



**HAL**  
open science

# Contrôle et analyse électrochimique de la réactivité biologique à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif microfluidique

Cécile Crozatier

► **To cite this version:**

Cécile Crozatier. Contrôle et analyse électrochimique de la réactivité biologique à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif microfluidique. Autre. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2007. Français. NNT: . tel-00178656

**HAL Id: tel-00178656**

**<https://theses.hal.science/tel-00178656>**

Submitted on 11 Oct 2007

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

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

Thèse de doctorat présentée pour obtenir le titre de

Docteur de l'université Paris VII

Spécialité : Electrochimie

Présentée par :  
Cécile CROZATIER

# **Contrôle et analyse électrochimique de la réactivité biologique à l'échelle de la cellule unique dans un dispositif microfluidique**

Soutenue le 21 septembre 2007 devant un jury composé de :

Christian AMATORE .....	Directeur de thèse
Yong CHEN .....	Co-Encadrant
Claire DANE .....	Examinateur
Michel DELAMAR .....	Président
Jean-Pierre HENRY .....	Rapporteur
Bruno LE PIOUFLE .....	Rapporteur
Luc SENSEBE .....	Examinateur



# Un parcours à plusieurs facettes

J'ai eu l'honneur de soumettre cette thèse au jugement d'une assemblée remarquable. Je remercie Michel Delamar d'avoir présidé ce Jury. Jean-Pierre Henry et Bruno Le Pioufle furent des rapporteurs méticuleux et je les remercie pour leurs nombreux conseils et remarques. Christian Amatore, Yong Chen et Luc Sensebé ont apporté une expertise dans les différents domaines qui ont été abordés dans ce travail (l'électrochimie, la microfluidique et la biologie). Je remercie également Claire Dane qui a représenté la DGA lors du jugement de mon travail.

Ce doctorat a constitué pour moi une aventure riche en découvertes et en rebondissements. Je souhaite remercier en tout premier lieu mes directeurs de thèse qui m'ont dirigé tout au long de mon parcours et qui m'ont donné un cadre de travail exceptionnel sur plusieurs aspects. J'aimerais témoigner par la même occasion toute ma gratitude envers Michel Bornens qui, à la suite du stage de trois mois que j'ai effectué dans son unité, a su m'aiguiller vers des études (DEA Interface Physique-Biologie) et un cadre scientifique (prise de contact avec Yong Chen) adaptés à mes aspirations.

Ce parcours a été jalonné de rencontres et de collaborations. J'en remercie tous les acteurs :

- Zhang Zhiling, Guo Shishang, Huang Weihua et Han Dong pour leurs soutien et conseils lors de la construction du laboratoire : la première année fut l'époque de l'établissement des fondations du laboratoire et la période des gros bras. *Your presence was indeed most helpful as well as reassuring.*
- Yann Verchier, Frédéric Lemaître, Issa Tapsoba et Stéphane Arbault pour les étroites et fructueuses collaborations sur la détection de l'exocytose sur électrodes en ITO et sur la détection du stress oxydant en configuration trois électrodes. Votre expertise et vos conseils m'ont permis de trouver mon chemin parmi les nombreuses embuscades électrochimiques. Je remercie également Manon Guille pour les nombreuses discussions et encouragements.
- Angélique Rico, Alain Langonné et Luc Sensebé pour le travail de longue haleine sur les CSM : la mise en place de telles expériences fut comparable à un marathon où il fallait aller jusqu'au bout.
- Sophie Dufour, Matthieu Piel, Jean-Paul Thiery et Michel Bornens de l'Institut Curie pour les discussions sur le mariage heureux des microsystèmes et de certains aspects de la biologie cellulaire : ces instants furent de réelles bouffées d'oxygène.
- Les professeurs Pang Daiwen, Ji Hang, Ouyang Qi et Han Dong, ainsi que Xu Luping, pour leur accueil dans leur laboratoire respectif à Wuhan et à Pékin. Mon séjour fut riche en enseignements et en souvenirs. *Thank you so much for your warm welcome and for the interesting projects that we initiated together. My stay in China was most meaningful thanks to each of you.*
- L'équipe technique du Laboratoire de Photonique et de Nanostructures pour votre aide et

vos conseils dans la superbe salle blanche et Guilhem Velve Casquillas pour le développement des réseaux de microélectrodes. Les échanges de boîtes d'échantillons furent de véritables parties de tennis de table de haut niveau.

- Shi Jian (Olivier), Maël Le Berre et Damien Baigl pour le chemin parcouru ensemble. Ces remerciements ne peuvent faire honneur à l'importance que vous avez pour moi... Mais surtout « *Aspiration, yet again!!* ».
- Wang Li, Fan Yun et Ni Xiaofang pour leur aide précieuse dans l'établissement des très nombreux essais de culture cellulaire en microsystème. *Your 'little hands' were of great help and guiding them was most instructive.*
- Marine Beurdeley, Isabelle Brunet et Alain Prochiantz pour des essais originaux sur le guidage neuronal.
- Anne Haloppé pour sa gentillesse, son organisation et sa disponibilité : notre laboratoire n'existerait pas sans vous.
- Constance Valigny et Matthieu Berthion pour leur travail assidu de correction systématique tout au long de la production de ce manuscrit. *Prosit.*

Qui connaît autrui est intelligent,  
Qui se connaît est éclairé,  
Qui vainc autrui est fort,  
Qui se vainc soi-même a la force de l'âme.

Qui se contente est riche.  
Qui s'efforce d'agir a de la volonté.

Qui reste à sa place vit longtemps.  
Qui est mort sans être disparu atteint l'immortalité.

