

DESIGN AND CHARACTERIZATION OF MICROSYSTEMS FOR CELL ANALYSIS BY DIELECTROPHORESIS

HJEIJ FATIMA^{1*}, DALMAY CLAIRE¹, LALLOUÉ FABRICE², BESSAUDOU ANNIE¹, BLONDY PIERRE¹, POTHIER ARNAUD¹

¹*XLIM – UMR 7252 Université de Limoges/CNRS, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France*

²*Homéostasie cellulaire et Pathologies – EA 3842 Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France*

Abstract: This paper presents the design and characterization of microsystems for the analysis of biological cells using dielectrophoresis techniques in a microfluidic environment. Dielectrophoresis is an electrokinetic technique used to manipulate cells which are electrically polarized when they are subjected to a non-uniform electric field. As the movement of cells is related to their dielectric properties, the study of cell dielectrophoretic behaviour appears as an attractive method for their characterization. In this paper, microsystems dedicated to the study of cell dielectrophoretic behaviour are studied. At first, devices have been investigated using polystyrene beads. In a second step, the behaviour of cancerous colorectal cells (SW-620 cell line) will be analysed and first results obtained in the 10 kHz to 10 MHz frequency range will be presented.

Keywords: microsystem, dielectric characterization, micro-particles, trapping, dielectrophoresis.

1. INTRODUCTION

Ces dernières années, de nouvelles techniques de manipulation et d'analyse de cellules biologiques, basées sur l'étude des interactions entre champs électriques et cellules, ont été particulièrement développées pour répondre aux nouveaux besoins de la médecine, comme par exemple pour le traitement (radiothérapie, ablation microonde...) et pour le diagnostic de certaines maladies comme le cancer [1]. Ainsi, une de ces techniques électriques « la diélectrophorèse (DEP) » a suscité un vif d'intérêt depuis le début des années 2000. Cette dernière décrit le mouvement de cellules, suspendues dans une phase liquide, qui est induit par l'application d'un champ électrique alternatif non uniforme. L'analyse de ce déplacement permet d'investiguer, sans marquage, les propriétés diélectriques intrinsèques pour chaque type de cellule, permettant ainsi d'obtenir des informations nouvelles et discriminantes avec une valeur ajoutée certaine lors de la caractérisation cellulaire d'une population [2].

L'exposition de cellules à un champ électrique requiert des structures d'électrodes capables de générer ce champ de manière efficace pour entraîner ensuite un déplacement visible et exploitable des cellules.

Dans cet objectif, les travaux réalisés portent sur la conception et la fabrication de géométries d'électrodes appropriées et dédiées à l'analyse du déplacement de cellules par diélectrophorèse dans un spectre de fréquences

* Corresponding author email: fatima.hjeij@xlim.fr

allant de 10 kHz à 10 MHz. L'idée était de disposer de structures simples afin d'étudier et d'analyser la réponse de cellules dispersées dans un milieu donné pour en mesurer leurs propriétés diélectriques intrinsèques.

2. DEP : PRINCIPE FONDAMENTAL

La DEP, méthode électrique, est utilisée pour manipuler, piéger, analyser et caractériser des particules biologiques. Elle repose sur la description du mouvement de translation des microparticules en flux, lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique non uniforme en amplitude. En effet, sous l'action du gradient de champ électrique, un moment dipolaire est induit dans les particules diélectriques. Par suite, ces particules seront polarisées et elles subiront une force diélectrophorétique, notée F_{DEP} , lui permettant de se déplacer dans leur milieu d'immersion. En modélisant la particule par une sphère de rayon r , cette force s'exprime par l'équation (1) :

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \varepsilon_0 \varepsilon_m \operatorname{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

Avec ε_0 la permittivité du vide, ε_m la permittivité du milieu d'immersion, $\operatorname{Re}[K(\omega)]$ la partie réelle du facteur Claussius-Mossotti, ω la pulsation du champ électrique appliqué et ∇E le gradient de champ électrique. Le facteur Claussius-Mossotti est défini par l'équation (2) :

$$K(\omega) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (2)$$

Où ε_p^* et ε_m^* sont les permittivités complexes de la particule et du milieu de suspension, respectivement. Cette fonction dépend principalement de la différence de polarisabilité entre les particules et leur milieu environnant et de la fréquence du champ appliqué. Par la suite, on peut distinguer trois cas : i) pour $\operatorname{Re}[K(\omega)] > 0$, les particules seront attirées par les régions de maximum intensité de champ électrique, autrement dit, elles seront piégées en DEP positive, ii) pour $\operatorname{Re}[K(\omega)] < 0$, les particules seront repoussées vers les régions de faible intensité de champ en se piégeant en DEP négative, iii) pour $\operatorname{Re}[K(\omega)] = 0$, les particules ne seront pas affectées par la F_{DEP} , donc elles ne peuvent pas être piégées [3].

