

WO 2006/018528 A1



européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : L'invention concerne un ensemble destiné à l'électroporation d'un ensemble cellulaire constitué d'au moins une cellule, comprenant des moyens de surveillance de l'alimentation électrique des électrodes d'électroporation, caractérisé en ce que les moyens de surveillance comprennent un estimateur apte à estimer la part effective de l'alimentation électrique qui est délivrée à une ou plusieurs parties cellulaires déterminées de l'ensemble cellulaire, à partir de données reçues par l'estimateur comprenant des données représentatives de l'alimentation électrique et des données relatives à des composantes évaluées de bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée. L'invention concerne en outre des procédés et des utilisations dudit ensemble destiné à l'électroporation.

SURVEILLANCE ET CONTRÔLE D'UNE ELECTROPORATION

L'invention concerne un ensemble destiné à l'électroporation d'un ensemble cellulaire constitué d'au moins une cellule, comprenant des moyens de surveillance et éventuellement de contrôle de l'alimentation électrique des électrodes d'électroporation.

L'électroporation est la génération d'électropores, au sein de membranes cellulaires, consécutive à l'application (classiquement entre deux électrodes) d'un champ électrique supérieur à une valeur seuil déterminée. Ces électropores ne sont pas sélectifs et n'importe quelle espèce chimique peut alors pénétrer la cellule. Cette technique, utilisée pour le transfert de substances chimiques de tailles variées (petites molécules chimiques ou macromolécules, classiquement des molécules d'ARN ou d'ADN), ouvre le champ à de nombreuses applications dans les domaines biomédicaux, comme le transfert non viral de gènes par exemple.

L'électroporation est attribuée à une déstabilisation réversible de la membrane provoquant la pénétration de molécules d'eau et une diminution locale de l'impédance électrique. Si le champ électrique continue de croître, la déstabilisation devient irréversible et provoque la destruction de la cellule.

Il est donc important de contrôler le degré d'électroporation pour s'affranchir d'une destruction cellulaire, tout en assurant une internalisation de substances chimiques de tailles variées (transfert de macromolécules d'ADN, d'ARN ou de petites molécules thérapeutiques).

En outre, un contrôle de la taille des électropores permettrait d'assurer une ouverture suffisamment large pour internaliser la substance, tout en pérennisant la ou les cellule(s).

Il existe des techniques connues de surveillance et de contrôle de l'électroporation.

Des méthodes de surveillance sont basées sur la mesure de la bioimpédance durant l'électroporation, telle que par exemple décrite dans le document WO 99/52589.

On pourra aussi tenter de contrôler en temps réel l'électroporation en surveillant d'une part les variations d'impédance du tissu électroporé, et d'autre part en asservissant en retour l'alimentation électrique des électrodes à ces variations d'impédances observées, tel que décrit dans les documents US
5 2003/0194808 et WO 01/81533.

Ces techniques de contrôle semblent pouvoir ainsi détecter en temps réel le dépassement des différents seuils d'électroporation (seuils d'apparition des électropores et seuil de destruction des cellules) en mesurant une chute d'impédance caractéristique, et pouvoir alors rétro-agir de façon adaptée sur le champ électrique
10 appliqué.

Cependant, ces techniques de contrôle au moyen d'une simple mesure d'impédance ne sont pas satisfaisantes, l'électroporation étant un phénomène dynamique, non-linéaire, et donc difficilement modélisable.

En particulier, les tensions de seuil elles-mêmes (seuil d'apparition des électropores et seuil de destruction des cellules) sont intimement liées à la géométrie des
15 électrodes, à la qualité du contact électrode – tissu cellulaire, à l'influence du milieu extracellulaire, à la bioimpédance qui dépend de nombreux paramètres électriques (autant de paramètres qui nécessitent de contrôler la forme et l'amplitude des grandeurs électriques appliquées), etc.

D'autre part, ces techniques ne proposent pas réellement de méthodes pour
20 suivre en temps réel l'état des cellules biologiques électroporées.

Un objectif de l'invention est d'améliorer le contrôle en temps réel, par rapport à l'état de la technique, du degré d'électroporation cellulaire, pour maximiser le nombre de cellules électroporées et pour minimiser le nombre de cellules détruites,
25 en jouant notamment sur la taille des électropores au sein des membranes cellulaires.

Un deuxième objectif de l'invention est de s'affranchir de tous les paramètres externes à l'électroporation (géométrie des électrodes, qualité du contact électrode-tissu, influence du milieu extracellulaire, etc.).

Un troisième objectif de l'invention est d'estimer en temps réel des
30 variables d'états propres aux électropores du tissu (i.e. le champ électrique

transmembranaire moyen, et la densité moyenne du courant traversant les électropores).

Un quatrième objectif de l'invention est de contrôler en temps réel le champ électrique délivré par les électrodes au tissu, en prenant en compte les grandeurs
5 électriques estimées lors de la surveillance, afin d'auto-adapter l'électroporation aux phénomènes électro-chimiques apparaissant au niveau des cellules traitées.

Un cinquième objectif de l'invention est la mise en œuvre d'une méthode simple à implémenter pour atteindre les précédents objectifs.

Un sixième objectif de l'invention est de mettre en œuvre un dispositif et un
10 procédé d'électroporation adaptés quelle que soit la nature biologique de l'échantillon, quelle que soit la configuration dans laquelle se trouve cet échantillon (*in vivo*, *ex vitro* ou *in vitro*), et quel que soit le milieu dans lequel est situé l'échantillon biologique.

Un septième objectif de l'invention est d'adapter la forme de l'impulsion à la
15 charge biologique considérée (i.e. échantillon biologique considéré), cette impulsion n'étant pas nécessairement carrée, comme celle classiquement rencontrée dans l'état de la technique.

A cet effet, l'invention propose, selon un premier aspect un ensemble destiné à l'électroporation d'un ensemble cellulaire constitué d'au moins une cellule,
20 comprenant des moyens de surveillance de l'alimentation électrique des électrodes d'électroporation, caractérisé en ce que les moyens de surveillance comprennent un estimateur apte à estimer la part effective de l'alimentation électrique qui est délivrée à une ou plusieurs parties cellulaires déterminées de l'ensemble cellulaire, à partir de données reçues par l'estimateur comprenant des données représentatives
25 de l'alimentation électrique et des données relatives à des composantes évaluées de bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée.

D'autres caractéristiques de l'invention sont :

- lesdites données relatives auxdites composantes évaluées de bio-impédance sont indépendantes des données représentatives de l'alimentation électrique, et sont
30 stockées en mémoire,

- les composantes de bio-impédance ont été évaluées précédemment en l'absence d'électroporation,

- chaque partie cellulaire déterminée est choisie parmi le milieu intracellulaire, le milieu extracellulaire, les membranes cellulaires, les pores formés
5 des membranes cellulaires dudit ensemble cellulaire,

- l'estimateur est apte à estimer, à partir de données comprenant lesdites données qu'il reçoit, et de relations existant entre elles, au moins une des grandeurs électriques suivantes : l'intensité moyenne du courant moyen I_c délivré aux seules cellules de l'ensemble cellulaire, la tension moyenne U_{intra} et l'intensité moyenne du
10 courant moyen I_{intra} appliqués au seul milieu intracellulaire, la tension moyenne U_m appliquée à la seule membrane cellulaire, l'intensité moyenne du courant électrique I_p délivré aux seuls pores formés de la membrane cellulaire,

- l'estimateur est apte à estimer, à partir de données comprenant lesdites données qu'il reçoit, des données relatives à l'épaisseur cellulaire moyenne l , des
15 données relatives à l'épaisseur moyenne h de membrane cellulaire, des données relatives à la distance e entre les électrodes d'électroporation, et de relation existant entre ces données, le champ électrique appliqué aux seules membranes cellulaires de l'ensemble cellulaire,

- l'estimateur est apte à estimer, à partir de données comprenant lesdites
20 données qu'il reçoit, des données relatives à la surface S des électrodes utilisées pour l'électroporation, et de relation existant entre ces données, la densité moyenne du courant électrique délivré à travers les pores formés ;

- l'ensemble comprend en outre les électrodes utilisées pour l'électroporation, un générateur alimentant électriquement les électrodes et apte à générer une tension
25 U impulsionnelle et/ou un courant I impulsionnel adaptés à l'électroporation, des moyens pour mesurer la tension U et/ou l'intensité du courant I fournissant à l'entrée de l'estimateur lesdites données représentatives de l'alimentation électrique, et des moyens pour asservir les valeurs de U et/ou de I fournis par le générateur aux données délivrées en sortie de l'estimateur, de sorte à réaliser ainsi
30 un contrôle sur l'électroporation ;

- l'ensemble comprend en outre un générateur apte à générer une tension et un courant inférieurs respectivement à la tension seuil et au courant seuil à partir desquels l'électroporation débute, des moyens pour mesurer la bio-impédance de l'ensemble cellulaire soumis au champ électrique des électrodes alimentées par le générateur avec une tension et/ou un courant inférieurs respectivement à la tension seuil, et des moyens pour évaluer des composantes de bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée de l'ensemble cellulaire, à partir des données fournies en sortie des moyens pour mesurer la bio-impédance ;

- l'ensemble comprend en outre des moyens de commutation aptes à commuter l'alimentation électrique des électrodes d'un premier des deux générateurs au deuxième des deux générateurs, de sorte à pouvoir ainsi réaliser des mesures de bio-impédance entre deux impulsions électriques avec les mêmes électrodes ;

- une utilisation de cet ensemble destiné à l'électroporation de l'ensemble cellulaire, pour l'administration de médicaments.

