. Ralph M. Steinman and Jacques Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine.* Nature, 2007. **449**: p. 419-426.
74. Banchereau J and Palucka AK, *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer.* Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(4): p. 296-306.
75. C. Caux, et al., *GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells.* Nature, 1992. **360**: p. 258-261.
76. N Romani, et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood.* Journal of Experimental Medicine, 1994. **180**: p. 83-93.
77. Xavier Préville, et al., *Eradication of Established Tumors by Vaccination With Recombinant Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Carrying the Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein.* Cancer Research, 2005. **65**: p. 641-649.
78. Tanja D. de Gruijl, et al., *Prolonged Maturation and Enhanced Transduction of Dendritic Cells Migrated from Human Skin Explants After In Situ Delivery of CD40-Targeted Adenoviral Vectors.* The Journal of Immunology, 2002. **169**: p. 5322-5331.
79. David M. Ashley, et al., *Bone Marrow–generated Dendritic Cells Pulsed with Tumor Extracts or Tumor RNA Induce Antitumor Immunity against Central Nervous System Tumors.* Journal of Experimental Medicine, 1997. **186**(7).
80. Viggo F. I. Van Tendeloo, et al., *Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells.* Blood, 2001. **98**(1): p. 49-56.
81. Dajing Xia, Terence Moyana, and Jim Xiang, *Combinational adenovirus-mediated gene therapy and dendritic cell vaccine in combating well-established tumors.* Cell Research, 2006. **16**(241-259).
82. HART I., C.C., *FUSION INDUCES TUMOUR REJECTION* Nature, 1997. **388**: p. 626-627.
83. JOHN W. WOJCIESZYN, et al., *Studies on the Mechanism of Cell Fusion Using Fluorescent Probes Polyethylene Glycol-mediated Membrane and Cytoplasmic.* The Journal of Cell Biology, 1983. **96**: p. 151-159.
84. G. KÖHLER and C. MILSTEIN, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, 1975. **256**: p. 495-497.

85. Scott-Taylor TH, et al., *Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines.* Biochim Biophys Acta., 2000. **1500**(3): p. 265-279.
86. Stuhler G, Trefzer U, and Walden P, *Hybrid cell vaccination in cancer immunotherapy - Recruitment and activation of T cell help for induction of anti tumour cytotoxic T cells*, in *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY* 1998.
87. Parkhurst MR, et al., *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, 2003. **170**(10): p. 5317-5325.
88. YASUDA Takashi, et al., *Dendritic cell-tumor cell hybrids enhance the induction of cytotoxic T lymphocytes against murine colon cancer: A comparative analysis of antigen loading methods for the vaccination of immunotherapeutic dendritic cells.* Oncology Reports, 2006. **16**(6): p. 1317-1324.
89. Takashi Yasuda, et al., *Superior anti-tumor protection and therapeutic efficacy of vaccination with allogeneic and semiallogeneic dendritic cell/tumor cell fusion hybrids for murine colon adenocarcinoma.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**: p. 1025-1036.
90. KIKUCHI Tetsuro, et al., *Results of a phase 1 clinical trial of vaccination of glioma patients with fusion of dendritic and glioma cells.* Cancer immunology and immunotherapy, 2001. **50**(7): p. 337-344.
91. David Avigan, et al., *Fusion cell Vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses.* Clinical Cancer Research, 2004. **10**: p. 4699-4708.
92. Yanzhang Wei, et al., *Dendritoma vaccination combined with low dose interleukin-2 in metastatic melanoma patients induced immunological and clinical responses.* International Journal of Oncology, 2006. **28**(3): p. 585-593.
93. MEYER Karen ; EVANS Lyndon ; MARTIN Julie ; STEPHENSON Joseph J. ; TROCHA Steven ; SMITH Sam ; WAGNER Thomas E, W.Y.C.S.R.P.J.L.H.L.M.B.K.E.J.S.B.-V.H.W.J., *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, 2007. **18**(3).
94. Märten A, et al., *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., 2003. **20**(14): p. 483-94.
95. Jose Alexandre M. Barbuto, et al., *Dendritic cell–tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer.* Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(12): p. 1111-1118.