Lao Zi, Dao de jing *Chapitre XXXIII*



# Table des matières

Introduction générale	11
<b>I Systèmes microfluidiques pour la gestion d'un milieu confiné</b>	<b>23</b>
<b>1 La lithographie molle, un outil de développement puissant</b>	<b>25</b>
1.1 Particularités de la lithographie molle en microfluidique . . . . .	27
1.2 Développement de dispositifs intégrés . . . . .	32
1.3 Conclusion . . . . .	38
<b>2 Développement d'une technique d'assemblage réversible</b>	<b>39</b>
2.1 La micro-aspiration : principe et intérêts . . . . .	41
2.2 Description physique du phénomène . . . . .	42
2.3 Règles de conception et d'utilisation . . . . .	49
2.4 Exemple d'un dispositif assemblé par micro-aspiration . . . . .	52
2.5 Conclusion . . . . .	54
<b>3 Positionnement et gestion de flux dans un dispositif microfluidique</b>	<b>55</b>
3.1 Un dispositif pour piéger des cellules . . . . .	57
3.2 Gestion du milieu fluide des pièges . . . . .	62
3.3 Conclusion . . . . .	66
<b>II Culture cellulaire en microsystèmes</b>	<b>67</b>
<b>4 Manipulation et culture de cellules</b>	<b>71</b>
4.1 Biologie cellulaire dans les microsystèmes : généralités . . . . .	73
4.2 Modification des surfaces de culture . . . . .	77
4.3 Manipulation de cellules vivantes en milieu confiné . . . . .	85
4.4 Conclusion . . . . .	88
<b>5 Contrôle dynamique du micro-environnement cellulaire</b>	<b>91</b>
5.1 Induction chimique de cellules en culture . . . . .	93
5.2 Positionnement cellulaire dans un micro-système . . . . .	102
5.3 Conclusion . . . . .	105

<b>III</b>	<b>Détection électrochimique dans un micro-environnement contrôlé</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>Détection d'événements d'exocytose dans un micropuits</b>	<b>111</b>
6.1	Mesures électrochimiques . . . . .	113
6.2	Techniques de détection de l'exocytose . . . . .	117
6.3	Mesure d'événements d'exocytose par des électrodes planes et transparentes . . .	120
6.4	Conclusion . . . . .	124
<b>7</b>	<b>Mesures électrochimiques dans une chambre microfluidique</b>	<b>127</b>
7.1	Analyse du stress oxydant sur une population de cellules . . . . .	129
7.2	L'intégration d'un réseau de microélectrodes . . . . .	134
7.3	Développement d'un système intégré . . . . .	143
7.4	Conclusion . . . . .	150
<b>8</b>	<b>Vers une analyse électrochimique en parallèle</b>	<b>153</b>
8.1	Exploitation du réseau de microélectrodes . . . . .	155
8.2	Contrôle de paramètres supplémentaires . . . . .	156
8.3	Conclusion . . . . .	158
	<b>Conclusion générale</b>	<b>161</b>
<b>IV</b>	<b>Annexes</b>	<b>165</b>
<b>A</b>	<b>Lithographie molle : techniques et protocoles</b>	<b>167</b>
A.1	Fabrication de microcanaux . . . . .	168
A.2	Lithographie molle « multi-couche » . . . . .	171
<b>B</b>	<b>Exploitation du concept de la micro-aspiration</b>	<b>173</b>
B.1	Chimie de surface à haute résolution . . . . .	174
B.2	Gestion de volumes . . . . .	175
B.3	Simulations supplémentaires pour l'assemblage par micro-aspiration . . . . .	179
<b>C</b>	<b>Protocoles pour la Biologie Cellulaire en microsystèmes</b>	<b>181</b>
C.1	Solutions tampons . . . . .	182
C.2	Culture cellulaire . . . . .	182
C.3	Différenciation cellulaire . . . . .	183
C.4	Protocoles de modification des surfaces . . . . .	184
C.5	Analyse d'image . . . . .	186
<b>D</b>	<b>Fabrication des microélectrodes</b>	<b>189</b>
D.1	Préparation des substrats et photolithographie . . . . .	190
D.2	Dépôt de métaux et d'isolants ; gravure . . . . .	190
D.3	Réalisation des contacts . . . . .	191
D.4	Dépôt de noir de platine . . . . .	191

# Introduction générale



# Introduction générale

La cellule est l'unité structurale, fonctionnelle et reproductrice constituant la totalité ou une partie d'un organisme vivant. Dans le cas d'organismes multicellulaires, chaque cellule est une entité vivante qui fonctionne de manière autonome, mais coordonnée avec les autres, grâce à un système de communication intercellulaire complexe.

La cellule est un échelon dans l'échelle du monde vivant. A l'instar des organismes vivants, s'organisant en population et en espèces, les cellules se spécialisent pour mieux accomplir des fonctions particulières, et s'organisent en tissus ou en organes pour assurer le fonctionnement de l'organisme qu'elles constituent. Cependant, la cellule n'est pas le niveau d'organisation le plus élémentaire. Considérons les différents niveaux d'organisation nécessaires à la constitution de la cellule, en partant de l'atome comme niveau élémentaire. Les atomes permettent la constitution dans un premier temps, par liaisons chimiques, des molécules simples, utilisées par le vivant comme molécules porteuses d'énergie ou d'information dans la communication inter ou intracellulaire ou comme éléments constitutifs des niveaux suivants, comme le glucose, les acides aminés, les nucléotides ou les acides gras. A leur tour, ces molécules simples, assemblées par des liaisons chimiques, forment des molécules complexes, plus volumineuses et de fonctionnalités plus spécifiques. Citons parmi les molécules complexes du vivant : l'ADN simple-brin et l'ARN, constitués d'acides nucléiques, porteurs et messagers de l'information génétique ; les protéines, constituées d'acides aminés, participant à la structuration de la cellule et à son fonctionnement grâce aux protéines de structure et aux enzymes ; les polysaccharides formés de glucides et les lipides constitués d'acides gras, véritables réserves d'énergie et de constituants élémentaires. Le niveau suivant correspond à des assemblages résultant d'interactions entre molécules complexes au travers de liaisons physico-chimiques faibles et réversibles. Elles forment alors des structures malléables constituant la charpente et les parois, ainsi que des structures spécialisées permettant de maintenir rapprochées plusieurs molécules complexes pour les faire participer à des réactions chimiques en chaîne (cascade enzymatique). Les membranes cellulaires, la double hélice de l'ADN, les chromosomes, le cytosquelette et les ensembles fonctionnels de protéines sont des assemblages. Enfin, le dernier niveau d'organisation précédant la cellule comprend les organites, structures spécialisées contenues dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et délimitées par une membrane, comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries ou le noyau. Chaque organite est structuré de façon à tenir dans un même compartiment ou dans des compartiments juxtaposés plusieurs assemblages agissant dans une même voie métabolique. Le fonctionnement cellulaire est constitué d'interactions complexes entre ces différents niveaux d'organisation, mettant en jeu des mécanismes à différentes échelles [1].