Selon un deuxième aspect, l'invention propose un procédé de surveillance d'une électroporation cellulaire comprenant les étapes suivantes :

- (a) recevoir des données représentatives du champ électrique appliqué ou de l'alimentation électrique fournie lors de l'électroporation ;
- (b) recevoir des données relatives à des composantes évaluées de bio-impédance d'une ou plusieurs parties cellulaires déterminées d'ensemble cellulaire ;
- (c) calculer une estimation de la part effective de l'alimentation électrique qui est délivrée à chaque partie cellulaire déterminée, à partir des données reçues à l'étape (a) et à l'étape (b).

D'autres caractéristiques du procédé de surveillance sont :

- lesdites données relatives auxdites composantes évaluées de bio-impédance sont indépendantes des données représentatives du champ électrique, et sont mémorisées,
- le procédé comprend en outre au moins une étape d'évaluation, préalablement à l'étape (a), des composantes de bio-impédance, en l'absence

d'électroporation, effectuée avant toute électroporation et/ou entre deux impulsions électriques,

- chaque partie cellulaire déterminée est choisie parmi le milieu intracellulaire, le milieu extracellulaire, les membranes cellulaires, les pores formés
5 des membranes cellulaires dudit ensemble cellulaire,

- l'étape (c) donne une estimation, à partir de données comprenant lesdites données reçues en (a) et en (b), et de relations existant entre elles, d'au moins une des grandeurs électriques suivantes : la tension moyenne U_{extra} appliquée au seul milieu extracellulaire, la tension moyenne U_{intra} appliquée au seul milieu
10 intracellulaire, la tension moyenne U_m appliquée à la seule membrane cellulaire, le courant électrique moyen I_p délivré aux seuls pores formés de la membrane cellulaire,

- l'étape (c) donne une estimation, à partir de données comprenant lesdites données reçues en (a) et en (b), des données relatives à l'épaisseur cellulaire
15 moyenne l , des données relatives à l'épaisseur moyenne h de membrane cellulaire, des données relatives à la distance e entre les électrodes utilisées pour l'électroporation, et de relation existant entre ces données, du champ électrique moyen appliqué aux seules membranes cellulaires de l'ensemble cellulaire,

- l'étape (c) donne une estimation, à partir de données comprenant lesdites
20 données reçues en (a) et en (b), des données relatives à la surface S des électrodes utilisées pour l'électroporation, et de relation existant entre ces données, de la densité moyenne du courant électrique délivré à travers les pores formés,

- le procédé comprend en outre, après l'étape (c), une étape d'asservissement du champ électrique à l'estimation réalisée lors de l'étape (c),

25 - le procédé comprend en outre, avant l'étape (a), une étape de mesure de caractéristiques du champ électrique appliqué pour l'électroporation, ou de caractéristiques représentatives de l'alimentation électrique des électrodes (corrélée avec le champ électrique), pour fournir lesdites données représentatives du champ électrique appliqué ou de l'alimentation électrique fournie reçues à l'étape (a),

30 - le procédé comprend en outre, avant l'étape (a), une mesure de la bio-impédance d'un ensemble cellulaire en l'absence d'électroporation ; l'évaluation

des composantes de bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée de l'ensemble cellulaire est alors réalisée, à partir de cette mesure de bio-impédance.

Selon un troisième aspect, l'invention propose un procédé d'électroporation d'un ensemble cellulaire constitué d'au moins une cellule, comprenant les étapes

5 suivantes :

- (a) appliquer une ou plusieurs impulsions de champ électrique à l'ensemble cellulaire, apte à provoquer une électroporation dans l'ensemble cellulaire ;
 - (b) mesurer des données représentatives du champ électrique appliqué ou de l'alimentation électrique fournie aux électrodes pour l'électroporation ;
 - (c) mettre en œuvre ledit procédé de surveillance.
- 10

D'autres caractéristiques du procédé d'électroporation sont :

- le procédé comprend en outre, avant l'étape (a) et/ou lors de l'étape (a) entre deux impulsions électriques, les étapes suivantes :

- 15 appliquer un champ électrique à l'ensemble cellulaire, dont l'amplitude est inférieure à celle du champ électrique seuil au-delà duquel les pores membranaires se forment par électroporation ;
- mesurer la bio-impédance de l'ensemble cellulaire ;
- évaluer des composantes de bio-impédance d'une ou plusieurs parties cellulaires déterminées de l'ensemble cellulaire, à partir des résultats de mesure de l'étape (b), de sorte à fournir lesdites données relatives aux composantes évaluées de la bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée de l'ensemble cellulaire,
- 20

- une utilisation du procédé d'électroporation pour l'administration de médicaments.

25

D'autres caractéristiques, buts et avantages de l'invention ressortiront de la description qui suit, qui est purement illustrative et non limitative, et qui sera lue en regard des dessins annexés sur lesquels :

La figure 1 représente de façon schématique un ensemble destiné à l'électroporation selon l'invention.

30

La figure 2 représente un estimateur selon l'invention.

La figure 3 représente un montage électrique modélisant les caractéristiques électriques d'une cellule ou d'un ensemble de plusieurs cellules en absence d'électroporation.

La figure 4 représente un montage électrique modélisant les caractéristiques
5 électriques d'une cellule ou d'un ensemble de plusieurs cellules électroporée(s).

La figure 5 est un graphe représentant l'évolution d'une tension membranaire moyenne U_m en fonction du temps d'application d'un tissu biologique à un champ électrique d'électroporation, calculée selon l'invention.

La figure 6 est un graphe représentant l'évolution d'une intensité moyenne I_p
10 passant par les électropores d'une membrane électroporée en fonction du temps d'application d'un tissu biologique à un champ électrique d'électroporation, calculée selon l'invention.

En référence à la figure 1, un ensemble 1 destiné à l'électroporation cellulaire selon l'invention comprend des électrodes 51 et 52 placées autour de l'ensemble
15 cellulaire 100 (à une ou plusieurs cellules) alimentées par un générateur 30 apte à générer une puissance électrique adaptée à l'électroporation de l'ensemble cellulaire 100, à savoir classiquement une tension U impulsionnelle et un courant I impulsionnel adaptées à l'électroporation. L'ensemble 1 comprend aussi des moyens de mesure des grandeurs électriques, tels qu'un ampèremètre 61 et un
20 voltmètre 62, représentatives de l'alimentation électrique des électrodes 51-52 par le générateur 30, ces moyens fournissant alors en sortie 65 et 66 des données représentatives de l'alimentation électrique, telles que des données relatives à U et à I .

En amont du générateur 30, une unité de contrôle 20 commande, via la liaison 25,
25 le générateur 30 pour qu'il délivre aux électrodes 51-52 un profil de tension U et/ou de courant électrique I désiré. En amont de l'unité de contrôle 20, des consignes (ici de champ transmembranaire E_m et de densité moyenne J_p du courant électrique passant à travers les pores) sont envoyées automatiquement ou après une saisie manuelle (par un utilisateur via une interface par exemple de type clavier ou souris d'ordinateur) vers
30 l'unité de contrôle 20 qui les prend en compte en corrigeant alors la commande générale

à envoyer vers le générateur 30. Selon l'invention, ces consignes sont modifiées en 15 et 16 selon les données (ici $\hat{E}_m$ et $\hat{J}_p$) fournies en sortie 11 et 12 d'un estimateur 10.

Cet estimateur 10 est apte à estimer la part effective de l'alimentation électrique qui est délivrée à une ou plusieurs parties cellulaires déterminées de l'ensemble cellulaire 100, une partie cellulaire étant typiquement le milieu
5 intracellulaire, le milieu extracellulaire, la membrane cellulaire, ou les pores formés de la membrane cellulaire, de l'ensemble cellulaire 100. Cet estimateur 10 base principalement son estimation sur les données (U , I) qu'il reçoit (via les liaisons 65 et 66) des moyens de mesure 61-62, et sur des données relatives à des composantes
10 évaluées de bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée (initialement stockées en mémoire et reçues via la liaison 95), ainsi que sur des relations existant entre elles.