96. TREFZER Uwe, et al., *Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results.* Vaccine, 2005. **23**(17-18).
97. I. Jolanda M. de Vries, et al., *Effective Migration of Antigen-pulsed Dendritic Cells to Lymph Nodes in Melanoma Patients Is Determined by Their Maturation State.* Cancer Res., 2003. **63**.
98. Gottfried E, et al., *Characterization of cells prepared by dendritic cell-tumor cell fusion.* Cancer Immun., 2002. **2**.
99. Richard P. Feynman. *Plenty of Room at the Bottom.* 1959 [cited; Available from: http://www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html.
100. Fan LS, Tai YC, and Muller RS, *IC-PROCESSED ELECTROSTATIC MICROMOTORS.* SENSORS AND ACTUATORS, 1989. **20**(1-2).

101. Terry Stephen and James Angell, *A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated.* IEEE Transactions On Electron Devices, 1979. **12**.
102. Jolly RD and Muller RS, *MINIATURE CANTILEVER BEAMS FABRICATED BY ANISOTROPIC ETCHING OF SILICON.* JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY, 1980. **127**(12).
103. Tang WC and Howe R, *ELECTROSTATIC-COMB DRIVE OF LATERAL POLYSILICON RESONATORS.* SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL, 1990. **21**: p. 3.
104. Jamil El-Ali, Peter K. Sorger, and Klavs F. Jensen, *Cells on chips.* Nature, 2006. **442**.
105. Laser DJ and Santiago JG, *A review of micropumps.* JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING, 2004. **14**(6).
106. Peter Woias, *Micropumps—past, progress and future prospects.* Sensors and Actuators B, 2005. **105**: p. 28-38.
107. ARTHUR ASHKIN, *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers.* PNAS, 1997. **94**: p. 4853–4860.
108. David G. Grier, *A revolution in optical manipulation.* Nature, 2003. **424**.
109. Utpal Bora, Lalita Chugh, and Pradip Nahar, *Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures.* Journal of Immunological Methods, 2002. **268**: p. 171-177.
110. Zhan-Hui Wang and Gang Jin, *Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry* Journal of Immunological Methods, 2004. **285**(2): p. 237-243.
111. B. Le Pioufle, et al., *Living cells captured on a bio-microsystem devoted to DNA injection.* MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C, 2000. **12**: p. 77-81.
112. Janina Schaper, Hermann Richard Bohnenkamp, and Thomas Noll, *New Electrofusion Devices for the Improved Generation of Dendritic Cell-tumour Cell Hybrids*, in *Cell Technology for Cell Products*, Springer, Editor. 2007. p. 207-216.
113. Martin A. M. Gijs, *Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications.* Microfluid Nanofluid, 2004. **1**: p. 22-40.
114. Nicole Pamme, *Magnetism and microfluidics.* Lab on a Chip, 2006. **6**: p. 24-38.
115. Rémy Fulcrand, et al., *Development of flexible polymer lab on chip integrating microelectromagnets for microbeads manipulation*, in *µFLU08.* 2008, SHF: Bologne.
116. M. Frenea-Robin, et al., *Contactless diamagnetic trapping of living cells onto a micromagnet array*, in *EMBC*. 2008, IEEE: Vancouver.
117. Ronald F. Probstein, *Physicochemical Hydrodynamics: An Introduction*. 2 ed. 1994: Wiley-IEEE. 400.
118. Hideya Nagata, M.T., Ken Hirano, Yoshinobu Baba, *High-speed separation of proteins by microchip electrophoresis using a polyethylene glycol-coated plastic chip with a sodium dodecyl sulfate-linear polyacrylamide solution.* Electrophoresis, 2005. **26**(14): p. 2687-2691.
119. N Kaji, et al., *Separation of Long DNA Molecules by Quartz Nanopillar Chips under a Direct Current Electric Field* Anal. Chem., 2004. **76**(1): p. 15-22.
120. TABUCHI Mari, et al., *Nanospheres for DNA separation chips.* Nature biotechnology, 2004. **22**(3): p. 337-340.
121. Anne Y. Fu, et al., *A microfabricated fluorescence-activated cell sorter.* NATURE BIOTECHNOLOGY, 1999. **17**.
122. Mikael Evander, et al., *Noninvasive Acoustic Cell Trapping in a Microfluidic Perfusion System for Online Bioassays.* Anal. Chem., 2007. **79**(7): p. 2984-2991.
