



Microfluidics/Microfluidique

Biopuces pour le traitement de cellules vivantes : micromanipulation des cellules par voie électrique ou microfluidique

Bruno Le Pioufle^a, Marie Frénéa^a, Agnès Tixier^b

^a *BIOMIS/SATIE CNRS UMR 8029, ENS Cachan, campus de Ker-Lann, 35170 Bruz, France*

^b *LIMMS CNRS université de Tokyo, 4-6-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 153-8505, Japon*

Disponible sur Internet le 28 mai 2004

Présenté par Guy Laval

Résumé

Après un bref état de l'art sur la recherche dans le domaine des biopuces cellulaire et des méthodes classiquement employées pour le placement et la caractérisation des cellules sur puce, nous présentons nos travaux sur la manipulation hautement parallélisée de cellules sur puce, par voie électrique ou microfluidique. Les applications envisagées des microdispositifs présentés concernent le transfert de gène, le criblage pharmacologique ou le tri cellulaire. *Pour citer cet article : B. Le Pioufle et al., C. R. Physique 5 (2004).*

© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Parallel cell biochips: cell placement using dielectrophoresis or microfluidic effects. After a brief overview of the state of the art in the domain of cell biochips, and more particularly, the usual methods for cell placement and characterization on a chip, our research on highly parallelized cell placement on a chip is presented. Single cell arraying methods, using dielectrophoresis effects, or microfluidic effects produced by bulk micromachined sub-micrometric capillaries are compared. Target applications of such cell biochips cover the domain of gene transfer on a large population of cells, parallelized cell sorting, or drug high-throughput screening on living cells. *To cite this article: B. Le Pioufle et al., C. R. Physique 5 (2004).*

© 2004 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : biopuce ; microfluidique ; diélectrophorèse ; cellule ; microsystème

Keywords : biochip; microfluidic; dielectrophoresis; cell; microsystems

1. Les biopuces cellulaires

La technologie puce à ADN a montré l'impact que peuvent avoir les technologies dérivées de la microélectronique sur les sciences du vivant. Ces biopuces sont en effet des outils clef pour l'étude du génome, du transcriptome, et pour le diagnostic. L'impact socio-économique de ce type de biopuces est potentiellement considérable. Le succès de cette technologie « biopuce à ADN » a conduit les chercheurs à imaginer d'autres types de biopuces : la biopuce à protéines permettant d'analyser les

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : pioufle@bretagne.ens-cachan.fr (B. Le Pioufle).

fonctions cellulaires par la détection directe des protéines cytoplasmiques ou de leur interaction avec leur ligand [1,2], et enfin plus récemment la biopuce à cellules, où des cellules vivantes entières sont micromanipulées et/ou analysées.

Une biopuce à cellules est une puce électronique destinée à la micromanipulation de cellules vivantes. Le pionnier de cette thématique de recherche est probablement le Professeur Washizu (Université de Kyoto) qui a proposé en 1989 une biopuce permettant la fusion de deux cellules par électro-perméabilisation de la membrane cytoplasmique [3].

Depuis cette invention, plusieurs catégories de biopuces à cellules ont vu le jour dans les laboratoires de recherche :

- *les biopuces cellulaires parallèles* : à l'image des biopuces ADN qui mettent un grand nombre d'oligonucléotides en réseau, les biopuces cellulaires parallèles mettent un grand nombre de cellules vivantes en réseau, à des fins d'analyse ou traitement simultané. Notre équipe a été une des premières à proposer le principe de biopuces cellulaires parallèles [4]. Le principe que nous développons consiste à mettre en réseau un très grand nombre de cellules sur une puce appareillée pour divers objectifs liés à une problématique biologique. Les cellules sont micro-cultivées de manière isolée ou en groupe sur chacun des points du réseau (suivant le type cellulaire), une ou plusieurs cellules par puit de microculture. Chaque puit est appareillé de façon à solliciter la cellule (ou le groupe de cellules) de manière électrique ou fluidique. Les applications visées couvrent le transfert de gène, le tri cellulaire, le criblage en pharmacologie. Un concept complémentaire a été proposé par Sabatini [5], où cette fois-ci ce sont les vecteurs de sollicitation cellulaire (dans le cas cité les transgènes) qui sont disposés en réseau sur la puce. Les cellules sont ensuite cultivées sur le support et présentent un caractère transgénique variable en fonction de leur position dans le réseau.
- *les biopuces séries* : ce concept de puce cellulaire se rapproche d'une cytométrie en flux miniature, les cellules étant convoyées une à une (un débit important permet de traiter un grand nombre de cellules), analysées et/ou traitées, puis aiguillées vers la sortie appropriée de la puce. Un exemple de ces microdispositifs convoyant par microfluidique les cellules est présenté dans [6] ou [7].
- *les biopuces pour la manipulation et l'analyse de cellules uniques* : Des microdispositifs ont été proposés, permettant d'isoler une cellule unique dans une microstructure destinée à son analyse et/ou à son traitement. On peut citer les travaux de Rubinski [8] où une cellule est amenée dans une microchambre d'analyse, par voie microfluidique grâce à un micro-trou d'aspiration. La microstructure proposée permet de focaliser un champ électrique sur la cellule immobilisée afin de perméabiliser sa membrane à des fins de transfert de gène. On peut également citer les travaux de Seger [9], où la cellule unique est isolée et en équilibre entre deux champs de forces, étant poussée par un courant microfluidique sur un champ de forces répulsif produit par diélectrophorèse négative. Là encore l'application visée est l'électroporation d'une cellule unique.