L'ensemble 1 peut en outre comprendre un appareillage permettant d'évaluer ces dernières données relatives à des composantes de bio-impédance de chaque partie
15 cellulaire déterminée. Ce dernier appareillage comprend un deuxième générateur 40 apte à générer une tension et un courant inférieurs respectivement à la tension seuil et au courant seuil au-delà desquels l'électroporation débute. L'ensemble 1 peut dans ce cas être muni de moyens de commutation 81-82 et 71-72 aptes à faire basculer l'alimentation électrique des électrodes 51-52 du deuxième générateur 40
20 sur le premier générateur 30, afin que les électrodes 51-52 fournissent d'abord un champ électrique apte à ne pas électroporer l'ensemble cellulaire 100 puis un champ électrique apte à l'électroporer.

Une unité de mesure 90 est reliée en amont du deuxième générateur 40, et comprend :

- 25 – des moyens pour mesurer la bio-impédance de l'ensemble cellulaire 100 en l'absence d'électroporation, lorsque le deuxième générateur 40 délivre sa basse tension,
- des moyens pour évaluer les composantes de bio-impédance de partie(s) cellulaire(s) déterminée(s) (i.e. extracellulaire, intracellulaire, membranaires, et/ou
30 autres) de l'ensemble cellulaire, à partir des données fournies par les moyens pour mesurer la bio-impédance,

— des moyens pour stocker les données relatives aux composantes évaluées de bio-impédance de partie(s) cellulaire(s) déterminée(s), afin que ces données puissent être utilisées (via la liaison 95) par l'estimateur 10 lors de l'électroporation.

5 Optionnellement, cette unité de mesure 90 permet en outre d'évaluer d'autres paramètres que des composantes électriques, tels que des paramètres liés à la configuration des électrodes (surface S , distance e inter-électrodes), et/ou des paramètres relatifs à l'ensemble cellulaire 100 à électroporer (épaisseur moyenne h des membranes cellulaires, épaisseur moyenne l des cellules biologiques).

10 En référence à la figure 2, la présente invention peut aussi concerner, non pas un ensemble 1 complet destiné à l'électroporation tel que représenté sur la figure 1, mais uniquement un dispositif de surveillance comprenant un estimateur 10, apte à estimer la part effective de l'alimentation électrique qui est délivrée à une ou plusieurs parties cellulaires déterminées de l'ensemble cellulaire 100 électroporé.

15 Ce dispositif de surveillance peut typiquement comprendre un microprocesseur permettant de réaliser notamment les calculs selon l'invention, une mémoire pour stocker des données telles que des données électriques et des formules mathématiques, et des ports ou liaisons d'entrée (65, 66, 95) qui permettent une entrée des données utiles et des ports ou liaisons de sortie (11, 12) qui permettent une sortie des données estimées.

20 L'estimateur 10 reçoit à cet effet (via les liaisons 65 et 66) des données représentatives de l'alimentation électrique délivrée aux électrodes 51-52 pour une électroporation d'un ensemble cellulaire 100 ou des données représentatives du champ électrique appliqué (telles que par exemple les amplitudes des champs électriques impulsionnels, des tensions impulsionnelles, des courants impulsionnels, des fréquences
25 d'impulsions, des durées d'impulsions, et/ou autres).

 L'estimateur 10 reçoit en outre (via la liaison 95) des données relatives à des composantes évaluées de bio-impédance de partie(s) cellulaire(s) déterminée(s), et optionnellement des informations relatives à la configuration des électrodes et à des caractéristiques biologiques de l'ensemble cellulaire 100 électroporé.

30 Pour bien comprendre les caractéristiques électriques d'une cellule biologique, il peut être nécessaire, d'abord, de savoir que les tissus biologiques (ou un ensemble

cellulaire 100 quelconque) sont composés de cellules vivantes baignant dans un milieu extracellulaire. Le milieu intracellulaire est protégé par une membrane plasmique qui sélectionne le passage de certaines espèces chimiques, la membrane cellulaire est une bicouche lipidique présentant un fort pouvoir d'isolation électrique.

5 En référence à la figure 3, on pourrait alors modéliser les caractéristiques électriques d'une cellule 100 (ou d'un ensemble à plusieurs cellules 100) par un circuit électrique dont la partie extracellulaire 130 serait représentée par une résistance R_{extra} et un condensateur C_{extra} en parallèle, la partie intracellulaire 120 par une résistance R_{intra} , et la membrane cellulaire 110 par une résistance R_m et un condensateur C_m en parallèle.
 10 La partie intracellulaire 110 est en série avec la partie intracellulaire 120, et l'ensemble de ces deux parties cellulaires est en parallèle avec la partie extracellulaire 130.

Cependant, il serait faux de considérer la membrane 110 comme un simple circuit RC. En effet, un coefficient α appelé « coefficient de Cole-Cole » (voir en particulier J. Chem. Phys. 9 341, (1941) de K. S. Cole et R. H. Cole) intervient dans
 15 l'expression des paramètres électriques de cette membrane 110, ce coefficient α tenant notamment compte de l'influence du mode de répartition des cellules et de leur dispersion en tailles (dans le cas d'un ensemble cellulaire 100 à plusieurs cellules) sur la bio-impédance. Les caractéristiques électriques comprennent donc en outre ce coefficient α de Cole-Cole.

20 Toutes ces caractéristiques électriques forment autant de composantes de bio-impédance qui peuvent avoir été par exemple identifiées préalablement, à partir d'une mesure de bio-impédance, par une méthode des moindres carrés.

Pour un champ électrique sinusoïdal délivré, à une fréquence $f = \omega/2\pi$, à l'ensemble cellulaire 100 à une amplitude inférieure à celle au-delà de laquelle la
 25 membrane est susceptible de présenter des électropores, la bio-impédance $Z_t(\omega)$ de l'ensemble cellulaire 100 peut alors être écrite selon la formule suivante :

$$Z_t(\omega) = \frac{1}{j\omega C_{extra}} // R_{extra} // \left(R_{intra} + \frac{R_m}{1 + (jR_m C_m \omega)^\alpha} \right) \quad (1)$$

Cette bio-impédance $Z_t(\omega)$, mesurée pour un champ électrique appliqué faible (i.e. non susceptible de provoquer une électroporation de l'ensemble cellulaire 100), a
 30 ainsi un comportement linéaire.

A partir de la mesure de $Z_t(\omega)$, et de ω , on peut donc évaluer les composantes R_{extra} , C_{extra} , R_{intra} , R_m , C_m et α de l'ensemble cellulaire 100.

Ces composantes de bio-impédance sont alors avantageusement stockées en mémoire.

5 Lorsqu'on applique alors un champ électrique (ou une tension U et/ou un courant I aux électrodes employées pour l'électroporation) susceptible de créer des électropores dans l'ensemble cellulaire 100, des électropores se forment dans les membranes 110 qui deviennent ainsi perméables à des molécules, faisant apparaître alors, cette fois-ci, un comportement non-linéaire des cellules
10 électroporées.

La Demanderesse propose, en référence à la figure 4, un montage électrique équivalent aux caractéristiques électriques modélisées d'un ensemble cellulaire 100 ainsi électroporé. La Demanderesse propose de modéliser la partie électrique liée aux électropores par un shunt 112 de la partie membrane non-altérée 111, dont la
15 charge est un dipôle non-linéaire D_p . Une partie du courant électrique I_c qui alimente directement les cellules ira donc à la partie membrane non-altérée 111, et une autre partie de I_c , notée I_p , sera uniquement le courant traversant la partie membrane altérée 112 à travers les électropores.

Dans ce contexte, l'estimateur 10 est alors apte à estimer la part effective de
20 l'alimentation électrique (U, I) qui est fournie aux électrodes ou du champ électrique appliqué aux parties cellulaires déterminées de l'ensemble cellulaire 100.

Il est à noter que, si les données reçues via les liaisons 65-66 proviennent de mesure de tension U et/ou courant I faites en amont des électrodes 51-52, il est préférable que la fréquence du signal sinusoïdal alors choisi pour cette tension
25 et/ou ce courant ne soit pas trop faible, pour que les effets du contact électrodes-tissu cellulaire ne perturbent pas notablement les résultats des calculs d'estimation à effectuer (listés ci-dessous). Typiquement, la fréquence est choisie supérieure à 50 Hz.

Ainsi, la tension moyenne U_{extra} appliquée au seul milieu extracellulaire 130
30 peut être calculée de la façon suivante :

$$U_{extra} = U \quad (2)$$

Ainsi, le courant électrique moyen I_c délivré aux seules cellules de l'ensemble cellulaire 100, peut être calculé de la façon suivante :

$$I_c = I - \frac{U}{R_{extra}} - C_{extra} \frac{dU}{dt} \quad (3)$$

La formule (3) permet d'éliminer les effets liés au milieu extracellulaire.

5 Ainsi, la tension moyenne U_{intra} et le courant moyen I_{intra} délivrés au seul milieu intracellulaire de l'ensemble cellulaire 100, peuvent être calculés de la façon suivante :

$$I_{intra} = I_c ; U_{intra} = R_{intra} I_{intra} \quad (4)$$

10 Ainsi, la tension moyenne U_m appliquée à la seule membrane cellulaire de l'ensemble cellulaire 100, peut être calculée de la façon suivante :

$$U_m = U - R_{intra} I_c \quad (5)$$

La formule (5) permet d'éliminer les effets liés au milieu intracellulaire 120.