123. C. Bottier, et al., *Kinesin-Based transportation and electrofusion of lipid vesicles*, in *µTAS.* 2008: San Diego.

124. Mehrishi JN and Bauer J, *Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge.* Electrophoresis, 2002. **23**(13): p. 1984-1994.
125. Thomas B. Jones, *Electromechanics of Particles*, ed. illustrated. 1995: Cambridge University Press. 256.
126. FOSTER KR, SAUER FA, and SCHWAN HP, *ELECTROROTATION AND LEVITATION OF CELLS AND COLLOIDAL PARTICLES.* BIOPHYSICAL JOURNAL, 1992. **63**(1): p. 180-190.
127. E. Muth, *Ueber die Erscheinung der Perlschnurkettenbildung von Emulsionspartikelchen unter Einwirkung eines Weshselfelds.* Kolloid-Z, 1927. **41**(97).
128. P. Liebesny, *Athermic short wave therapy.* Arch. Phys. Ther., 1939. **19**(736).
129. HA POHL, *The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields.* Journal of Applied Physics, 1951. **22**(7): p. 869-871.
130. ARNOLD WM and ZIMMERMANN U, *ROTATING-FIELD-INDUCED ROTATION AND MEASUREMENT OF THE MEMBRANE CAPACITANCE OF SINGLE MESOPHYLL-CELLS OF AVENA-SATIVA.* ZEITSCHRIFT FUR NATURFORSCHUNG C-A JOURNAL OF BIOSCIENCES, 1982. **37**(10): p. 908-915.
131. Michael Pycraft Hughes, *Nanoelectromechanics in Engineering and Biology*, ed. illustrated. 2003: CRC Press.
132. LINDQUIST S and CRAIG EA, *THE HEAT-SHOCK PROTEINS.* ANNUAL REVIEW OF GENETICS 1988. **22**: p. 631-677.
133. A Castellanos, et al., *Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: scaling laws.* JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS, 2003. **36**: p. 2584-2597.
134. T. Müller, et al., *A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles.* Biosensors & Bioelectronics, 1999. **14**: p. 247-256.
135. FREDERICK F. BECKER, et al., *Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity.* PNAS, 1995. **92**: p. 860-864.
136. Hywel Morgan, Michael P. Hughes, and Nicolas G. Green, *Separation of Submicron Bioparticles by Dielectrophoresis.* BIOPHYSICAL JOURNAL, 1999. **77**: p. 516-525.
137. Joel Voldman, et al., *Holding Forces of Single-Particle Dielectrophoretic Traps.* BIOPHYSICAL JOURNAL, 2001. **80**: p. 531-541.
138. Voldman J, et al., *A microfabrication-based dynamic array cytometer.* ANALYTICAL CHEMISTRY, 2002. **74**(16): p. 3984-3990.
139. Adam Rosenthal and Joel Voldman, *Dielectrophoretic Traps for Single-Particle Patterning.* BIOPHYSICAL JOURNAL, 2005. **88**: p. 2193-2205.
140. SCHNELLE T, et al., *3-DIMENSIONAL ELECTRIC-FIELD TRAPS FOR MANIPULATION OF CELLS - CALCULATION AND EXPERIMENTAL-VERIFICATION.* BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS, 1993. **1157**(2): p. 127-140.
141. Brian M. Taff and Joel Voldman, *A Scalable Addressable Positive-Dielectrophoretic Cell-Sorting Array.* ANALYTICAL CHEMISTRY, 2005. **77**: p. 7976-7983.
142. Dirk R. Albrecht, et al., *Photo- and electropatterning of hydrogel-encapsulated living cell arrays.* Lab on a Chip, 2004. **5**: p. 111-118.
143. MASUDA S, WASHIZU M, and NANBA T, *NOVEL METHOD OF CELL-FUSION IN FIELD CONSTRICTION AREA IN FLUID INTEGRATED-CIRCUIT.* IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRY APPLICATIONS, 1989. **25**(4): p. 732-737.