Ces variantes structurelles de biopuces cellulaires permettent la manipulation par voie électrique, mécanique ou biochimique d'une cellule vivante unique ou d'un grand nombre de cellules vivantes à la fois, pour diverses applications : tri cellulaire, fusion cellulaire, transfert de gènes, . . .

1.1. Méthodes de micromanipulation des cellules

Un nombre important de travaux concernent une fonctionnalité essentielle aux biopuces cellulaires, qu'est leur capacité à positionner précisément la ou les cellules ciblées sur la partie active de la puce. Il s'agit d'immobiliser les cellules, les mettre en réseau, les convoyeur, les guider, les trier. Plusieurs méthodes de micro-positionnement série ou parallèle sont classiquement envisagées :

- *par diélectrophorèse*, en utilisant la différence de permittivité diélectrique complexe entre la cellule et le milieu environnant. On peut citer les travaux de Gradl (Université de Berlin) [6], ou Morgan (Glasgow) [10] qui proposent des dispositifs série de manipulation par diélectrophorèse (les cellules sont immobilisées séquentiellement dans une cage diélectrophorétique pour analyse et tri), ou encore les travaux de Frénéa [11] qui propose des biopuces parallèles pour le rangement simultané de cellules par diélectrophorèse.
- *par voie mécanique ou fluidique* : une force mécanique permet de mettre en mouvement une ou plusieurs cellules. La force extérieure peut être produite par un dispositif mécanique : citons les travaux de Gauthier (LAB, Besançon) [12], où un micro-poussoir ferromagnétique micro-usiné est amené par le biais d'une force extérieure magnétique à convoyeur une cellule unique (un ovocyte dans le cas étudié). La force mécanique peut également être produite par un mouvement fluidique : citons les travaux de Tixier (Université de Tokyo) [13], qui range les cellules par l'aspiration au travers de micro-capillaires ou nano capillaires.
- *par voie biochimique* : une micro-structuration du substrat permet de guider l'adhésion cellulaire sur des surfaces prédéfinies. On peut citer les travaux de Whitesides (Harvard, USA) [14], Ingber (Harvard Medical School), les cellules sont amenées à proliférer sur des surfaces fonctionnalisées par des protéines d'affinité, délimitées par des zones répulsives pour les cellules (Poly Ethylène Glycol par exemple).

- *par voie optique*, en utilisant le principe de la pince optique [15], permettant la lévitation et l’immobilisation d’une cellule unique au point focal d’un laser. Ces différentes méthodes d’immobilisation peuvent être combinées, comme dans [16] où la force de diélectrophorèse est combinée aux pinces optiques.

1.2. Méthodes de caractérisation des cellules en microculture sur puce

Les biopuces cellulaires ont la capacité d’isoler une cellule unique (ou des cellules uniques en réseau), sur une zone spécifique, appareillée pour la mesure d’une donnée physique pertinente pour le phénomène de biologie cellulaire étudié (réponse protéique, transcriptome, mécano-transduction, réponse électrique, ...). Les cellules en micro-culture sur la puce sont sollicitées optiquement, mécaniquement ou électriquement, de même la réponse cellulaire est observée par voie optique, mécanique ou électrique. A titre d’exemple :