Une telle complexité pour un seul objet justifie la grande variabilité des réactivités observées pour un même type cellulaire devant un même type de stimulus. Malgré l'identité de l'organisation interne et des mécanismes régissant leur fonctionnement, nous ne pouvons pas affirmer

que deux cellules d'un même type cellulaire sont identiques : elles n'ont pas exactement le même passé ; leur matériel génétique diffère au moins par des modifications épigénétiques ou par des détériorations uniques à chaque cellule ; et, à moins d'être forcé par certaines drogues, leur cycle cellulaire n'est pas synchrone. Même en choisissant deux cellules provenant d'une même cellule-mère, après une division cellulaire symétrique, de légères différences existent par la nature asymétrique de la duplication du matériel cellulaire [2]. En effet, certains éléments constitutifs de la cellule sont répliqués, c'est-à-dire qu'il s'effectue une copie à partir d'une matrice initiale, et une certaine dissymétrie, dans l'âge et la nature des molécules entre l'ancienne et la nouvelle copie, est conservée lors de la ségrégation et après la division cellulaire. C'est le cas par exemple de l'ADN, et, plus particulièrement dans les cellules animales, du centrosome qui, lors de leur duplication, gardent une distinction claire entre l'ancienne et la nouvelle copie [3]. Le centrosome est le centre cellulaire organisateur des microtubules et joue un rôle clé dans la nature, symétrique ou asymétrique, de la division cellulaire puisqu'il orchestre le mouvement interne de la cellule durant tout le cycle cellulaire. De plus, la variabilité phénotypique observée au sein d'une population d'individus possédant exactement le même patrimoine génétique, comme dans une colonie de bactérie, peut être expliquée par le bruit inhérent à l'expression génétique [4]. Une telle hétérogénéité est essentielle au fonctionnement du vivant. Nous pouvons illustrer cette caractéristique par les travaux de Balaban *et al.* qui ont montré le phénomène de persistance chez la bactérie qui résulte d'un changement, *switch*, aléatoire de phénotypes [5].

Cette variabilité à l'échelle de la cellule, associée à la complexité de la cellule même, est à l'origine des difficultés de l'étude et de la compréhension des processus biologiques. Ces études s'effectuent aujourd'hui à travers des analyses de grandes populations pour à la fois s'affranchir des individualités inhérentes à la cellule et obtenir des données statistiques. Cependant, de telles analyses peuvent masquer, par un nivellement des réactivités cellulaires, des effets subtils essentiels à la compréhension des mécanismes régissant les phénomènes étudiés. De plus en plus, l'étude des processus biologiques fait appel à des analyses à des échelles variées pour compléter l'état des connaissances et élucider certains points obscurs ou certaines incertitudes. Pour cela, il a été nécessaire de développer des outils analytiques nouveaux. Les travaux présentés dans cette thèse se positionnent dans ce cadre en proposant un outil analytique novateur, couplant le contrôle dynamique des micro-environnements de la cellule par la microfluidique et l'analyse instantanée et locale des espèces en solution par l'électrochimie.

## Cellules et microsystèmes

La microfluidique est une discipline en plein essor, permettant le transport et la manipulation de fluides de faible volume (de l'ordre du picolitre au nanolitre) dans des canaux de dimension micrométriques [6]. Les premières applications des dispositifs microfluidiques étaient dans l'analyse chimique, révélant des avantages clés : la capacité i) d'utiliser de très faibles quantités de produits et d'échantillons, ii) de réaliser des séparations et des détections des produits à analyser avec une grande résolution, et iii) d'allier des aspects pratiques avantageux tels des temps d'analyse courts, de faibles coûts et de faibles encombrements de l'équipement dans son ensemble [7]. La microfluidique exploite des caractéristiques intrinsèques comme la miniaturisation des éléments et les écoulements laminaires des flux pour offrir des capacités novatrices de contrôle dans l'espace et dans le temps de la concentration des molécules.

Les dimensions caractéristiques de ces microsystèmes sont comparables à celles des cellules.

Ainsi, ils ouvrent de nombreuses possibilités de contrôle, dans l'espace et dans le temps, de la croissance cellulaire et de stimuli, en combinant l'utilisation de substrats de chimie de surface et de géométries complexes, mimant la matrice extracellulaire, avec l'utilisation des canaux microfluidiques régulant le transport des fluides et des facteurs solubles [8]. De plus, les systèmes d'analyse miniaturisés sont particulièrement adaptés pour les analyses sur des cellules en faible nombre ou sur les cellules isolées : le nombre de molécule et les volumes mis en cause sont particulièrement faibles et la diminution du volume d'analyse permet une augmentation de la concentration locale et par conséquent une augmentation de la sensibilité. La possibilité de coupler de telles manipulations cellulaires avec des outils d'analyse miniaturisés sur un même dispositif nous permet d'envisager des plate-formes multifonctionnelles proposant des configurations d'analyses complémentaires à celles utilisées dans les systèmes d'analyse traditionnels [9]. Citons à titre d'illustration quelques travaux représentatifs de l'application des caractéristiques uniques des microsystèmes à des systèmes d'analyse biologique originaux.

Tirant pleinement parti des avantages des techniques de microfabrication, Théry *et al.* ont proposé un modèle mécanique de positionnement du fuseau mitotique, apparaissant lors de la division cellulaire, en utilisant un substrat contenant des surfaces d'adhésion variées et en mesurant l'orientation du fuseau mitotique sur des milliers de cellules cancéreuses HeLa uniques [10]. Le substrat consiste en une surface non-adhésive vis-à-vis des cellules, mais présentant à des emplacements prédéfinis des motifs de protéines promotrices de l'adhésion cellulaire. Sur un tel substrat, les cellules ne peuvent adhérer que sur les emplacements précis correspondant aux motifs. De plus, les motifs, de taille comparable à une cellule unique, ont des formes variées permettant de contrôler l'emplacement des points d'ancrage de la cellule seulement sur les surfaces contenant les protéines d'adhésion (figure 1 A). Cette étude montre que la distribution de ces points d'ancrage sur le substrat permet de prédire l'orientation ainsi que l'emplacement du fuseau mitotique.

Grâce à un contrôle microfluidique des volumes, Takayama *et al.* ont effectué un marquage fluorescent localisé des mitochondries d'une cellule endothéliale capillaire bovine [11]. Le contrôle microfluidique des concentrations spatiale de deux marqueurs fluorescents différents (rouge et vert, voir figure 1 B) a permis l'exposition des mitochondries de chaque moitié d'une cellule à un type de marqueur fluorescent différent. L'analyse de l'évolution spatiale des mitochondries ainsi marquées a permis l'étude des cinétiques de migration et de confirmer certains aspect du mécanisme régissant leur mobilité.