144. Blanca H. Lapizco-Encinas, et al., *Dielectrophoretic Concentration and Separation of Live and Dead Bacteria in an Array of Insulators.* ANALYTICAL CHEMISTRY, 2004. **76**: p. 1571-1579.

145. Yuejun Kang, et al., *DC-Dielectrophoretic separation of biological cells by size.* Biomed Microdevices, 2008. **10**: p. 243-249.
146. Irena Barbulovic-Nad, et al., *DC-dielectrophoretic separation of microparticles using an oil droplet obstacle.* Lab on a Chip, 2006. **6**: p. 274-279.
147. Zimmermann, *ELECTRIC FIELD-MEDIATED FUSION AND RELATED ELECTRICAL PHENOMENA.* BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1982. **694**(3): p. 227-277.
148. Michel Imbert, *Traité du cerveau*, ed. Sciences. 2006, Paris: Odile Jacob.
149. Yu A. Chen and Richard H. Scheller, *SNARE-MEDIATED MEMBRANE FUSION.* Nature, 2001. **2**.
150. Theodore S. Jardetzky and Robert A. Lamb, *A class act.* Nature, 2004. **427**.
151. C. Barrau, J.T., B. Gabriel, *Osmotically induced membrane tension facilitates the triggering of living cell electropermeabilization.* Bioelectrochemistry, 2004. **63**: p. 327-332.
152. J Teissié and M P Rols, *An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization.* BIOPHYSICAL JOURNAL, 1993. **65**(1): p. 409-413.
153. Lluis M. Mir, *Application of Electroporation Gene Therapy: Past, Current, and Future.* Methods in Molecular Biology, 2008. **423**.
154. MIR L. M., et al., *Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses.* European journal of cancer, 1991. **27**(1): p. 68-72.
155. C. Chen, et al., *Membrane electroporation theories: a review.* Med Biol Eng Comput, 2006. **44**: p. 5-14.
156. J. Teissié, M. Golzio, and M. P. Rols, *Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge.* BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 2005. **1724**(3): p. 270-280.
157. J. Teissie and M. P. Rols, *Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electropermeabilization* BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1986. **140**(1): p. 258-266.
158. D. Peter Tieleman, et al., *Simulation of Pore Formation in Lipid Bilayers by Mechanical Stress and Electric Fields.* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(21): p. 6382-6383.
159. Rainer A. Bockmann, et al., *Kinetics, Statistics, and Energetics of Lipid Membrane Electroporation Studied by Molecular Dynamics Simulations.* BIOPHYSICAL JOURNAL, 2008. **95**: p. 1837-1850.
160. Mounir Tarek, *Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation.* BIOPHYSICAL JOURNAL, 2005. **88**: p. 4055-4053.
161. Andrey A. Gurtovenko and Ilpo Vattulainen, *Molecular Mechanism for Lipid Flip-Flops.* J. Phys. Chem. B, 2007. **111**(48): p. 13554-13559.
162. Cees W.M. Haest, Dietrun Kamp, and Bernhard Deuticke, *Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. Lessons from studies on electroporated and resealed cells.* Biochimica et Biophysica Acta, 1997. **1325**: p. 17-33.
163. U. Pliquett, et al., *High electrical field effects on cell membranes.* Bioelectrochemistry, 2006. **70**: p. 275-282.
164. Corinne Ramos and Justin Teissié, *Electrofusion : A biophysical modification of cell membrane and a mechanism in exocytosis.* Biochimie, 2000. **82**: p. 511-518.
165. Maria R. Parkhurst, et al., *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, 2003. **170**: p. 5317-5325.
166. Katrina T. Trevor, et al., *Generation of dendritic cell–tumor cell hybrids by electrofusion for clinical vaccine application.* Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**: p. 705-714.
167. ROOT RICHARD TERRY, *ELECTROFUSION CELL AND METHOD OF MAKING THE SAME* in *European Patent Application*, D.P. [US], Editor. 1989.
168. Guillaume Tresset and Shoji Takeuchi, *A Microfluidic Device for Electrofusion of Biological Vesicles.* Biomed Microdevices, 2004. **6**(3): p. 213-218.
169. Yi Cao, et al., *Study of high-throughput cell electrofusion in a microelectrode-array chip.* Microfluid Nanofluid, 2008. **5**: p. 669-675.