- l’expression protéique d’une cellule peut être détectée et étudiée de manière dynamique sur une puce à l’aide de cellules transgéniques, en associant le promoteur du gène d’intérêt à un gène codant pour une protéine fluorescente (GFP Green Fluorescent Protein par exemple). Les puces à électroporation étudiées dans la littérature utilisent ce principe pour valider l’efficacité du transfert de gène (voir par exemple les puces proposées dans [7]). De même les puces cellulaires proposées dans [17] utilisent ce principe pour évaluer l’efficacité d’un produit pharmacologique sur un réseau de cellules transgéniques.
- l’interaction mécanique entre la cellule et son substrat de culture, la mécano-transduction, ainsi que l’étude de la motilité cellulaire font l’objet de nombreuses études sur biopuces cellulaires. Diverses structures mécaniques sont proposées pour mesurer les forces exercées par la cellule sur son support. Par exemple dans [18] un microsystème constitué d’un réseau de micro-leviers permet de mesurer avec une grande précision les forces exercées par des fibroblastes en migration (0,2 nN sur une surface de mesure de 2 microns \times 2 microns). Une autre approche est proposée par [19], qui inclut des nano-billes fluorescentes dans le polymère supportant la culture cellulaire. Le polymère choisi étant d’une grande élasticité, les déformations de ce dernier, induisant des déplacements mesurables des nano-billes, permettent de mesurer les forces appliquées par la cellule en migration. Une cartographie des forces sur toute la surface d’interaction cellulaire peut ainsi être obtenue.
- une voie pour analyser les cellules sur puce consiste à recueillir leur réponse électrique, en les caractérisant par leur impédance, ou par leur potentiel membranaire. [20] propose un microdispositif pour la caractérisation en flux sur une biopuce de type série, de cellules non adhérentes par spectroscopie d’impédance. Les cellules sont préfocalisées entre les électrodes par diélectrophorèse négative avant caractérisation, ce qui est avantageux pour la reproductibilité de la mesure, et permet d’autre part le tri cellulaire après analyse. Concernant les cellules adhérentes, de nombreux travaux existent dans la littérature, concernant la mesure du potentiel membranaire de neurones en micro-culture sur puce. On peut notamment citer les travaux de Pine (Caltech) [21], Offenhauser (Glasgow) [22], ou encore ceux de Degenaar [23] ou Morin [24] où les signaux sont recueillis à partir d’architectures neuronales ex-vivo définies par confinement microfluidique sur la puce.

2. Vers des biopuces cellulaires hautement parallélisées pour le transfert de gènes, le criblage pharmacologique ou le tri cellulaire haut débit

La spécificité de notre recherche consiste à étudier et concevoir des puces à cellules hautement parallélisées, traitant à la fois un très grand nombre de cellules vivantes (depuis quelques milliers jusqu’à plusieurs centaines de milliers). Les applications majeures visées par ces biopuces touchent le transfert de gène, le criblage en pharmacologie et le tri cellulaire parallélisé. Nous travaillons sur le concept d’une biopuce cellulaire parallèle pour le transfert de gènes ayant pour buts : (i) d’analyser finement et comprendre sur cellules uniques en micro-culture les limitations physiques du transfert de gène ; et (ii) à terme augmenter le taux d’efficacité de la transfection [4]. Le microdispositif proposé est conçu pour avoir la capacité de ranger les cellules vivantes dans un réseau bidimensionnel de haute densité, et devrait faciliter le transfert de gène en milieu intracellulaire par une micro-électroporation des cellules ainsi isolées et micro-cultivées. Ce type de biopuce devrait favoriser le développement de la thérapie génique, méthode d’avenir pour le traitement des maladies génétiques, mais dont le développement est encore limité par le manque d’efficacité des méthodes actuelles de transfert de gène.

En ce qui concerne les aspects du rangement en réseau des cellules, plusieurs stratégies sont développées parallèlement et testées par notre groupe : (i) par voie électrique, en appliquant une force de diélectrophorèse sur les cellules, grâce à une topologie particulière du champ électrique sur la biopuce [11] ; (ii) par voie microfluidique, par l’utilisation d’un réseau microfluidique d’aspiration des cellules (micro-capillaires micro-usinés dans le silicium).

2.1. Micro-positionnement des cellules sur puce par voie électrique

Le principe de la diélectrophorèse est évoqué dès 1951 par Pohl, qui décrit par la suite son utilisation pour le déplacement de particules électriquement neutres, mais se polarisant sous l’effet d’un champ électrique non uniforme [25]. Depuis, ce principe a été utilisé avec succès pour la micromanipulation de cellules, sur des micro-dispositifs destinés à la séparation cellulaire [26], la fusion cellulaire [27] ou le tri cellulaire [28,29]. Dans ce contexte, les travaux menés dans notre groupe visent à utiliser ce principe de diélectrophorèse pour manipuler simultanément un très grand nombre de cellules uniques (de l’ordre de la dizaine de milliers) pour les placer en réseau haute densité, une cellule par point du réseau [30]. Les cellules uniques ainsi rangées en réseau sont immobilisées en vue de manipulations (traitements) ultérieures (électroporation par exemple) par le biais de microchambres micro-usinées sur la puce.