Enfin, citons les travaux de Lee *et al.* présentant un réseau de microchambres de culture cellulaire alimenté en milieu de culture par diffusion [12]. Le barrage en forme de « C » illustré dans la figure 2 A a une hauteur légèrement inférieure à celle des microcanaux principaux, créant ainsi un interstice de  $2 \mu\text{m}$  sur toute la surface du « C ». Du fait de l'augmentation de la résistivité fluide de la zone centrale par la présence de cet interstice, le passage du fluide dans la zone centrale s'effectue à une vitesse fortement réduite par rapport à celle des canaux périphériques. Une telle structure permet d'une part de contrôler pour la première fois sur des cellules en culture des paramètres fluidiques tels la contrainte de cisaillement ou le nombre de Péclet, et permet d'autre part la culture de plusieurs types cellulaires, séparément, dans un microsystème grâce à une alimentation en milieu de culture par diffusion, perturbant au minimum le volume des chambres de culture. La perfusion en parallèle d'un réseau de chambres de culture d'un milieu additionné d'une concentration croissante de sérum a également été réalisée dans un tel dispositif (figure 2 B), montrant le potentiel d'un tel réseau de chambres de culture miniaturisées pour des expériences de criblage de facteurs solubles et l'étude de leurs effets sur un tapis cellulaire.

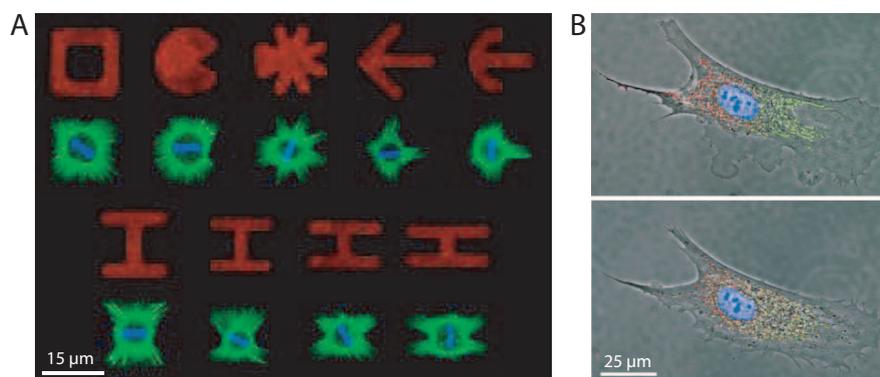


FIG. 1 – A. Montage photographique représentant les formes des motifs d’adhésion (rouge) sur un substrat en verre et les cellules, de la lignée HeLa, adhérentes sur ces motifs en cours de division cellulaire. L’organisation, imposées par les motifs d’adhésion, des fibres de stress que constituent les microtubules axiaux (vert) permet de prédire l’emplacement et l’orientation du fuseau mitotique (bleu). Figure adaptée de [10]. B. Evolution spatiale des mitochondries d’une cellule endothéliale capillaire bovine dont le marquage fluorescent localisé a été effectué dans un canal microfluidique. Le marquage consiste en l’écoulement au-dessus de la cellule d’un flux parallèle de deux marqueurs fluorescents dont la présence est confinée spatialement (rouge sur la moitié gauche, vert sur la moitié droite). Figure adaptée de [11].

A travers ces trois exemples, nous avons aperçu le potentiel des microsystèmes pour le contrôle d’un micro-environnement de dimensions comparables à la cellule aussi bien au niveau des surfaces que des volumes, menant à des études originales et pertinentes de processus biologiques. Cependant, la manipulation de cellules dans des microsystème continue à poser des problèmes pratiques de recherche de conditions idéales pour la survie et la prolifération des types cellulaires à analyser et de contrôle du stress infligé aux cellules, inhérents au confinement des chambres de mesure. A chaque type cellulaire et à chaque problématique d’analyse, il sera nécessaire de concevoir un dispositif microfluidique qui devra convenir à des contraintes de viabilité et de stress *a priori* inconnues.

De plus, les techniques pour analyser les expériences de biologie cellulaire dans les dispositifs microfluidiques restent très majoritairement des techniques d’analyses optiques *in situ*, profitant de la transparence des matériaux utilisés. Ceci peut poser également des problèmes pratiques d’adaptation des protocoles de fixation et de marquage dans les microsystèmes du fait du confinement des réactions chimiques et enzymatiques.

## Etudes électrochimiques de réactivités cellulaires

Nous avons vu que les techniques d’analyse des cellules dans les dispositifs microfluidiques étaient majoritairement optiques. Or, il existe un autre type d’analyse de réactivités cellulaires intégrables relativement facilement dans les microsystèmes : l’analyse électrochimique. En effet, les microélectrodes en bande peuvent être fabriquées avec les mêmes technologies que les dispositifs microfluidiques et leur intégration dans les microsystèmes se résume à les fabriquer sur le substrat utilisé pour l’assemblage des dispositifs microfluidiques.

Nous nous sommes intéressés à un couplage entre la microfluidique et l’électrochimie afin

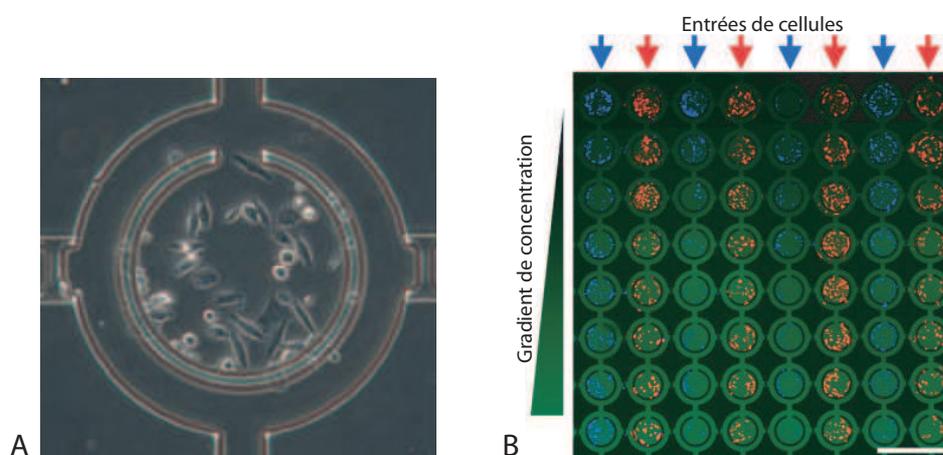


FIG. 2 – Microchambres de culture cellulaire de 3 nL à perfusion indirecte, adapté de [12]. A. Microphotographie d’une culture de cellules de la lignée HeLa. L’anneau de  $450\ \mu\text{m}$  de diamètre en forme de « C » permet dans un premier temps un piégeage de cellules, puis dans un deuxième temps, du milieu de culture est perfusé dans la chambre de culture indirectement à travers les interstices de l’anneau. B. Montage d’images par fluorescence d’un réseau de 64 chambres de culture inoculées avec 2 types de cellules différentes. Chaque rangée du réseau est perfusée par un milieu contenant une proportion croissante de fluorophore. La barre d’échelle est de 1 mm.