Le courant moyen I_p délivré aux seuls pores formés de la membrane cellulaire de l'ensemble cellulaire 100, peut être calculé en modélisant dans le domaine
15 fréquentiel la partie membrane non-altérée 111 par une admittance à élément à phase constante (encore appelée admittance « CPE », de l'acronyme anglo-saxon « Constant Phase Element »). Ce modèle prend en compte une distribution des constantes de temps électriques de la membrane et peut être utilisé au niveau d'un tissu cellulaire (*in vivo*, *ex vivo*), ou de cellule(s) en milieu artificiel (*in vitro*). Dans le
20 domaine temporel, la membrane non-altérée peut alors être caractérisée au moyen de sa réponse impulsionnelle $y_{CPE}(t)$ calculée par la transformée de Laplace inverse de cette admittance, qui peut être exprimée ainsi :

$$y_{CPE}(t) = TL^{-1} \left[\frac{1 + (\tau p)^\alpha}{R_m} \right] \quad (6)$$

où : TL^{-1} représente la Transformée de Laplace inverse,

$$25 \quad \tau = R_m C_m,$$

$p = j\omega$, où « j » indexe la partie imaginaire d'un nombre complexe.

On obtient alors, pour I_p , l'expression suivante :

$$I_p(t) = I_c(t) - y_{CPE}(t) * U_m(t) \quad (7)$$

où le produit symbolisé par « * » est un produit de convolution, entre la tension moyenne transmembranaire $U_m(t)$ et sa réponse impulsionnelle $y_{CPE}(t)$.

La formule (7) permet d'éliminer l'influence de la membrane non-altérée 111, pour ne conserver alors que l'intensité moyenne du courant lié aux électropores (membrane altérée 112).

Il est à noter que toutes les grandeurs électriques précédentes (U_{extra} , I_c , U_{intra} , I_{intra} , U_m , I_p) correspondent à des grandeurs macroscopiques. Ainsi, par exemple, U_m correspond à la tension estimée moyenne appliquée à l'ensemble des membranes des cellules composant l'ensemble cellulaire 100.

En l'absence d'électroporation, $I_c(t)$ est naturellement égale à $y_{CPE}(t)*U_m(t)$, et $I_p(t)$ devient alors nulle, comme si le dipôle non-linéaire D_p avait alors une impédance infinie. Le modèle établi par la Demanderesse (en référence à la figure 4) fonctionne donc aussi bien pour un ensemble cellulaire 100 subissant une électroporation que pour un ensemble cellulaire 100 ne subissant aucune électroporation.

Optionnellement, l'estimateur 10 reçoit en outre, via la liaison 95, des informations relatives à la configuration des électrodes et à des caractéristiques biologiques de l'ensemble cellulaire 100 électroporé, afin d'estimer d'autres grandeurs électriques représentatives de la répartition de l'alimentation dans l'ensemble cellulaire.

Ainsi, si l'estimateur 10 reçoit des données relatives à l'épaisseur cellulaire moyenne l , des données relatives à l'épaisseur moyenne h de membrane cellulaire (qui est typiquement comprise entre environ 5 et environ 6 nanomètres), et des données relatives à la distance inter-électrodes e , l'estimateur 10 peut calculer le champ électrique moyen estimé $\hat{E}_m$ appliqué aux seules membranes cellulaires 110 de l'ensemble cellulaire 100 au moyen de la formule suivante :

$$\hat{E}_m = \frac{1}{2} \frac{U_m}{e} \frac{l}{h} \quad (8)$$

La formule (8) permet de normaliser la tension moyenne transmembranaire par rapport aux tailles des cellules et à la distance inter-électrodes afin de définir le champ électrique transmembranaire moyen. Ce champ électrique moyen estimé $\hat{E}_m$

représente donc le champ électrique moyen appliqué à chaque membrane cellulaire de l'ensemble cellulaire 100.

Ainsi, si l'estimateur 10 reçoit des données relatives à la surface S des électrodes utilisées pour l'électroporation, l'estimateur 10 peut calculer la densité
 5 moyenne estimée $\hat{J}_p$ du courant électrique délivré à travers les pores formés de l'ensemble cellulaire 100 au moyen de la formule suivante :

$$\hat{J}_p = \frac{I_p}{S} \quad (9)$$

$\hat{J}_p$ est une grandeur macroscopique.

L'estimateur 10 peut ainsi fournir en sortie une ou plusieurs de ces grandeurs
 10 électriques (estimées à l'aide des formules précédentes), et/ou d'autres grandeurs électriques participant au même concept.

Par exemple, l'estimateur 10 peut fournir sur les sorties 11 et 12 un ou plusieurs des couples de valeurs suivants : (U_{intra}, I_{intra}) , (U_m, I_p) , $(\hat{E}_m, \hat{J}_p)$.

La sortie (ici 11 et 12) de l'estimateur 10 peut alors être reliée à un terminal
 15 de type écran, ou à d'autres moyens de calculs, ou à une mémoire dans laquelle les données qu'il fournit sont stockées, ou à un autre système tel qu'un dispositif de contrôle de l'alimentation électrique des électrodes d'électroporation.

Cet estimateur 10 permet donc une surveillance en temps réel du degré d'électroporation de l'ensemble cellulaire 100, puisqu'il fournit des données
 20 permettant d'adapter (manuellement ou automatiquement par un système d'asservissement permettant une auto-adaptation du système) le champ électrique d'électroporation selon les phénomènes électro-chimiques observés. On pourra ainsi tenter de maximiser le nombre de cellules électroporées et minimiser le nombre de cellules détruites, en jouant sur la taille des électropores au sein des membranes
 25 cellulaires.

Cet estimateur 10 peut permettre aussi de s'affranchir de tous les paramètres externes à l'électroporation (géométrie des électrodes, qualité du contact électrode-tissu, influence du milieu extracellulaire, etc.), s'il fournit par exemple

en sortie une estimation de tension membranaire moyenne U_m et/ou une estimation de l'intensité moyenne I_p du courant de pores.

Cet estimateur 10 donne en outre en temps réel des variables d'états propres aux électropores de l'ensemble cellulaire 100 (i.e. le champ électrique transmembranaire moyen estimé $\hat{E}_m$, et la densité moyenne estimée $\hat{J}_p$ du courant traversant les électropores).

Cet estimateur 10 peut fonctionner quelle que soit la nature biologique de l'ensemble cellulaire 100 à électroporer, quelle que soit la configuration dans laquelle l'ensemble cellulaire 100 se trouve (*in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro*), et quelque soit le milieu extracellulaire dans lequel il est baigné.

Selon une première variante de l'invention, le dispositif de surveillance comprenant l'estimateur 10 (et éventuellement un écran et/ou autres) fait partie d'un dispositif de contrôle d'une électroporation d'un ensemble cellulaire 100. Ce dispositif de contrôle comprend alors, en référence à la figure 1, l'estimateur 10 et ladite unité de contrôle 20. Il comprend en outre des moyens pour générer des consignes en amont de l'unité de contrôle (au niveau de 17 et 18), ces moyens pouvant être une interface utilisateur au moyen de laquelle ce dernier rentre les consignes souhaitées, ou des moyens de générer automatiquement ces consignes selon des paramètres déterminés, ou des moyens aptes à aller chercher en mémoire, à une certaine fréquence, les consignes pré-enregistrées. En outre, ce dispositif de contrôle comprend des moyens 15 et 16 pour modifier les consignes désirées (provenant de 17 et 18) en fonction des données d'estimation fournies en sortie (11 et 12) de l'estimateur 10.

Ce dispositif de contrôle permet alors d'asservir l'électroporation à l'estimation faite par l'estimateur 10.

Selon une deuxième variante de l'invention, le dispositif de contrôle fait partie d'un ensemble destiné à l'électroporation comprenant en outre ledit générateur 30 de tension U et/ou de courant I impulsionnels adaptés à l'électroporation, les électrodes 51-52 d'électroporation, ainsi que les moyens de mesure 61-62 de grandeurs électriques de l'alimentation dispensée par le générateur 30 ou par les électrodes 51-52, ces moyens de mesure fournissant des informations

représentatives du champ électrique appliqué ou de l'alimentation électrique fournie aux électrodes pour l'électroporation, à l'entrée de l'estimateur 10 (via les liaisons 65 et 66).

Le générateur 30 peut être un générateur de puissance commandé, permettant de délivrer des niveaux de tension et/ou de courant (éventuellement élevés) afin de déclencher une électroporation de la "charge biologique" (i.e. l'ensemble cellulaire 100). Ce générateur 30 peut délivrer des impulsions de forme quelconque, puisque l'estimateur 10 peut faire adapter (en jouant sur la consigne envoyée à l'unité de contrôle 20) la forme de l'impulsion à la charge biologique considérée (i.e. ensemble cellulaire 100). Cette impulsion n'est donc pas nécessairement carrée.