L’expression de la force de diélectrophorèse à laquelle est soumise une particule diélectrique sphérique de rayon r dans un champ non uniforme est [31] :

$$F = 2\pi r^3 \epsilon_m \operatorname{Re}[K(\omega)] \nabla(E^2),$$

où

$$\begin{aligned} \epsilon_p^* &= \epsilon_p - j \frac{\sigma_p}{\omega}, \\ \epsilon_m^* &= \epsilon_m - j \frac{\sigma_m}{\omega}, \quad K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \end{aligned}$$

où ϵ_p , ϵ_m , σ_p , σ_m sont les constantes diélectriques et conductivités respectives de la particule et de son milieu d’immersion, et ω , E pulsation et intensité efficace du champ électrique.

Dans le cas qui nous intéresse ici, nous travaillons dans des conditions de diélectrophorèse négative, où la particule manipulée est moins polarisable que le milieu environnant ($\operatorname{Re}[K(\omega)] < 0$). Dans ces conditions, les cellules sont amenées par force de diélectrophorèse négative vers les minima de champ. Le champ est produit par des ensembles quadripolaires mis en réseau. Dans l’exemple représenté sur la Fig. 1, la zone active des électrodes est de forme hyperbolique, ce qui amène à la topologie du champ représentée sur la Fig. 2.

Cette structure élémentaire est reproduite des milliers de fois ce qui permet, en jouant sur les dimensions relatives entre les électrodes et les cellules, de mettre des ensembles cellulaires de taille souhaitée en réseau sur la puce. Nous montrons dans cet article la possibilité de mettre en réseau des cellules uniques par ce procédé.

2.1.1. Fabrication de la puce et préparation des cellules

Les conditions expérimentales sont ici résumées, pour plus de détails il conviendra de se reporter à [30]. Deux réseaux interdigués de pistes enterrées permettent d’alimenter les électrodes de la puce en préservant l’alternance des polarités. Le substrat en silicium monocristallin faiblement dopé subit tout d’abord une oxydation thermique (320 nm de SiO_2). Les deux réseaux de pistes conductrices (130 nm d’or sur une couche d’accroche en chrome de 50 nm) sont obtenus par photolithographie. Ces réseaux électriques sont ensuite recouverts d’oxyde de silicium déposé par pulvérisation sur une épaisseur de 100 nm.

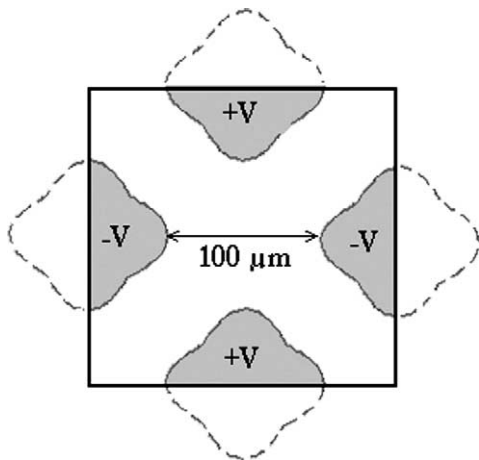


Fig. 1. Ensemble quadripolaire.

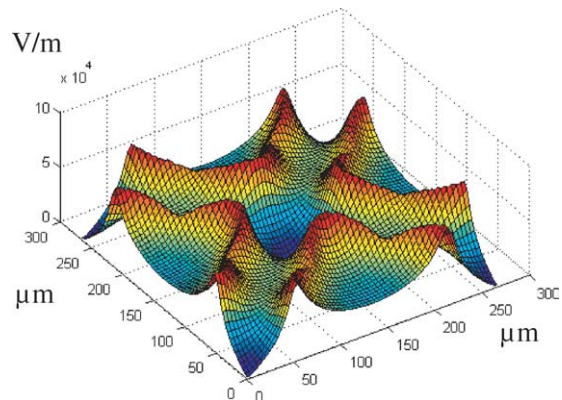


Fig. 2. Topologie du champ.

Une étape de gravure humide de l'oxyde, à laquelle succède une évaporation de chrome et d'or permet la réalisation de vias métalliques assurant l'interconnexion entre les futures électrodes et leur réseau d'alimentation. Les électrodes (200 nm d'or sur une couche d'accroche de 50 nm de chrome) sont ensuite définies par photolithographie. Les éventuelles microchambres permettant le maintien des cellules mises en réseau sont obtenues par usinage au KOH, en utilisant la couche d'oxyde comme masque.