de tirer pleinement parti des avantages inhérents aux deux disciplines, qui sont d’une part le contrôle aisé et automatisable de l’environnement confiné de mesure et d’autre part la possibilité de mesure en temps réel de certains processus biologiques. Un tel couplage est particulièrement adapté à l’analyse de phénomènes de libération d’espèces chimiques par des cellules dans un milieu confiné. En effet, les microélectrodes répondant à la présence d’espèces électroactives de manière proportionnelle à leur concentration, le confinement et le contrôle de l’environnement de mesure apporté par la microfluidique permettent d’augmenter les performances de l’analyse électrochimique.

Ainsi, nous nous sommes intéressés à l’analyse électrochimique dans des microsystèmes de deux phénomènes biologiques différents donnant lieu à la libération dans le milieu extracellulaire d’espèces chimiques : l’exocytose vésiculaire et le stress oxydant.

## Exocytose vésiculaire

### *Phénomène biologique de l’exocytose*

La communication cellulaire correspond à l’ensemble des mécanismes qui permettent à une cellule, un tissu et un organisme de recevoir, interpréter et répondre aux signaux émis par d’autres cellules ou par son environnement. Ces signaux peuvent être de nature physique, comme la température, les rayonnements, ou chimique, comme une variation du pH, la présence de molécules inorganiques ou biologiques. Une grande majorité de la communication pour une cellule est basée sur des signaux chimiques. L’émission des messages, leur réception, leur traduction et les réponses appropriées à ceux-ci s’effectuent par le biais de molécules, ou protéines, informatives.

La membrane plasmique est une barrière de perméabilité très sélective séparant le milieu

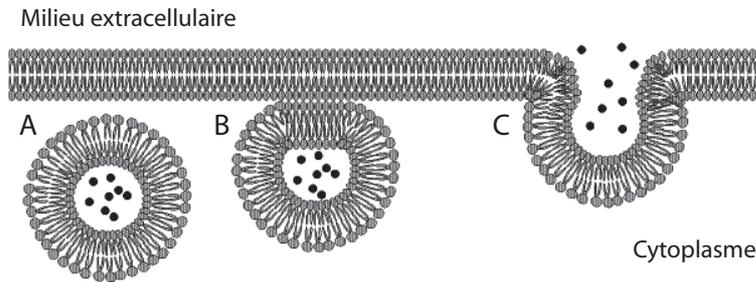


FIG. 3 – Exocytose vésiculaire. A. Phase d’approche d’une vésicule vers la membrane cellulaire. B. Ancrage de la vésicule sur la membrane cellulaire. C. Fusion des membranes et expulsion du contenu vésiculaire.

intracellulaire et extracellulaire. Le passage de l’information à travers cette membrane peut se faire de différentes manières. Les molécules d’information peuvent tout simplement diffuser à travers la bicouche lipidique constituant la membrane. La présence de protéines ou canaux transmembranaires permet un deuxième mode de transmission de l’information, soit en permettant la traversée des molécules à travers un pore ouvert de manière transitoire, comme c’est le cas pour les canaux ioniques, soit par transduction du signal, en transformant le signal extracellulaire en un signal intracellulaire, ou inversement, grâce à un changement de conformation de la protéine. Un dernier mode de transmission de l’information se fait par les vésicules, petits compartiments cellulaires qui peuvent stocker, transporter ou encore digérer un ensemble de molécules d’information. La paroi de ces vésicules est constituée d’une bicouche lipidique de la même manière que la membrane plasmique ainsi que les membranes qui délimitent les différents compartiments intracellulaires. Ceci permet aux vésicules de se former par bourgeonnement à partir d’une membrane et de disparaître en fusionnant avec une autre membrane.

L’exocytose est un des mécanismes clés de libération de messagers chimiques par la cellule. Elle a lieu lorsque des vésicules de sécrétion fusionnent avec la membrane plasmique, expulsant ainsi leur contenu dans le milieu extracellulaire (figure 3). L’exocytose a une fonction d’élimination des déchets et un rôle important pour les fonctions de signalisation et de régulation, en contrôlant la libération de messagers tels que les neurotransmetteurs, les peptides ou les hormones [13]. Ce processus est particulièrement crucial dans la signalisation interneuronale, dans les jonctions neuromusculaires et dans le contrôle des flux hormonaux dans le sang. C’est en somme l’un des piliers du fonctionnement des organismes multicellulaires.

#### *Modèle cellulaire des cellules chromaffines*

Les modèles cellulaires étudiés et développés pour l’étude du phénomène d’exocytose sont généralement les neurones géants [14], les cellules immunitaires [1] et les cellules endocrines, sécrétrices d’hormones [15, 16]. Ces modèles présentent des avantages certains sur les neurones traditionnels, notamment la robustesse des cellules, la grande taille des vésicules, la quantité plus importante de messagers chimiques sécrétés et tout particulièrement l’accessibilité des sites d’exocytose, ces derniers étant exclusivement confinés au niveau des fentes synaptiques pour les neurones traditionnels (ce qui n’est pas le cas pour les neurones géants). Néanmoins, certaines études sur les neurones traditionnels ont pu être réalisées avec des systèmes expérimentaux extrêmement sophistiqués [17].

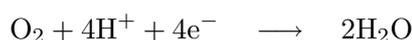
Le modèle cellulaire utilisé au laboratoire est celui des cellules chromaffines de la glande médullo-surrénale de boeuf. Ces cellules sont en fait des neurones qui se sont différenciés pour acquérir une activité glandulaire endocrine. Elles synthétisent essentiellement deux neurohormones : l'adrénaline et la noradrénaline. Il s'agit de cellules assimilables à des neurones post-ganglionnaires qui auraient perdu leurs dendrites et leur axone. Elles sont en étroit contact avec l'extrémité axonale d'un neurone pré-ganglionnaire par une synapse, ce qui leur permet d'assurer une réponse adéquate à une situation de stress. L'isolement des cellules chromaffines en grande quantité, à partir de glandes bovines, et la simplicité relative de la préparation de leur culture ont favorisé l'utilisation de ces cellules comme un des principaux modèles d'étude en neurobiologie. Notons néanmoins que ce sont des cellules quiescentes, donc qui ne se divisent pas. Ceci implique un effort constant de dissection et d'isolation, en plus de la nécessité de se procurer régulièrement des glandes médullo-surrénales dans les abattoirs.