Les électrodes 51-52 peuvent être une paire d'électrodes permettant d'imposer un champ électrique d'électroporation sur une "charge biologique" (i.e. l'ensemble cellulaire 100) qui peut être un tissu cellulaire *in vivo* ou *ex vivo*, ou des cellules *in vitro* (voire une cellule unique), ou un tissu cellulaire placé dans une bio-puce.

Les moyens de mesure 61-62 peuvent comprendre des moyens de mesure de grandeurs électriques représentatives de l'alimentation électrique fournie aux électrodes pour l'électroporation, incluant ainsi par exemple un ampèremètre 61 mesurant l'intensité du courant absorbé par l'ensemble cellulaire 100 et un voltmètre 62 mesurant la tension inter-électrodes.

Les moyens de mesure 61-62 peuvent aussi comprendre des électrodes de mesure, disposées sur l'ensemble cellulaire 100, pour mesurer directement le champ électrique appliqué à l'ensemble cellulaire, et s'affranchissant ainsi de l'influence, sur le résultat des mesures, du contact électrodes-tissu.

Cet ensemble permet notamment d'asservir les grandeurs propres aux électropores sur une consigne particulière, permettant de contrôler le degré d'électroporation des cellules sans les détruire. Le contrôle d'un champ électrique transmembranaire moyen E_m permet de déclencher le phénomène d'électroporation sans détruire les membranes. Le contrôle de la densité moyenne J_p du courant traversant les électropores permet de maîtriser la surface moyenne des électropores.

Préalablement à la mise en œuvre de l'électroporation, il peut être mis en œuvre une évaluation des composantes de bio-impédance (R_{extra} , C_{extra} , R_{intra} , C_{intra} ,

R_m , C_m , α , ...) de chaque partie cellulaire déterminée (milieu extracellulaire 130, milieu intracellulaire 120, membrane 110) de l'ensemble cellulaire 100, à partir d'une mesure de bio-impédance de l'ensemble cellulaire 100 en l'absence d'électroporation.

5 A cet effet, un dispositif selon l'invention pour réaliser de telles fonctions est prévu, incorporé ou non audit dispositif de surveillance (en référence à la figure 2), ou audit dispositif de contrôle selon la première variante de l'invention, ou audit ensemble destiné à l'électroporation selon la deuxième variante de l'invention.

10 Ce dernier dispositif nécessite un deuxième générateur 40, à électronique basse tension permettant de déterminer le comportement linéaire de la "charge biologique" (i.e. l'ensemble cellulaire 100) et des électrodes (51-52) pour mesurer la bioimpédance $Z_b(\omega)$ en l'absence de toute électroporation.

 En outre, ce dispositif comporte l'unité de mesure 90 précédemment décrit (en référence à la figure 1).

15 Le tissu biologique traité et ses électrodes sont donc au préalable caractérisés par une mesure d'impédance petits signaux. Cette mesure met en œuvre une électronique fréquentielle basse tension, qui ne provoque pas d'électroporation.

 Dans le cas où ce dispositif d'évaluation de composantes d'impédances est incorporé au reste de l'ensemble destiné à l'électroporation, on obtient alors l'ensemble 1
20 de la figure 1.

 Optionnellement, des moyens de commutation 71-72 et 81-82 sont prévus entre les générateurs 30 et 40 et les électrodes 51-52, permettant de basculer l'alimentation des électrodes d'un générateur 30 ou 40 à l'autre générateur 40 ou 30.

25 Ce montage peut alors permettre d'alimenter en basse tension les électrodes 51-52 à l'aide du générateur 40 entre deux impulsions électriques haute tension délivrées par le générateur 30. On peut ainsi réaliser des mesures de bio-impédance entre deux impulsions électriques d'électroporation, avec les mêmes électrodes 51-52, sans intervenir sur ces dernières.

30 Ce montage permet donc d'observer les modifications éventuelles que peuvent subir les composantes électriques de bio-impédance (en l'absence d'électroporation) au fur et à mesure que le nombre impulsions données au tissu

cellulaire 100 augmente, réactualisant ainsi les valeurs respectives de ces composantes. Ce montage peut être particulièrement utile lors d'électroporation *in vivo*, les cellules pouvant alors éventuellement gonfler sous l'effet de l'électroporation et donc voir leurs composantes électriques légèrement évoluer dans le temps).

L'ensemble cellulaire 100 à électroporer selon l'invention peut être un tissu vivant *in vivo* autour duquel ont été placés les électrodes 51-52, ou un tissu prélevé (*ex vivo*), ou un tissu placé dans un milieu artificiel (*in vitro*), ou un tissu cellulaire placé dans une biopuce. Il peut être végétal, animal ou humain. L'électroporation peut faire rentrer en jeu des produits actifs tels que des médicaments minéraux, des protéines ou peptides (acide nucléique, molécule ADN ou ARN ayant des séquences codant des gènes thérapeutiques ou des gènes intéressant la santé ou visant des objectifs biotechnologiques, oligonucléotide naturel ou modifié,...) pour les administrer à l'ensemble cellulaire 100.

Etude expérimentale :

La Demanderesse présente ci-après des résultats obtenus après la mise en œuvre d'un procédé d'électroporation selon l'invention, faite sur le tissu 100 d'une pomme de terre.

Le tissu 100 est placé entre deux électrodes 51 et 52 en acier inoxydable, présentant une surface S de 30 mm² et séparées d'une distance e d'environ 6 mm.

La bio-impédance du tissu est mesurée en utilisant un analyseur d'impédance HP4192A, et un générateur de basse tension sinusoïdale (c'est à dire un générateur apte à délivrer des tensions sinusoïdales inférieures à la tension seuil au-delà de laquelle des électropores apparaîtraient) à 1 V d'amplitude et à des fréquences comprises entre 50Hz et 10MHz. Cette dernière gamme de fréquence est préférablement choisie car elle permet de détecter les composantes de bio-impédance sans que ceux-ci soient notablement perturbés par les effets du contact électrodes-tissu cellulaire.

Les composantes linéaires de bio-impédance sont alors évaluées au moyen d'un calcul utilisant une identification aux moindres carrés du module de la bio-impédance mesurée, et sont les suivants :

$$R_{extra}=18 \text{ k}\Omega \quad ; \quad R_{intra}=151 \text{ }\Omega \quad ; \quad R_m=1,1 \text{ k}\Omega \quad ; \quad C_m=7,2 \text{ nF} \quad ; \quad \alpha=0,7677$$

Une bonne concordance a été remarquée entre l'impédance mesurée et l'impédance reconstituée selon la formule (1) à partir des composantes identifiées.

Une fois ces composantes connues, des tensions et courants impulsionnels unipolaires de longueur d'environ 150 μ s chacune, en faisant varier les amplitudes
5 entre 0 V et 300 V, sont appliquées aux électrodes 51-52 par un générateur 30 approprié.

Les formes d'onde des intensités I du courant délivré aux électrodes 51-52, alors mesurés, ont alors révélé un comportement linéaire pour des tensions inférieures à 100 V, alors qu'une grande non-linéarité apparaissait au-delà de 125
10 V.

La tension seuil à partir de laquelle les électropores commencent à apparaître serait donc située entre 100 V et 125 V dans les conditions de l'expérience.

La figure 5 représente la tension transmembranaire moyenne macroscopique U_m en fonction du temps d'application du tissu 100 au champ électrique pulsé,
15 calculée à l'aide de la formule (5).

La figure 6 représente l'intensité moyenne macroscopique I_p passant à travers les pores en fonction du temps d'application du tissu 100 au champ électrique pulsé, calculée à l'aide de la formule (7).

On peut constater que $U_m(t)$ augmente avec $U(t)$, et que $I_p(t)$ apparaît à partir
20 de la tension seuil (située entre 100 V et 125 V) et qu'elle devient importante dès qu'on applique une tension $U(t)$ bien supérieure à cette tension seuil (ici $U(t) = 200$ V pendant l'impulsion).

On peut observer que la tension membranaire moyenne macroscopique $U_m(t)$ ne varie pas linéairement avec la tension $U(t)$.

25 Ces mesures sont en adéquation avec des résultats de modélisations analytiques théoriques donnant des évolutions dynamiques d'électropores à partir de valeurs de tension transmembranaire, notamment donnés par J. C. Neu et W. Krassowska (Phys. Rev. E. **59**, 3471 (1999)) et par K. A. DeBruin et W. Krassowska (Ann. Biomed. Eng. **26**, 584 (1998)).

REVENDICATIONS

1. Ensemble destiné à l'électroporation d'un ensemble cellulaire constitué d'au moins une cellule, comprenant des moyens de surveillance de l'alimentation
5 électrique des électrodes d'électroporation, caractérisé en ce que les moyens de surveillance comprennent un estimateur apte à estimer la part effective de l'alimentation électrique qui est délivrée à une ou plusieurs parties cellulaires déterminées de l'ensemble cellulaire, à partir de données reçues par l'estimateur comprenant des données représentatives de l'alimentation électrique et des données
10 relatives à des composantes évaluées de bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée.