Les cellules PC3 utilisées pour l'expérience (cellules cancéreuses de prostate humaines ; ATCC, CRL-1435) ont été maintenues plusieurs jours en culture dans du milieu RPMI 1640 (Sigma), additionné de sérum de veau fœtal, (10 %), pyruvate de sodium (1 mM), glutamine (2 mM) et antibiotiques. Après extraction de leur milieu de culture par centrifugation, elles sont remises en solution dans un tampon dédié aux expériences de diélectrophorèse. Ce milieu contient un mélange de K_2HPO_4 (2 mM) et KH_2PO_4 (2 mM) dans des proportions ajustées pour obtenir un pH valant 7,4. L'ajout de saccharose (Sigma, 300 mM) à ce tampon faiblement conducteur permet de protéger les cellules d'un choc osmotique (un test d'exclusion du bleu de trypan a permis de vérifier la viabilité des cellules après trois heures dans ce milieu). Une quantité de 80 μ l de suspension cellulaire (contenant environ 10^4 cellules) est déposée sur le micro-système à l'intérieur d'un joint en silicone faisant office de cuvette. Une lamelle de microscope est utilisée en guise de couvercle empêchant l'évaporation de la solution. La tension sinusoïdale est délivrée aux électrodes à l'aide d'un testeur sous pointes (Karl Suss, PM5) relié à un générateur de signaux basse fréquence.

Nous pouvons voir sur la Fig. 3 des cellules de prostate humaines mises en réseau sur la puce (une cellule unique par point du réseau), par diélectrophorèse négative. La Fig. 4 montre le maintien des cellules mises en réseau par des microchambres. Les cellules utilisées pour cette expérience sont des lymphocytes (cellules Jurkat).

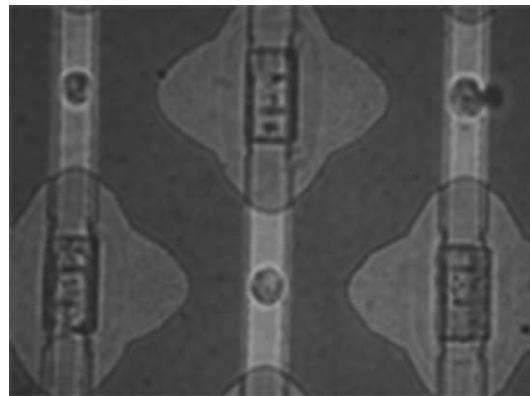


Fig. 3. Cellules de prostatites mises en réseau sur puce par diélectrophorèse négative ($f = 20$ kHz, $\sigma_m = 220$ μ S cm^{-1}).

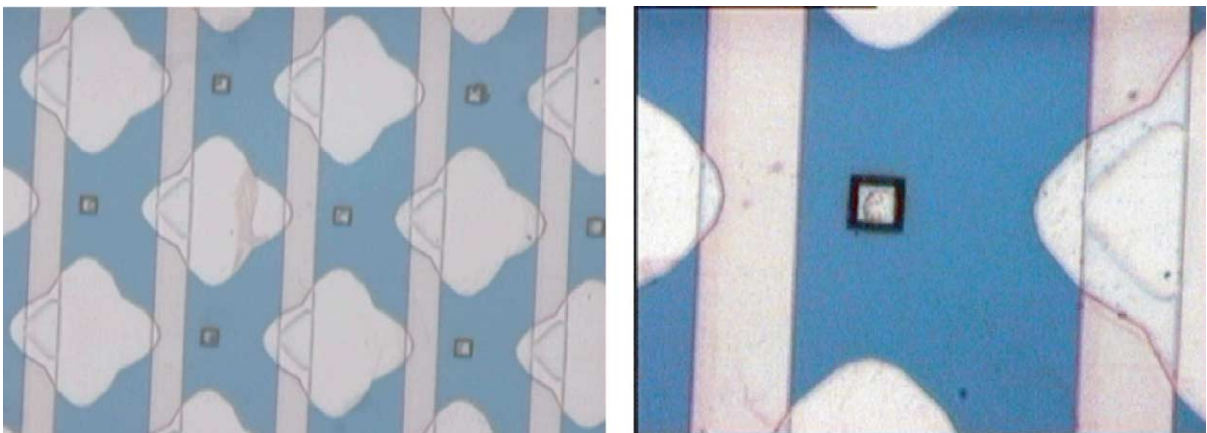


Fig. 4. Maintien des cellules en réseau dans des microchambres.

2.2. Micro-positionnement des cellules sur puce par force microfluidique

Nous avons également montré la faisabilité du placement parallèle de cellules sur puce par force microfluidique. Un réseau de micro ou nano-ouvertures traversant le substrat de la puce est micro-usiné en employant divers procédés technologiques décrits ci-dessous, le diamètre de ces ouvertures allant de la centaine de nanomètres à la dizaine de micromètres suivant le procédé. Une dépression est appliquée sous le substrat, qui crée un flux du milieu de culture traversant ces ouvertures. Le flux entraîne les cellules qui vont se micro-positionner sur ces ouvertures pour les obturer.