De nombreux travaux au laboratoire ont permis d'établir un modèle physico-chimique décrivant l'exocytose [18, 19, 20] et d'étudier l'effet des structures biologiques ainsi que de nombreux paramètres physico-chimiques, comme l'osmolarité du milieu ou la courbure de la membrane plasmique, sur la dynamique de l'exocytose [21, 22, 23].

## Stress oxydant

### *Rupture d'un équilibre physiologique*

L'oxygène est une espèce chimique extrêmement électronégative, très avide d'électrons, avec un fort caractère oxydant. Son utilisation dans le processus de la respiration est rendue possible par un blocage cinétique, lui permettant d'être réduit de façon progressive et de manière contrôlée en eau par apports de quatre électrons selon l'équation globale suivante de réduction du dioxygène :



En revanche, sa réduction incomplète conduit à des espèces qui ont encore un caractère oxydant et souvent très réactif, constituant la famille des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS - *reactive oxygen species*) et des espèces réactives dérivées de l'azote (RNS - *reactive nitrogen species*). Les êtres vivants utilisent cette réactivité dans de nombreux processus, comme armes dans les mécanismes de défense ou comme messagers dans la signalisation inter- et intracellulaire. Ainsi, une certaine quantité de ces espèces réactives est maintenue dans les cellules grâce à un équilibre entre les systèmes de production de ces espèces réactives et les systèmes antioxydants empêchant leur accumulation. On parle de « stress oxydant » lorsque cet équilibre est rompu, soit par une surproduction des espèces réactives, soit par une défaillance des systèmes antioxydants.

### *ROS et RNS*

Les radicaux libres dits primaires dérivent de l'oxygène, tels l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  et le radical hydroxyle  $\text{OH}^\bullet$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $\text{NO}^\bullet$ . Les autres radicaux libres, dits secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires avec des composés biochimiques de la cellule. C'est le cas des radicaux peroxydes  $\text{ROO}^\bullet$  et alkoxydes  $\text{RO}^\bullet$ . En outre, d'autres espèces dérivées de l'oxygène ou de l'azote, comme l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou le peroxy-nitrite  $\text{ONOO}^-$ , ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et

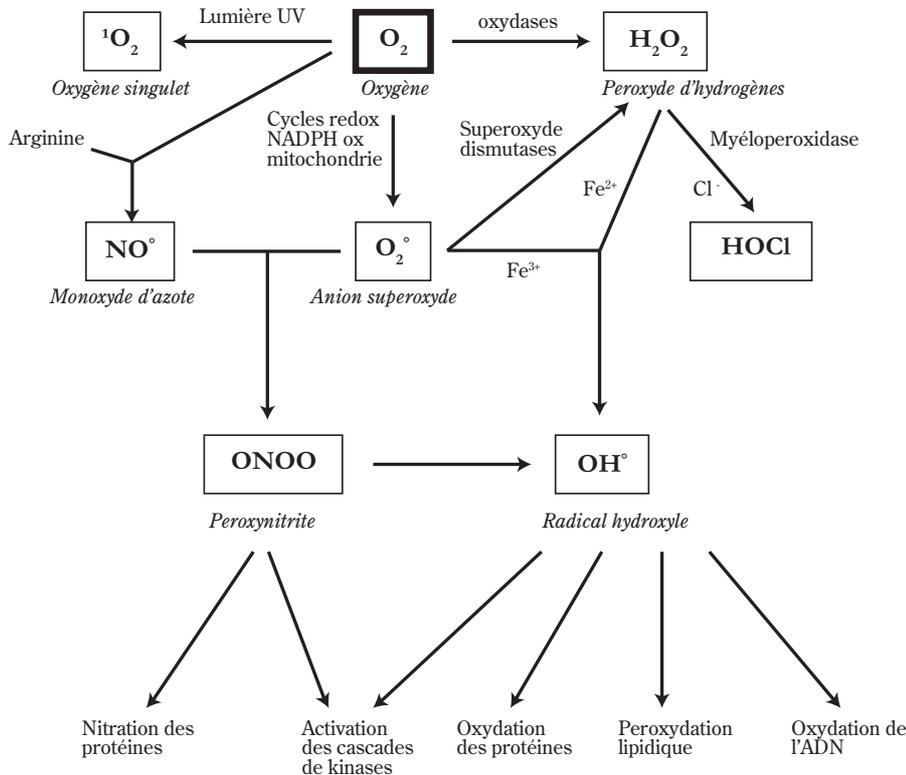


FIG. 4 – Origine des différents espèces réactives de l'oxygène et de l'azote impliqués en biologie, adapté de [24].

peuvent servir de précurseurs pour les radicaux. L'ensemble de ces radicaux libres et de leurs précurseurs sont appelés les espèces réactives dérivées de l'oxygène, ROS, et de l'azote, RNS.

Les radicaux libres introduisent un paradoxe intéressant : ce sont des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de processus pathologiques, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Certains radicaux de l'oxygène ne sont pas extrêmement réactifs, comme l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  ou le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$ . Ils constituent effectivement des précurseurs d'autres espèces plus réactives, mais leur faible réactivité permet néanmoins leur participation à des fonctions biologiques aussi variées que la vasodilatation, la transduction de signaux cellulaires, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, le fonctionnement de certains neurones, notamment ceux de la mémoire, la fécondation de l'ovule et la régulation des gènes [24]. Par contre, des radicaux comme les radicaux peroxydes  $ROO^{\bullet}$  ou surtout le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. L'organisme utilise cette toxicité pour divers mécanismes de régulation lors de la mort cellulaire programmée ou apoptose, ou de défense immunitaire afin de détruire les agents pathogènes au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires).

Les sources de ROS et de RNS sont nombreuses (figure 4) :

- La respiration mitochondriale, procurant l'énergie aux cellules, s'accompagne inévitablement de production d'anions superoxydes,  $O_2^{\bullet-}$ . Cette production est usuellement maîtrisée

et même réutilisée par divers mécanismes, mais elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense ou lorsqu'interviennent des désordres inflammatoires ou nutritionnels, qui augmentent avec l'âge.