2. Ensemble selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une mémoire stockant lesdites données relatives auxdites
15 composantes évaluées de bio-impédance, celles-ci étant indépendantes des données représentatives de l'alimentation électrique.

3. Ensemble selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des moyens pour évaluer les composantes de bio-impédance en
20 l'absence d'électroporation.

4. Ensemble selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que chaque partie cellulaire déterminée est choisie parmi le milieu intracellulaire, le milieu extracellulaire, les membranes cellulaires, les pores formés des membranes
25 cellulaires dudit ensemble cellulaire.

5. Ensemble selon la revendication précédente, caractérisé en ce que l'estimateur est agencé pour estimer, à partir de données comprenant lesdites données qu'il reçoit et de relations existant entre elles, au moins une des grandeurs
30 électriques suivantes : l'intensité moyenne du courant I_c délivré aux seules cellules de l'ensemble cellulaire, la tension moyenne U_{intra} et l'intensité moyenne du courant

I_{intra} appliqués au seul milieu intracellulaire, la tension moyenne U_m appliquée à la seule membrane cellulaire, l'intensité moyenne du courant électrique I_p délivré aux seuls pores formés de la membrane cellulaire.

5 6. Ensemble selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'estimateur est agencé pour estimer le champ électrique moyen appliqué à chaque membrane cellulaire de l'ensemble cellulaire, à partir de données comprenant lesdites données qu'il reçoit, des données relatives à l'épaisseur cellulaire moyenne l , des données relatives à l'épaisseur moyenne h de membrane cellulaire, des
10 données relatives à la distance e entre les électrodes d'électroporation, et de relation existant entre ces données.

7. Ensemble selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'estimateur est agencé pour estimer la densité moyenne du courant électrique
15 délivré à travers les pores formés, à partir de données comprenant lesdites données qu'il reçoit, des données relatives à la surface S des électrodes utilisées pour l'électroporation, et de relation existant entre ces données.

8. Ensemble selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il
20 comprend en outre :

- les électrodes utilisées pour l'électroporation,
- un générateur alimentant électriquement les électrodes et apte à générer une tension U impulsionnelle et/ou un courant I impulsionnel adaptés à l'électroporation,
- 25 — des moyens pour mesurer la tension U et/ou l'intensité du courant I fournissant à l'entrée de l'estimateur lesdites données représentatives de l'alimentation électrique ; et
- des moyens pour asservir les valeurs de U et/ou de I fournis par le générateur aux données délivrées en sortie de l'estimateur, de sorte à réaliser
30 ainsi un contrôle sur l'électroporation.

9. Ensemble selon l'une des revendications 3 à 8, caractérisé en ce que lesdits moyens pour évaluer les composantes de bio-impédance en l'absence d'électroporation comprennent :

- 5 — un générateur apte à générer une tension et/ou un courant inférieurs respectivement à la tension seuil et au courant seuil à partir desquels l'électroporation débute ;
- des moyens pour mesurer la bio-impédance de l'ensemble cellulaire soumis au champ électrique des électrodes alimentées par le générateur avec une tension et/ou un courant inférieurs respectivement à la tension seuil et au
10 courant seuil ; et
- des moyens pour estimer des composantes de bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée de l'ensemble cellulaire, à partir des données fournies en sortie des moyens pour mesurer la bio-impédance.

15 10. Ensemble selon les deux revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des moyens de commutation aptes à commuter l'alimentation électrique des électrodes d'un premier des deux générateurs au deuxième des deux générateurs, de sorte à pouvoir ainsi réaliser des mesures de bio-impédance entre deux impulsions électriques avec les mêmes électrodes.

20

11. Ensemble selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est destiné à l'administration de médicaments dans l'ensemble cellulaire.

25 12. Procédé de surveillance d'une électroporation cellulaire comprenant les étapes suivantes :

- (a) recevoir des données représentatives du champ électrique appliqué ou de l'alimentation électrique fournie aux électrodes lors de l'électroporation ;
- (b) recevoir des données relatives à des composantes évaluées de bio-impédance d'une ou plusieurs parties cellulaires déterminées
30 d'ensemble cellulaire ;

(c) calculer une estimation de la part effective de l'alimentation électrique qui est délivrée à chaque partie cellulaire déterminée, à partir des données reçues à l'étape (a) et à l'étape (b).

5 13.Procédé de surveillance selon la revendication précédente, caractérisé en ce que lesdites données relatives auxdites composantes évaluées de bio-impédance sont indépendantes des données représentatives du champ électrique, et sont mémorisées.

10 14.Procédé de surveillance selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une étape d'évaluation, préalablement à l'étape (a), des composantes de bio-impédance, en l'absence d'électroporation.

15 15.Procédé de surveillance selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'une étape d'évaluation de composantes de bio-impédance est effectuée avant toute électroporation.

20 16.Procédé de surveillance selon l'une des deux revendications précédentes, caractérisé en ce que les données reçues lors de l'étape (a) sont représentatives de l'application d'un champ électrique impulsionnel appliqué ou d'une alimentation électrique impulsionnelle fournie pour réaliser l'électroporation, et en ce qu'une étape d'évaluation de composantes de bio-impédance est effectuée entre deux impulsions électriques.

25 17.Procédé de surveillance selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que chaque partie cellulaire déterminée est choisie parmi le milieu intracellulaire, le milieu extracellulaire, les membranes cellulaires, les pores formés des membranes cellulaires dudit ensemble cellulaire.

30 18.Procédé de surveillance selon la revendication précédente, caractérisé en ce que l'étape (c) donne une estimation, à partir de données comprenant lesdites

données reçues en (a) et en (b) et de relations existant entre elles, d'au moins une des grandeurs électriques suivantes : l'intensité moyenne du courant I_c délivré au(x) seule(s) cellule(s) de l'ensemble cellulaire électroporé, la tension moyenne U_{intra} appliquée au seul milieu extracellulaire, la tension moyenne U_m appliquée à la seule membrane cellulaire, l'intensité moyenne du courant électrique I_p délivré aux seuls pores formés de la membrane cellulaire.

19.Procédé de surveillance selon l'une des deux revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (c) donne une estimation du champ électrique moyen appliqué à chaque membrane cellulaire de l'ensemble cellulaire, à partir de données comprenant lesdites données reçues en (a) et en (b), des données relatives à l'épaisseur cellulaire moyenne l , des données relatives à l'épaisseur moyenne h de membrane cellulaire, des données relatives à la distance e entre les électrodes utilisées pour l'électroporation, et de relation existant entre ces données.

20.Procédé de surveillance selon l'une des trois revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (c) donne une estimation de la densité moyenne du courant électrique délivré à travers les pores formés, à partir de données comprenant lesdites données reçues en (a) et en (b), des données relatives à la surface S des électrodes utilisées pour l'électroporation, et de relation existant entre ces données.

21.Procédé de surveillance selon l'une des revendications 12 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, après l'étape (c), une étape d'asservissement du champ électrique appliqué à l'estimation réalisée lors de l'étape (c).

22.Procédé de surveillance selon l'une des revendications 12 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, avant l'étape (a), une étape de mesure de caractéristiques du champ électrique appliqué pour l'électroporation, ou de caractéristiques représentatives de l'alimentation électrique des électrodes (corrélée avec le champ électrique), pour fournir lesdites données représentatives du champ

électrique appliqué ou de l'alimentation électrique fournie aux électrodes reçues à l'étape (a).

23. Procédé de surveillance selon l'une des revendications 14 à 22, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une mesure de la bio-impédance d'un ensemble cellulaire en l'absence d'électroporation ; ladite étape d'évaluation des composantes de bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée de l'ensemble cellulaire est alors réalisée à partir de cette mesure de bio-impédance.

24. Procédé d'électroporation d'un ensemble cellulaire constitué d'au moins une cellule, comprenant les étapes suivantes :

- (a) appliquer une ou plusieurs impulsions de champ électrique à l'ensemble cellulaire, apte à provoquer une électroporation dans l'ensemble cellulaire ;
- (b) mesurer des données représentatives du champ électrique appliqué ou de l'alimentation électrique fournie aux électrodes pour l'électroporation ;
- (c) mettre en œuvre le procédé de surveillance selon l'une des revendications 12 à 21.