Ainsi en balayant le spectre de fréquences, le déplacement des cellules induit entre les deux positions, DEP positive et DEP négative, permet de parcourir l'évolution fréquentielle de $K(\omega)$. D'où la fréquence pour laquelle cette courbe inverse sa polarité est connue par la fréquence de transition qui dépend des paramètres intrinsèques des cellules : taille, forme, propriétés diélectriques [2].

3. CONCEPTION ET RÉALISATION DES MICROSYSTÈMES DEP

Il existe une grande variété de structures permettant d'appliquer des forces de DEP reportées dans la littérature [4]. Le choix de la configuration dépend des applications visées.

Dans ce papier, pour étudier le comportement diélectrophorétique de cellules biologiques, il est nécessaire de générer un profil de champ électrique qui permettra d'établir des positions privilégiées pour les cellules aussi bien en DEP négative que positive. Dans ce contexte, il est également indispensable, lors de la conception des structures, de prendre en compte la taille moyenne des cellules à caractériser qui peut varier entre 10 et 20 μm .

Dans ce cadre, une structure basée sur l'utilisation de quatre électrodes, disposées à 90° les unes des autres (fig.1.a) [5], a été développée car elle offre la possibilité de générer des configurations de gradient de champ particulièrement intéressantes avec des tâches de champs très localisées (fig.1.b) (une distribution du champ maximum équivalente entre les électrodes, avec un minimum localisé au centre).

Les structures proposées sont réalisées en salle blanche à l'aide d'un procédé microélectronique standard. Les matériaux utilisés sont biocompatibles.

Pour amener les cellules en suspension jusqu'aux zones d'analyse du dispositif, un canal microfluidique est implémenté à la surface des électrodes métalliques. Le canal microfluidique (d'épaisseur 60 μm) est moulé dans du Polydiméthylsiloxane (PDMS), polymère conventionnellement utilisé en microfluidique. La pièce de PDMS est reportée sur le substrat et pressée sur le circuit à l'aide d'un support mécanique, de telle sorte que le canal soit centré sur les structures microélectrodes.

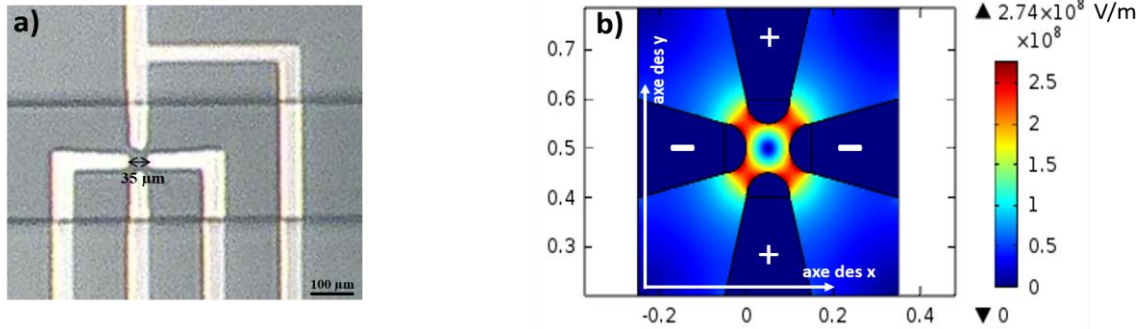


Fig.1. a) structure quadripôle réalisée, b) profil de l'intensité du champ électrique.

Les particules sont injectées dans le canal microfluidique en utilisant un contrôleur de flux (Fluigent), qui nous permet de gérer le mouvement des particules, en réglant précisément la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal. Ainsi, les particules peuvent être ralenties lors de leur arrivée au niveau de la zone d'analyse. Les microstructures sont quant à elles polarisées à l'aide de signaux alternatifs (AC) appliqués grâce à des pointes aiguilles conventionnelles. Ces signaux AC, dont l'amplitude varie entre 10 et 20 Vpp sont délivrés par un générateur de signaux dans la gamme de fréquences 10 kHz-10 MHz (Fig.2).