- L'inflammation est également une source de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées lors de réactions immunitaires.
- Les mécanismes de cycles d'oxydo-réduction de l'organisme produisent de nombreuses espèces réactives. Ces mécanismes ont lieu lors de l'oxydation de molécules comme les quinones ou lors de l'élimination d'excès d'alcool, de résidus de fumée de cigarettes ou de nombreux médicaments.
- La réaction de Fenton, déclenchée en présence de métaux toxiques et d'excès de métaux libres ( $\text{Fe}^{2+}$ ) existant lors de surcharges générales, génèrent des radicaux hydroxyles  $\text{HO}^\bullet$  très réactifs.
- Enfin, les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou  $\gamma$ , soit en produisant des anions superoxydes et de l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets.

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives. Ces stratégies se divisent en deux catégories. La première catégorie regroupe les molécules dites « pièges », ou *scavenger*, qui ont pour but de piéger les radicaux et de capter les électrons célibataires. Ces molécules sont apportées soit par les éléments ingérés (vitamines C, E, caroténoïdes, polyphénols) ou par production endogène (glutathion réduit, thioredoxine). La deuxième catégorie regroupe les stratégies de nature enzymatique (superoxydes dismutases - SOD, glutathion peroxydase, catalase).

Les conséquences biologiques du stress oxydant sont extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates [24]. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation du fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression. A travers l'accumulation de tels dysfonctionnements, le stress oxydant est partiellement responsable d'un grand nombre de maladies liées au vieillissement, comme le cancer, les dysfonctionnements cardiovasculaires ou les maladies neurodégénératives telle la maladie de Parkinson.

### *Cas des macrophages*

L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires. Activées, ces cellules sont le siège d'un phénomène appelé flambée oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes  $\text{O}_2^{\bullet-}$  au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet au cours de la phagocytose la destruction des bactéries et des corps étrangers. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote  $\text{NO}^\bullet$ , est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases (NOS). Celles-ci ont été mises en évidence chez les cellules endothéliales, les macrophages et chez certains neurones. Rappelons

que la production concomitante dans un même lieu de  $\text{NO}^\bullet$  et de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxynitrite ONOO extrêmement réactif.

Le cas des macrophages est ainsi particulièrement intéressant puisqu'il contient les deux types de système enzymatique, NADPH oxydase et NO synthases. Il constitue un modèle très utilisé d'étude du stress oxydant. La lignée de macrophage de souris RAW 264.7 a été utilisée pour étudier de nombreuses problématiques liées au métabolisme, à l'inflammation et à l'apoptose. Cette lignée cellulaire a fait précédemment l'objet d'analyses, dans le laboratoire, de la génération des ROS et des RNS après la perforation mécanique de la membrane cellulaire à l'échelle de la cellule unique [25, 26]. Ce sont des cultures cellulaires très faciles à maintenir, pouvant même être congelées pour des utilisations ultérieures.

Notre approche, au cours de cette thèse, a été de développer en parallèle des techniques microfluidiques de manipulation de cellules et un système de détection électrochimique intégré à un dispositif microfluidique, dans le but i) d'obtenir des outils de microfluidiques flexibles et modulables, ii) de maîtriser la manipulation de cellules vivantes et de comprendre leur comportement dans nos dispositifs microfluidiques et iii) d'obtenir un outil novateur de détection électrochimique intégré et fiable. L'objectif final de ce travail de thèse est de répondre, grâce à la mesure en parallèle sur cellules uniques, à la problématique de la communication inter-cellulaire lors d'un stress appliqué à un individu ou à une population. Ce manuscrit est axé selon ces trois thématiques.

La première partie de ce manuscrit traite de l'optimisation des outils microfluidiques nécessaires à cette étude. Dans un premier chapitre, l'outil de développement de dispositifs microfluidiques à notre disposition, la lithographie molle, sera présenté dans son principe, puis dans son utilisation, selon des aspects pratiques d'intégration d'éléments de contrôle actif et d'intégration d'outils de détection. Un deuxième chapitre décrira la technique, appelée micro-aspiration, d'assemblage réversible de dispositifs microfluidiques que nous avons inventée pour résoudre une problématique technique et conceptuelle d'accès aux échantillons à l'intérieur des dispositifs microfluidiques. Un troisième chapitre présentera un dispositif microfluidique permettant dans un premier temps le positionnement d'objets dans des chambres destinées à accueillir une cellule unique et permettant dans un deuxième temps une gestion des flux de telle sorte que le contenu des chambres puisse être remplacé par diffusion, procurant des conditions idéales pour réaliser des analyses électrochimiques. Le développement de ces deux outils a abouti à un élément microfluidique de positionnement et d'activation chimique d'objets de la taille d'une cellule que l'on peut assembler et désassembler à souhait sur des substrats de notre choix.

La deuxième partie est consacrée à la problématique de la manipulation de cellules vivantes dans nos microsystèmes à travers deux types cellulaires, des macrophages de souris, RAW 264.7, qui feront l'objet d'analyses électrochimiques du stress oxydant dans la partie suivante, et des cellules souches mésenchymateuses (CSM) murines et humaines, qui feront l'objet d'inductions chimiques pour l'étude de la différenciation cellulaire (travail en collaboration avec M Luc Senébé de l'Etablissement Français du Sang). Ainsi, un premier chapitre traitera des outils de manipulation et de culture de ces cellules que nous avons développés dans le laboratoire. Ensuite, nous détaillerons la réalisation de la gestion dynamique des volumes dans les dispositifs microfluidiques contenant des cellules en culture en grand nombre d'une part, et d'autre part dans un dispositif microfluidique distribuant des cellules uniques dans des chambres de mesures destinées à des analyses électrochimiques en parallèle. Nous aborderons dans cette partie des notions importantes de viabilité cellulaire à prendre en compte lors de manipulation de cellules

vivantes dans des milieux confinés.