20

25. Procédé d'électroporation selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, avant l'étape (a) et/ou lors de l'étape (a) entre deux impulsions électriques, les étapes suivantes :

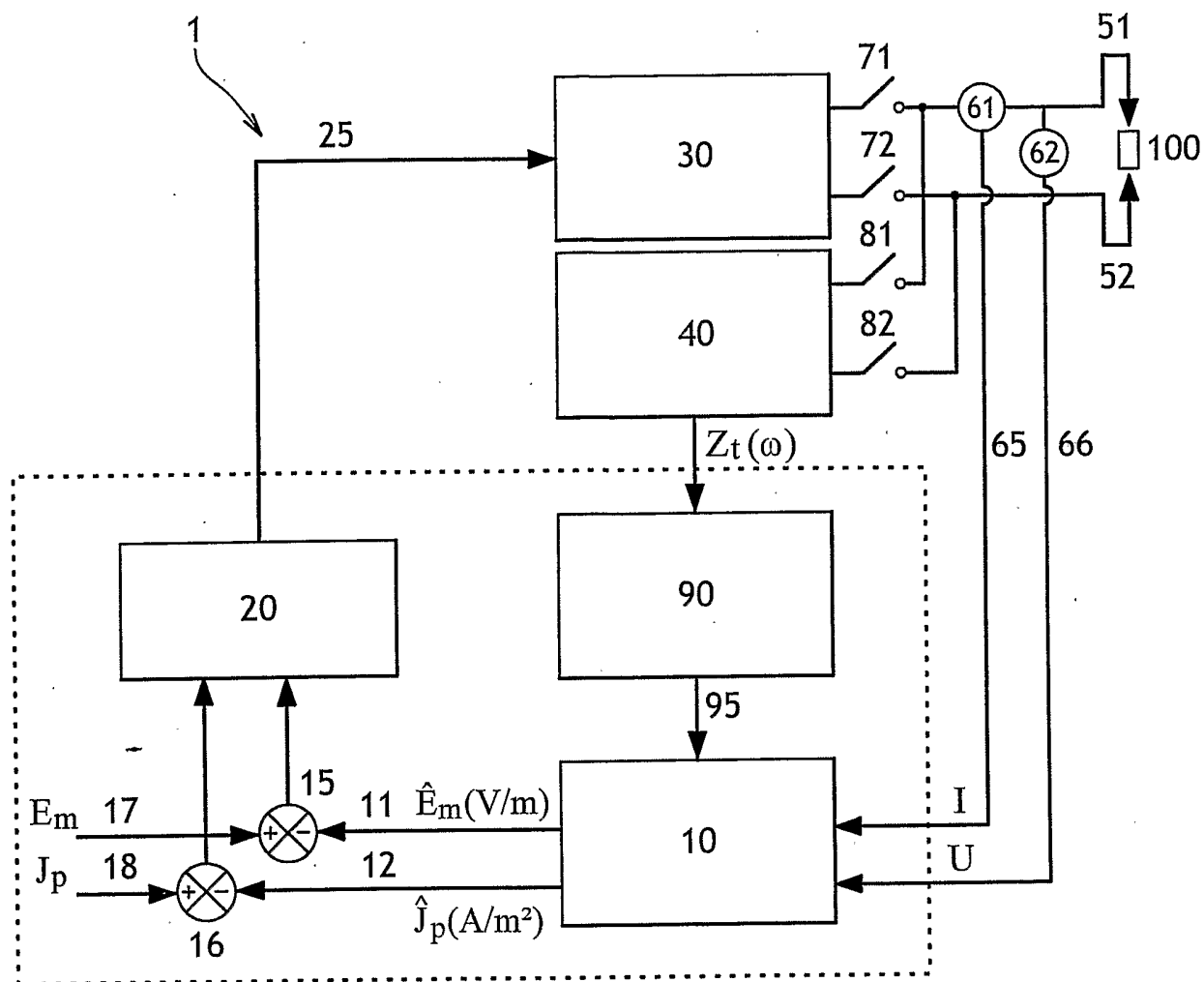
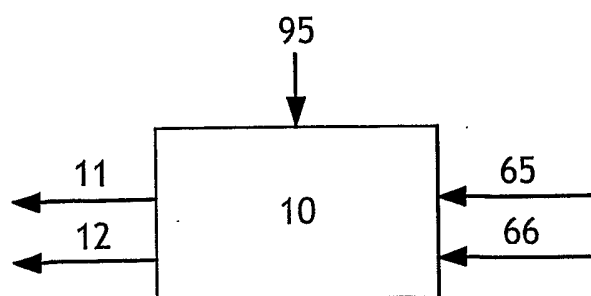
- appliquer un champ électrique à l'ensemble cellulaire, dont l'amplitude est inférieure à celle du champ électrique seuil au-delà duquel les pores membranaires se forment par électroporation ;
- mesurer la bio-impédance de l'ensemble cellulaire ;
- évaluer des composantes de bio-impédance d'une ou plusieurs parties cellulaires déterminées de l'ensemble cellulaire, à partir des résultats de mesure de l'étape (b), de sorte à fournir lesdites données relatives aux

30

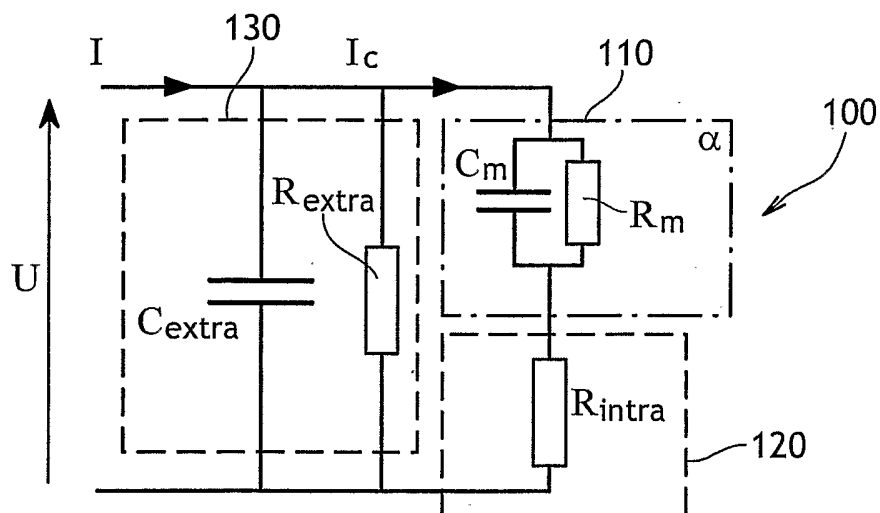
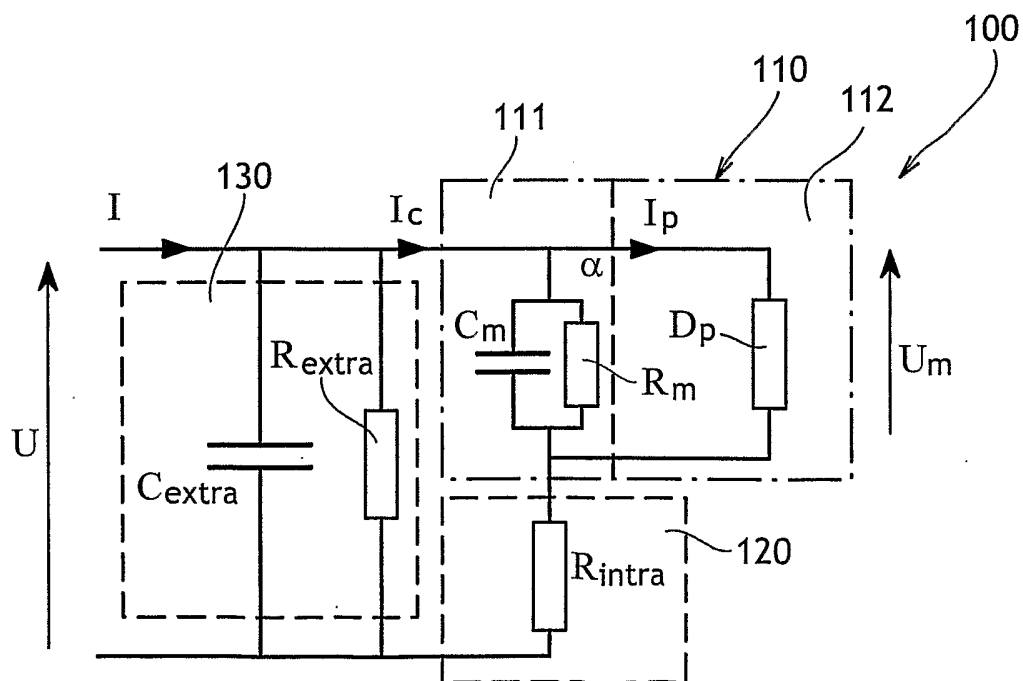
composantes évaluées de la bio-impédance de chaque partie cellulaire déterminée de l'ensemble cellulaire.

26. Utilisation du procédé d'électroporation selon l'une des deux revendications
5 précédentes pour l'administration de médicaments.