170. Alison M Skelley, et al., *Microfluidic control of cell pairing and fusion.* NATURE METHODS, 2009. **6**(2).
171. Duffy DC, et al., *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane).* Analytical Chemistry, 1998. **70**(23).
172. Marc J. Madou, *Fundamentals of microfabrication*. 2 ed. 2002: CRC Press. 723.
173. J. Cooper McDonald and George M. Whitesides, *Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices.* Acc. Chem. Res., 2002. **35**(7): p. 491-499.
174. Jessamine Ng Lee, Cheolmin Park, and George M. Whitesides, *Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices.* Anal. Chem., 2003. **75**(23): p. 6544-6554.
175. Heckele M, S.W., *Review on micro molding of thermoplastic polymers.* JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING, 2004. **14**(3): p. R1-R14.
176. M Denoual, et al., *Vacuum casting to manufacture a plastic biochip for highly parallel cell transfection.* Meas. Sci. Technol., 2006. **17**: p. 3134-3140.
177. Mircochem. *SU-8*. [cited; Available from: http://www.microchem.com/products/su_eight.htm.
178. A del Campo and C Greiner, *SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography.* J. Micromech. Microeng., 2007. **17**: p. R81-R-95.
179. Gabriela Voskericiana, et al., *Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices.* Biomaterials, 2003. **24**: p. 1959-1967.
180. Geoffrey Kotzara, et al., *Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices.* Biomaterials, 2002. **23**: p. 2737-2750.
181. Lu H , et al., *SU8-Based micro neural probe for enhanced chronic in-vivo recording of spike signals from regenerated axons*, in *5th IEEE Sensors Conference*. 2006, IEEE: Daegu, South Korea.
182. Chuang YJ, et al., *A novel fabrication method of embedded micro-channels by using SU-8 thick-film photoresists.* Sensors and Actuators A-Physical, 2003. **103**(1-2): p. 64-69.
183. Alderman BEJ, et al., *Microfabrication of channels using an embedded mask in negative resist.* J. Micromech. Microeng., 2001. **11**(6): p. 703-705.
184. Guerin Louis, et al., *Simple and low cost fabrication of embedded microchannels by using a new thick-film photoplastic*, in *TRANSDUCERS 97*. 1997: Chicago.
185. Z. Ling and K. Lian, *In situ fabrication of SU-8 movable parts by using PAG-diluted SU-8 as the sacrificial layer.* Microsyst Technol, 2007. **13**: p. 253-257.
186. S. Metz, et al., *Polyimide and SU-8 microfluidic devices manufactured by heat-depolymerizable sacrificial material technique.* Lab on a Chip, 2004. **4**(114-120).
187. Patrick Abgrall, et al., *A novel fabrication method of flexible and monolithic 3D microfluidic structures using lamination of SU-8 films.* J. Micromech. Microeng., 2006. **16**: p. 113-121.

188. Santeri Tuomikoski and Sami Franssila, *Free-standing SU-8 microfluidic chips by adhesive bonding and release etching.* Sensors and Actuators A, 2005. **120**: p. 408-415.
189. F J Blanco, et al., *Novel three-dimensional embedded SU-8 microchannels fabricated using a low temperature full wafer adhesive bonding.* J. Micromech. Microeng., 2004. **14**: p. 1047-1056.
190. Véronique Mathet. *Centrale de micro-technologie*. [cited; Available from: http://www.ief.u-psud.fr/ief/ief.nsf/CTU_welcome.html.
191. COMSOL AB. *COMSOL Multiphysics*. [cited; Available from: http://www.comsol.com/.
192. The MathWorks Inc. *MATLAB*. [cited; Available from: http://www.mathworks.fr/.
193. Mottet Guillaume, Denoual Matthieu, and Le Pioufle Bruno, *Réalisation d'un bio-microsystème pour la fusion cellulaire en vue de l'immunothérapie du cancer*, in *JNRDM*. 2007: Lille.