2.2.1. Réseau de micro-capillaires par gravure sèche du silicium

Le réseau matriciel de micro-ouvertures d'aspiration fluidique peut être obtenu par gravure plasma profonde du silicium (utilisation d'une Inductive Coupled Plasma Reactive Ion Etching, ICP RIE). Cependant cette technique ne permet pas la traversée d'un substrat de plusieurs centaines de microns par un capillaire de quelques microns² de section (le plasma ne peut pénétrer efficacement dans des microcapillaires si étroits et profonds). Des microcapillaires de sections différentes sont donc micro-usinées à l'arrière et à l'avant du substrat (de quelques microns de côté à l'avant du substrat et de quelques dizaines de microns de côté à l'arrière du substrat, voir Fig. 5), qui se rencontrant forment une ouverture de quelques microns² présentée aux cellules.

Nous pouvons voir sur la Fig. 6 une cellule Jurkat (lymphocyte humain) micro-positionnée sur l'ouverture microfluidique de la puce.

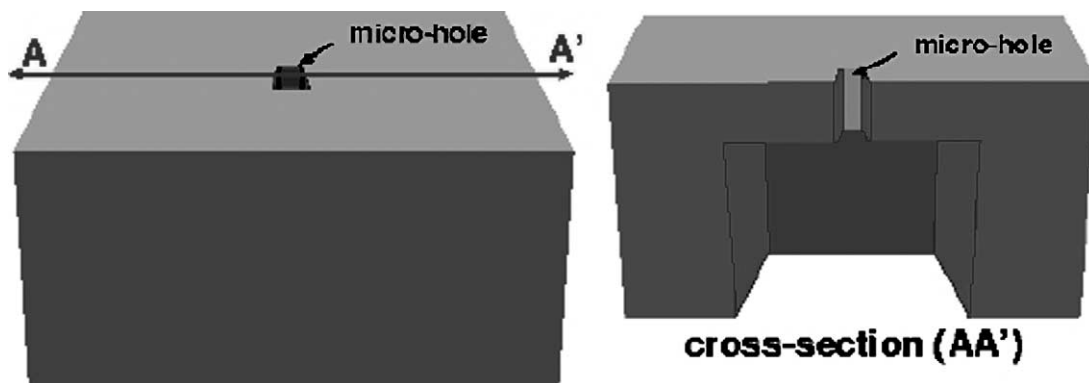


Fig. 5. Ouvertures microfluidiques réalisées par ICP-RIE.

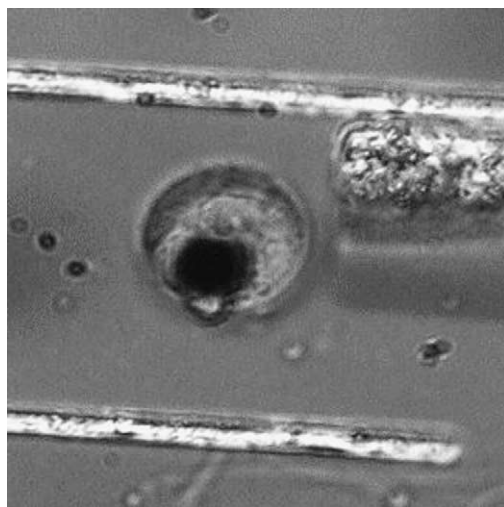


Fig. 6. Cellule micro-positionnée sur une micro-ouverture fluidique (5 microns).

2.2.2. Réseau de nano-capillaires par gravure chimique

Un réseau matriciel de nano-ouvertures d'aspiration fluïdique peut être obtenu par gravure chimique d'un substrat en silicium cristallin. Ce procédé innovant utilise uniquement la gravure anisotropique KOH et TMAH d'une plaquette de silicium standard, des deux cotés de la plaquette. Des ouvertures sub-micrométriques apparaissent à l'intersection des deux canaux orthogonaux. La structure est schématisée Fig. 7, et une vue au microscope électronique d'une nano-ouverture obtenue par ce procédé est présentée Fig. 8. La taille de la plus petite ouverture est de 90 nanomètres sur 180 nanomètres. Les dimensions de ces ouvertures micrométriques ou submicrométriques peuvent être aisément modifiées, simplement en jouant sur le temps de gravure TMAH de la face arrière.

Une puce microfluidique avec un réseau d'ouvertures de 1 à 2 micromètres a été testée avec des cellules de levure (6 micromètres de diamètre). La Fig. 9 montre le comportement du dispositif avant et pendant l'aspiration, puis après reflux fluïdique. La position des cellules par rapport aux nano-ouvertures est repérée sur un schéma situé en regard des photos obtenues par microscopie optique.