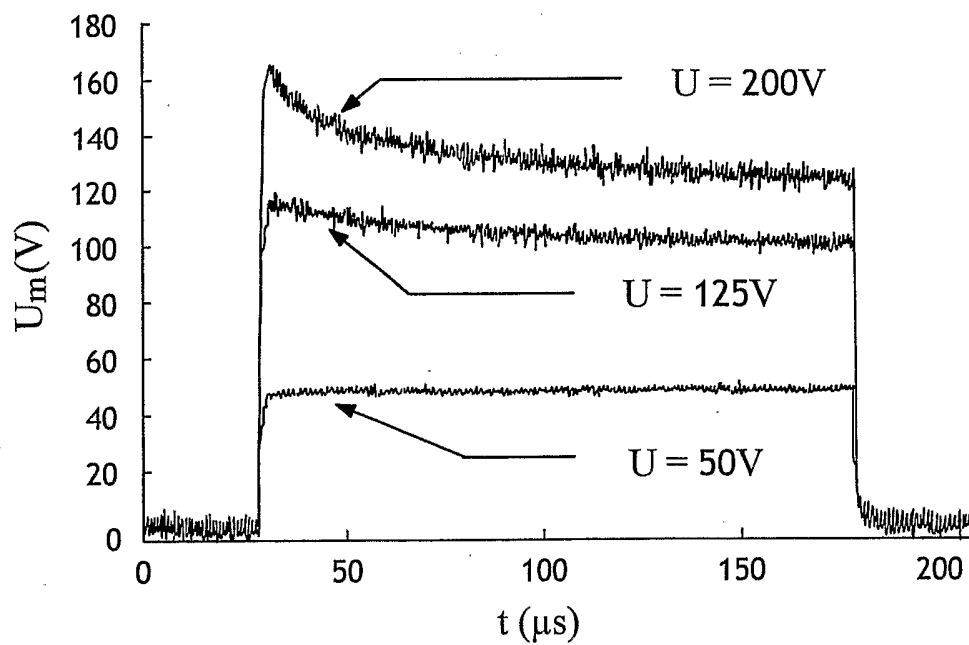
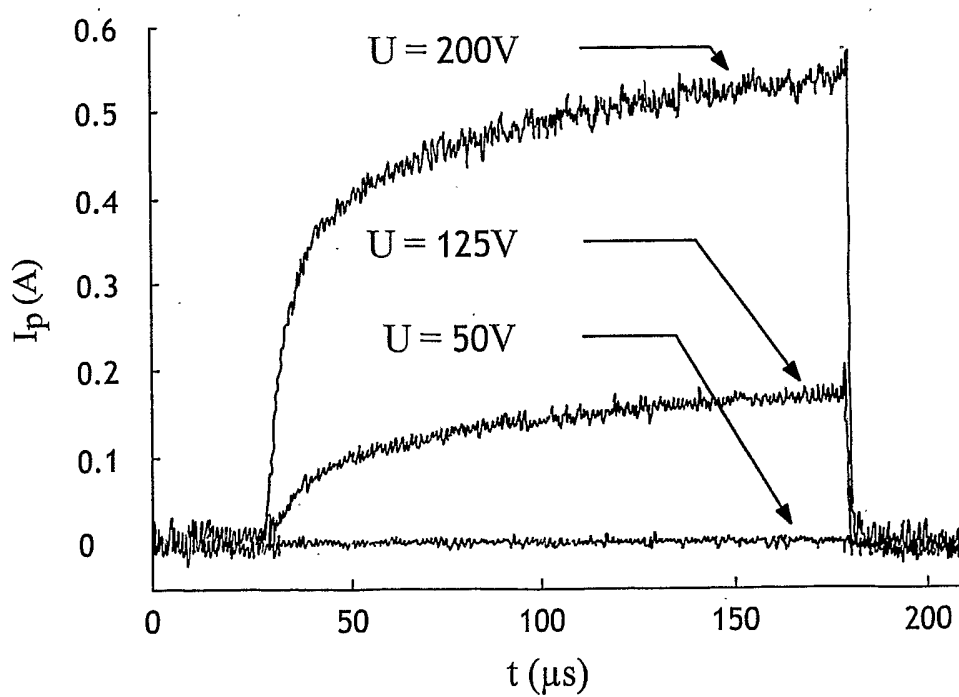
1 / 3

FIG.1FIG.2

2/3

FIG.3FIG.4

3 / 3

FIG.5FIG.6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/001914

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/52589 A (ADITUS MEDICAL AB; PERSSON, BERTIL; BOEHMER, BERNT; THORVINGER, BO) 21 October 1999 (1999-10-21) cited in the application claims 1,13	1,12
A	WO 01/81533 A (IGEA S.R.L; MIKLAVCIC, DAMIJAN; MIR, LLUIS) 1 November 2001 (2001-11-01) cited in the application claims 1,7	1,12
A	US 2001/046706 A1 (RUBINSKY BORIS ET AL) 29 November 2001 (2001-11-29) claims 1,28	1,12
	----- -/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 January 2006

Date of mailing of the international search report

23/01/2006

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Clement, J-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001914

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/81532 A (IGEA S.R.L; MIKLAVCIC, DAMIJAN; MIR, LLUIS; NEUMANN, EBERHARD; PERSSON) 1 November 2001 (2001-11-01) claims 1,13 -----	1,12
A	DE 102 02 094 A1 (EPPENDORF AG) 14 August 2003 (2003-08-14) claims 1,9 -----	1,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/001914

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9952589	A	21-10-1999	AT 309839 T	15-12-2005
			AU 741329 B2	29-11-2001
			AU 3633899 A	01-11-1999
			CA 2325476 A1	21-10-1999
			DE 69928383 D1	22-12-2005
			EP 1067985 A1	17-01-2001
			JP 2002511320 T	16-04-2002
			SE 513814 C2	06-11-2000
			SE 9801139 A	01-10-1999
WO 0181533	A	01-11-2001	AU 5872901 A	07-11-2001
			IT T020000389 A1	22-10-2001
US 2001046706	A1	29-11-2001	AU 6231400 A	13-02-2001
			AU 6364200 A	13-02-2001
			AU 6365000 A	13-02-2001
			US 6300108 B1	09-10-2001
			US 6403348 B1	11-06-2002
			US 6482619 B1	19-11-2002
			US 6387671 B1	14-05-2002
			US 2001051366 A1	13-12-2001
WO 0181532	A	01-11-2001	AT 281513 T	15-11-2004
			AU 5872801 A	07-11-2001
			DE 60106901 D1	09-12-2004
			DE 60106901 T2	10-11-2005
			EP 1274830 A1	15-01-2003
			ES 2232621 T3	01-06-2005
			IT T020000390 A1	22-10-2001
			US 2004039327 A1	26-02-2004
DE 10202094	A1	14-08-2003	US 2003148524 A1	07-08-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/001914

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

C12M3/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C12M C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 99/52589 A (ADITUS MEDICAL AB; PERSSON, BERTIL; BOEHMER, BERNT; THORVINGER, BO) 21 octobre 1999 (1999-10-21) cité dans la demande revendications 1,13	1,12
A	WO 01/81533 A (IGEA S.R.L; MIKLAVCIC, DAMIJAN; MIR, LLUIS) 1 novembre 2001 (2001-11-01) cité dans la demande revendications 1,7	1,12
A	US 2001/046706 A1 (RUBINSKY BORIS ET AL) 29 novembre 2001 (2001-11-29) revendications 1,28	1,12
	----- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 janvier 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/01/2006

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Clement, J-P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/001914

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01/81532 A (IGEA S.R.L; MIKLAVCIC, DAMIJAN; MIR, LLUIS; NEUMANN, EBERHARD; PERSSON) 1 novembre 2001 (2001-11-01) revendications 1,13 -----	1,12
A	DE 102 02 094 A1 (EPPENDORF AG) 14 août 2003 (2003-08-14) revendications 1,9 -----	1,12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/001914

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9952589	A	21-10-1999	AT 309839 T	15-12-2005
			AU 741329 B2	29-11-2001
			AU 3633899 A	01-11-1999
			CA 2325476 A1	21-10-1999
			DE 69928383 D1	22-12-2005
			EP 1067985 A1	17-01-2001
			JP 2002511320 T	16-04-2002
			SE 513814 C2	06-11-2000
			SE 9801139 A	01-10-1999
WO 0181533	A	01-11-2001	AU 5872901 A	07-11-2001
			IT T020000389 A1	22-10-2001
US 2001046706	A1	29-11-2001	AU 6231400 A	13-02-2001
			AU 6364200 A	13-02-2001
			AU 6365000 A	13-02-2001
			US 6300108 B1	09-10-2001
			US 6403348 B1	11-06-2002
			US 6482619 B1	19-11-2002
			US 6387671 B1	14-05-2002
			US 2001051366 A1	13-12-2001
WO 0181532	A	01-11-2001	AT 281513 T	15-11-2004
			AU 5872801 A	07-11-2001
			DE 60106901 D1	09-12-2004
			DE 60106901 T2	10-11-2005
			EP 1274830 A1	15-01-2003
			ES 2232621 T3	01-06-2005
			IT T020000390 A1	22-10-2001
			US 2004039327 A1	26-02-2004
DE 10202094	A1	14-08-2003	US 2003148524 A1	07-08-2003