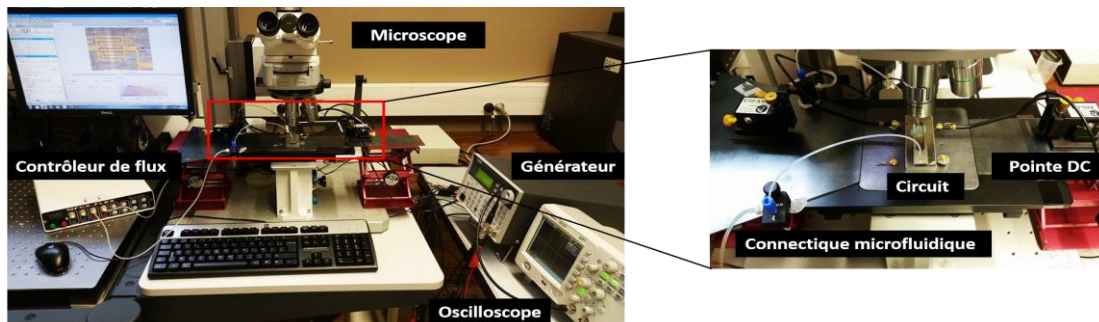


Fig.2. Banc expérimental.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans une première étape de validation, des billes de polystyrène, qui présentent un diamètre de l'ordre de 21.7 μm, ont été utilisées. Elles sont suspendues dans de l'eau déionisée (DI). Etant donné que les billes possèdent une permittivité très inférieure à celle de l'eau, elles présentent alors un facteur de Clausius-Mossotti qui restera négatif d'après l'équation 2 quelle que soit la fréquence de travail. Cela signifie que les billes de polystyrène ne réagissent qu'en DEP négative. Elles sont donc attirées par les régions de faible intensité de champ.

Le quadripôle est polarisé avec une tension de 20 Vpp@20 kHz de façon à ce que les deux électrodes opposées aient la même polarité. En générant un champ non uniforme, les billes se déplacent jusqu'au centre des quatre électrodes là où l'intensité du champ est minimale (Fig.3.b).

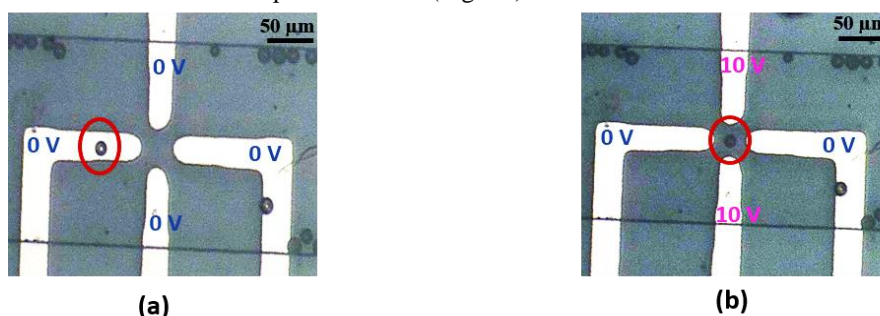


Fig.3. a) Localisation de billes en absence d'un champ électrique; b) piégeage d'une bille, soumise à un champ électrique, en DEP négative au centre du quadripôle.

Des essais préliminaires pour étudier le déplacement cellulaire, ont été faits sur des cellules cancéreuses du côlon (lignée cellulaire SW620) qui présentent un diamètre de l'ordre de 12 à 14 μm . Les cellules sont suspendues dans un milieu osmotique, composé majoritairement d'eau et de sucre dont sa conductivité est de l'ordre de 20 mS/m pour permettre aux cellules de pouvoir être piégées en DEP positive et les maintenir leur viabilité dans un milieu de survie.

En polarisant la structure à quatre électrodes avec une tension 10 V à 20 kHz, la cellule réagit en DEP négative. Elle se concentre et s'isole au centre des quatre électrodes où l'intensité du champ présente un minimum bien localisé dont la taille est comparable à celle de la cellule (Fig.1.b) (Fig.4.a). D'autre part, en augmentant la fréquence jusqu'à 10 MHz, la cellule change sa trajectoire en se collectant au bord de l'électrode (Fig.4.b), zone de forte intensité de champ où elle réagit donc en DEP positive.



Fig.4. a) cellule piégée en DEP négative; b) cellule piégée en DEP positive.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les tests réalisés sur les billes de polystyrène ont permis de mettre en évidence l'efficacité de piégeage des structures à quatre électrodes qui permettent l'isolement d'une particule unique. Les mesures préliminaires réalisées sur les cellules biologiques montrent que les microsystèmes DEP fabriquées permettent de piéger et contrôler le déplacement des cellules aussi bien en DEP positive et négative. Cette première étape est indispensable dans la perspective de détermination des propriétés diélectriques intracellulaires.

RÉFÉRENCES

- [1] Ronald Pethig, Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications, Biomicrofluidics, vol.4, no 022811, 2010, pp. 1-35.
- [2] Ronald Pethig, Anoop Menachery, Steve Pells, and Paul De Sousa, Dielectrophoresis: A Review of Applications for Stem Cell Research, Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol.2010, no 182581, 2010, pp. 1-7.
- [3] Ronald Pethig, Dielectrophoresis: An assessment of its potential to aid the research and practice of drug discovery and delivery, Advanced Drug Delivery Reviews, vol.65, 2013, pp.1589-1599.
- [4] Khashayar Khoshmanesha, Saeid Nahavandia, Sara Baratchib, Arnan Mitchellc, Kourosh Kalantar-zadeh, Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems, Biosensors and Bioelectronics, 2010, pp. 1-15.
- [5] S. Noorjannah Ibrahim, Lynn Murray, Volker Nock, John J. Evans, Maan M. Alkaiasi, The quadrupole microelectrode design on a multilayer biochip for dielectrophoretic trapping of single cells, Microelectronic Engineering, vol.97, 2012, pp. 369-374.