194. WieWeb software. *Layout Software CleWin*. [cited; Available from: http://www.wieweb.com/nojava/layoutframe.html.
195. GmbH, H.I.M. *laser lithography system*. 2009 [cited; Available from: http://www.himt.de/en/products/dwl66fs.php.
196. DVH Research Group. *AZ 5214E*. 2005 [cited; Available from: http://groups.mrl.uiuc.edu/dvh/pdf/AZ5214E.pdf.
197. Microchem. *Omnicoat*. [cited; Available from: http://www.microchem.com/products/pdf/OMNICOAT.pdf.
198. R. Engelke, et al., *Complete 3D UV microfabrication technology on strongly sloping topography substrates using epoxy photoresist SU-8.* Microelectronic Engineering, 2004. **73-74**: p. 456-462.
199. Joel Voldman, et al., *A Dielectrophoresis-based Array Cytometer*, in *Transducers*. 2001.
200. Technic INC. *Technic Immersion Gold*. [cited; Available from: http://www.technic.com/chm/goldimm.htm.
201. Konstantin Ivanovich Popov, Stojan S. Djokić, and Branimir N. Grgur, *Fundamental aspects of electrometallurgy*. 2002: Springer. 305.
202. Mottet Guillaume, et al., *A COMPLET PROCESS TO MAKE A LAB ON A CHIP WITH COMPLEX FLUDICS AND THICK ELECTRODES FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS*, in *MicroFluidics 2008*. 2008: Bologne.
203. P.J. Slikkerveer, P.C.P. Bouten, and F.C.M. de Haas, *High quality mechanical etching of brittle materials by powder blasting.* SENSORS AND ACTUATORS, 2000. **85**: p. 296-303.
204. E. Belloy, et al., *The introduction of powder blasting for sensor and microsystem applications.* SENSORS AND ACTUATORS, 2000. **84**: p. 330-337.
205. Jean Tagault, *La chirurgie de M. Jean Tagault docteur en médecine* 1580, Lyon: Barthelemy Honorat.
206. Vésale André, *De humani corporis fabrica libri septem*. 1543: Johannes Oporinus.
207. Pol Gosset, *« l'hôpital pour cancérés », communication faite à l'académie de Reims* 1926.
208. Pinell Patrice, *Naissance d'un fléau*. Métailé ed. 1992.
209. Blattner FR, et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.* Science, 1997. **277**: p. 1453-74.
210. Adams MD, et al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster.* Science, 2000. **287**: p. 2185-95.

211. Mouse Genome Sequencing Consortium, et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.* Nature, 2002. **420**: p. 520-62.
212. International Human Genome Sequencing Consortium, *Finishing the euchromatic sequence of the human genome.* Nature, 2004. **431**: p. 931-45.
213. Fearon Eric R. and Bert Vogelstein, *A genetic model for colorectal cancer tumorigenesis.* Cell, 1990. **61**: p. 759-767.
214. MM. Gérard DÉRIOT and Jean-Pierre GODEFROY, *Le drame de l'amiante en France : comprendre, mieux réparer, en tirer des leçons pour l'avenir.*, Sénat, Editor. 2005.
215. Parlement européen, *REACH*. 2006, Journal officiel de l'Union européenne.
216. DOLL R and HILL AB, *Smoking and carcinoma of the lung.* Br. Med. J., 1950. **2**(739-48).
217. Richard Doll and A. Bradford Hill, *The mortality of doctors in relation to their smoking habits: a preliminary report* Br. Med. J., 1954. **2**: p. 1451-5.
218. Sarah Boseley, *Renowned cancer scientist was paid by chemical firm for 20 years.* The Guardian, 2006. **8 December 2005**.
219. Coisne Sophie and Fabienne Lemarchand, *Cancer du sein : les illusions du dépistage* La recherche, 2006. **395**.
220. Bernard Fisher, et al., *Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer* The New England Journal of Medecine, 1995. **333**: p. 1456-1461.
221. O'Brien Stephen, Richard A. Larson, and et al., *International Randomized Study of Interferon Versus STI571 (IRIS) 7-Year Follow-up: Sustained Survival, Low Rate of Transformation and Increased Rate of Major Molecular Response (MMR) in Patients (pts) with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib (IM)* in *5Oth American Society of Hematology*. 2008.
222. Devin V. McAllister, et al., *Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: Fabrication methods and transport studies.* PNAS, 2003. **100**(24): p. 13755-13760.