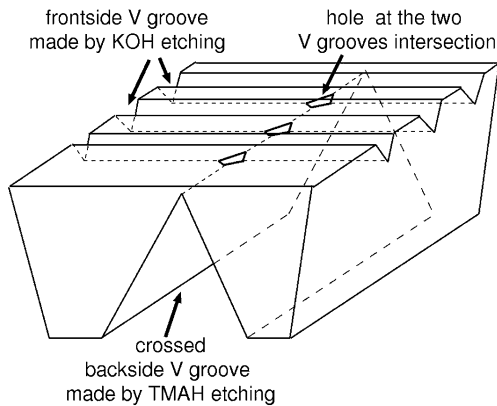


Fig. 7. Principe de réalisation du réseau de nano-ouvertures fluïdiques.

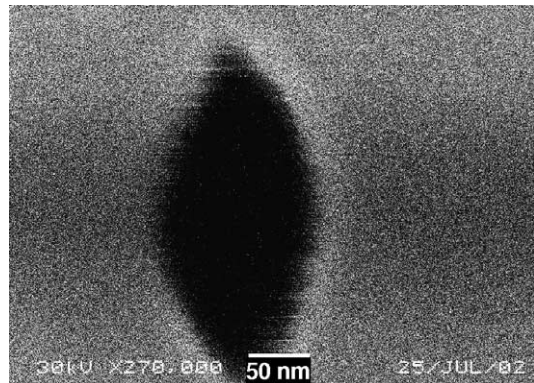


Fig. 8. Vue au microscope électronique d'une nano-ouverture fluïdique.

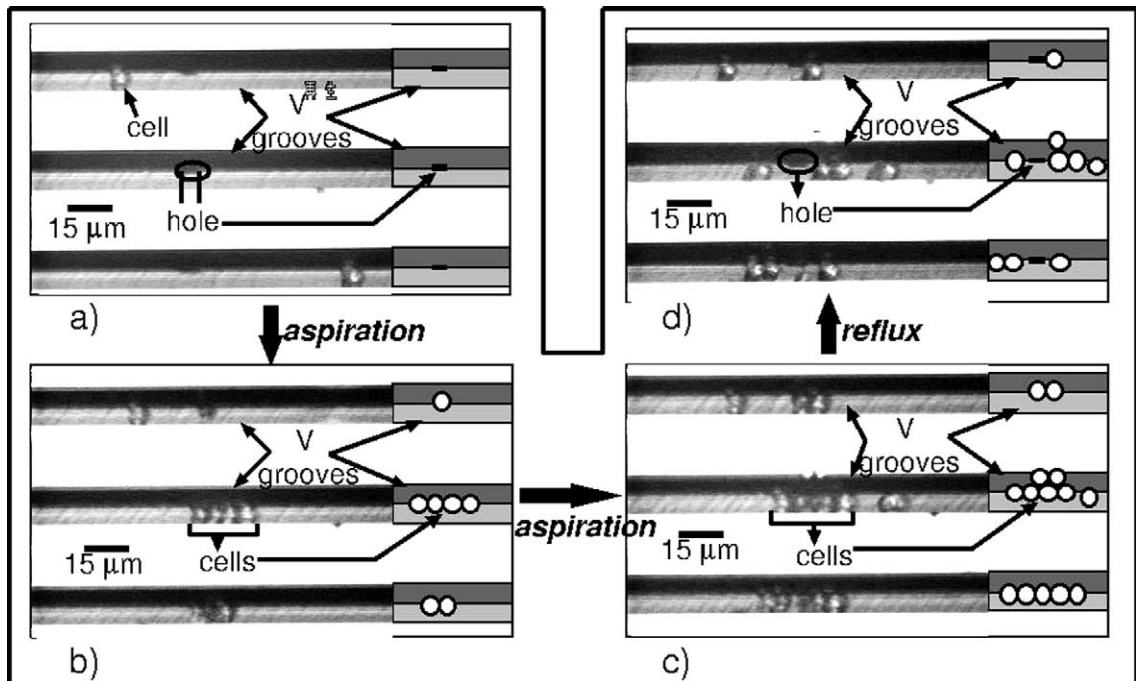


Fig. 9. Aspiration de cellules de levure par nano-capillaires : (a) avant le flux d'aspiration ; (b), (c) pendant le flux d'aspiration ; et (d) après reflux fluïdique.

Remerciements

Ces recherches ont été effectuées grâce au support des collectivités territoriales (Région Bretagne, Département Ile-et-Vilaine, Rennes-Métropole), du CNRS, et du Ministère de la recherche. Nous remercions également le VDEC center de l'Université de Tokyo pour la fabrication de masques.

Références

- [1] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R.A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science* 293 (2001) 2101–2105.
- [2] K.B. Lee, S.J. Park, C.A. Mirkin, J. Smith, M. Mrksich, *Science* 295 (2002) 1702–1705.
- [3] M. Washizu, in: *Proc. of Integrated Micro-Motion Systems*, 1989, pp. 417–432.
- [4] B. Le Pioufle, P. Surbled, H.S. Chun, H. Fujita, H. Nagai, Y. Murakami, E. Tamiya, in: *Proc. of Transducers '99, Sendai (J)*, 1999, pp. 768–771.
- [5] S.N. Bailey, R.Z. Wu, D.M. Sabatini, *Drug Discovery Today* 7 (2002) S113–S118.
- [6] G. Gradl, T. Müller, A. Pfennig, in: *Proc. of Micro Total Analysis Systems*, 2000, pp. 443–446.
- [7] Y. Huang, B. Rubinsky, *Sensors and Actuators A* 104 (2003) 205–212.
- [8] Y. Huang, B. Rubinsky, *Sensors and Actuators A* 89 (2001) 242–249.
- [9] U. Seger, S. Gawad, A. Scheer, P. Renaud, in: *Proc. of MicroTAS (Nara)*, vol. 2, 2002, pp. 796–798.
- [10] L. Cui, H. Morgan, in: *Proc. of MicroTAS 2000*, 2000, pp. 443–446.
- [11] M. Frénéa, H. Lhermite, B. Le Pioufle, H. Fujita, in: *Proc. of IEEE-EMBS (USA)*, 2002, pp. 140–143.
- [12] M. Gauthier, E. Piat, in: *Proc. of IEEE-EMBS*, vol. 2, 2002, pp. 3199–3204.
- [13] A. Tixier-Mita, Y. Mita, K. Cozic, M. Frenea, B. Le Pioufle, H. Fujita, in: *Proc. of MicroTAS*, vol. 2, 2002, pp. 888–890.
- [14] E. Ostuni, C.S. Chen, D.E. Ingberg, G.M. Whitesides, *Langmuir* 17 (2001) 2828–2834.
- [15] A. Ashkin, J.M. Dziedzic, T. Yamane, *Nature* 330 (1987) 769–771.
- [16] G.R. Fuhr, C. Reichle, in: *Proc. of MICROTAS 2000 (Enschede)*, 2000, pp. 261–264.
- [17] R.Z. Wu, S.N. Bailey, D.M. Sabatini, *Trends in Cell Biology* 12 (2002) 485–488.
- [18] C.G. Galbraith, M.P. Sheetz, *PNAS* 94 (1997) 9114–9118.
- [19] R.J. Pelham Jr., Y.-L. Wang, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 935–945.
- [20] S. Gawad, P. Batard, U. Seger, S. Metz, P. Renaud, in: *Proc. of MICROTAS (Nara)*, vol. 2, 2002, pp. 649–651.
- [21] E. Claverol-Tinture, J. Pine, *J. Neurosci. Methods* 117 (2002) 13–21.
- [22] M.C.T. Denyer, M. Riehle, S.T. Britland, A. Offenhauser, *Medical & Biological Engineering & Computing* 36 (1998) 638–644.
- [23] P. Degenaar, B. Le Pioufle, L. Griscom, A. Tixier, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, H. Fujita, *J. Biochem.* 130 (2001) 367–376.
- [24] F. Morin, M. Denoual, L. Griscom, B. Le Pioufle, H. Fujita, E. Tamiya, in: *Proc. of MICROTAS (Nara)*, vol. 2, 2002, pp. 515–517.
- [25] H.A. Pohl, K. Kaler, *Cell Biophys.* 1 (1979) 15–28.
- [26] X.B. Wang, Y. Huang, J.P.H. Burt, *J. Phys. D* 26 (1993) 1278–1285.
- [27] S. Masuda, M. Washizu, T. Nanba, *IEEE Trans. Industry Appl.* 25 (1989) 732–737.
- [28] M. Washizu, T. Nanba, S. Masuda, *IEEE Trans. Industry Appl.* 26 (1990) 352–356.
- [29] S. Fiedler, S.G. Shirley, T. Schnelle, *Anal. Chem.* 70 (9) (1998) 1909–1915.
- [30] M. Frenea, N. Melaine, B. Le Pioufle, A. Tixier, H. Fujita, in: *Proc. of Micro Total Analysis Systems 2002*, vol. 1, 2002, pp. 578–580.
- [31] T.B. Jones, *Electromechanics of Particles*, Cambridge University Press, 1995.