La troisième partie détaillera l'intégration d'outils d'analyse électrochimique dans des micro-systèmes pour des détections de phénomènes locaux de libération d'espèces chimiques par les cellules. Un premier chapitre traitera d'une première mise au point expérimentale destinée à la détection de phénomènes d'exocytose dans un micro-système modèle et au couplage avec un système de détection optique. Un deuxième chapitre traitera du deuxième processus biologique qui nous intéresse : le stress oxydant. Les connaissances accumulées dans les deux premières parties de ce manuscrit ont un rôle primordial dans l'intégration d'un système de détection électrochimique du stress oxydant dans un dispositif microfluidique. En effet, nous avons conçu d'une part un dispositif microfluidique réversible permettant de positionner des cellules uniques dans des chambres microfluidiques et de les stimuler chimiquement, et nous avons étudié d'autre part le comportement, dans ces dispositifs, des macrophages de souris RAW 264.7, qui constituent le modèle cellulaire pour l'étude du stress oxydant que nous utiliserons. L'intégration de microélectrodes fonctionnelles dans ces chambres microfluidiques complétera alors notre micro-système d'analyse électrochimique. Nous détaillerons donc dans ce chapitre la mise au point du protocole expérimental de l'activation et de la mesure électrochimique du stress oxydant, avant d'aborder l'intégration de microélectrodes dans les chambres de positionnement, d'activation et de mesure cellulaire. Enfin, un dernier chapitre traitera des développements à très courts termes de notre dispositif intégré, envisagés pour la réalisation de mesures électrochimiques en parallèle dans un même dispositif microfluidique, sur un ensemble discret de cellules en communication ou non.



## Première partie

# Systemes microfluidiques pour la gestion d'un milieu confiné



## Chapitre 1

# La lithographie molle, un outil de développement puissant

Le domaine de la microfluidique a connu un grand essor dans les années 1980–1990 lorsque les techniques de fabrication issues de la micro-électronique ont été utilisées pour réaliser des microsystèmes électro-mécaniques appelés MEMS - *Micro-Electro-Mechanical Systems*, c'est-à-dire des microsystèmes intégrant sur un même support de silicium des éléments mécaniques, électroniques, des organes de commande et des capteurs. Les axes de recherche étaient pointés vers la miniaturisation des systèmes d'analyses intégrés et ont abouti à des microsystèmes sophistiqués incorporant des éléments micro-usinés tels que des vannes piézoélectriques [27] ou des microstructures en porte-à-faux, c'est-à-dire des *cantilevers*, permettant la détection à l'échelle moléculaire d'espèces chimiques [28], représentant la micro-ingénierie de pointe. La recherche et le développement des microsystèmes est tournée aujourd'hui vers leurs applications dans les domaines de la biologie. Divers développements au fil des années ont fait apparaître des dispositifs microfluidiques de types extrêmement variés, allant de dispositifs en silicium ou en verre micro-usinés aux dispositifs en polymère biodégradable en passant par des dispositifs hybrides polymère/CMOS<sup>1</sup> par exemple. Les techniques de microfabrication pour créer ces microsystèmes sont nombreuses et spécifiques aux matériaux qui sont eux-mêmes, aujourd'hui, extrêmement variés.

Au laboratoire, nous avons fait le choix stratégique de la lithographie molle pour la fabrication de structures micro- et nanométriques, une technique pratique, efficace et peu coûteuse. Ce chapitre explicitera dans une première partie les particularités de cette technique. Nous discuterons dans une seconde partie des principes de développement des microsystèmes à partir de la lithographie molle pour comprendre les avantages stratégiques qu'apporte cette technique.

---

<sup>1</sup>CMOS, semi-conducteur à oxyde de métal complémentaire, est une technologie de fabrication de composants électroniques à faible consommation électrique.

<b>1. La lithographie molle, un outil de développement puissant</b>	
<b>1.1</b>	<b>Particularités de la lithographie molle en microfluidique . . . . . 27</b>
1.1.1	Définition . . . . . 27
1.1.2	PDMS . . . . . 28
1.1.3	Lithographie molle « multicouche » . . . . . 30
<b>1.2</b>	<b>Développement de dispositifs intégrés . . . . . 32</b>
1.2.1	Exemple de développement d'un dispositif intégré . . . . . 32
1.2.2	Intégration d'éléments de détection . . . . . 36
<b>1.3</b>	<b>Conclusion . . . . . 38</b>

---

## 1.1 Particularités de la lithographie molle en microfluidique

### 1.1.1 Définition

La lithographie molle, plus connue en anglais par *soft lithography*, est une stratégie de micro-fabrication destinée à fabriquer ou reproduire des structures à partir de moules et de tampons en élastomère, c'est à dire faits à partir de polymères présentant des propriétés élastiques. Nous utilisons plus particulièrement la technique d' « empreinte par moulage », REM - *replica molding* [29], pour fabriquer nos dispositifs microfluidiques. Cette technique consiste à mouler un monomère polymérisable sur une surface microstructurée pour former une empreinte de ces structures sur l'élastomère polymérisé. Il s'en suit l'assemblage du bloc d'élastomère sur un substrat choisi. L'interstice créé entre le substrat et l'empreinte des structures dans l'élastomère correspond alors aux canaux microfluidiques (figure 1.1).

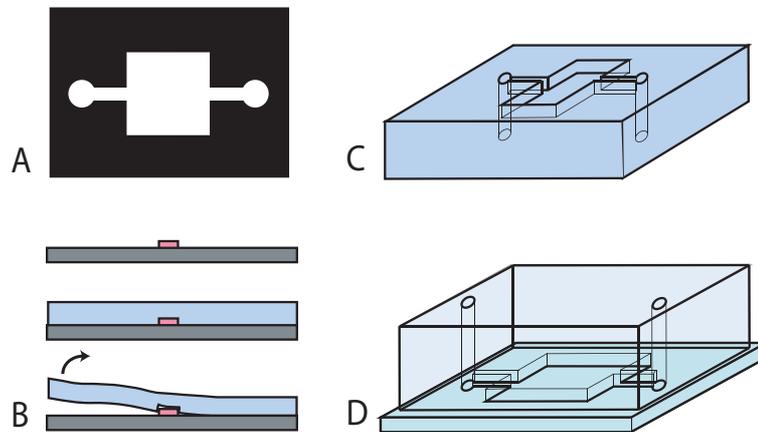


FIG. 1.1 – Fabrication d'un dispositif microfluidique en PDMS. A. Fabrication d'un moule par les techniques de photolithographie à partir d'un masque transparent. B. Moulage de l'élastomère sur le moule. C. Après démoulage de l'élastomère réticulé, les entrées et sorties fluidiques sont créées. D. Assemblage du dispositif sur son substrat.

Le matériel nécessaire est minimal : monomère, moules, montages pour la polymérisation de l'élastomère et pour l'assemblage des dispositifs. La polymérisation et le traitement pour l'assemblage peuvent être aussi simples qu'un passage dans un four et une oxydation des surfaces. La fabrication en série de ces dispositifs ne nécessite aucune expertise ni machinerie sophistiquée. Cet attribut démarque la lithographie molle des autres techniques de fabrication de microsystèmes. En effet, les autres matériaux habituels pour les microsystèmes sont le silicium [30, 31], le verre [32], et le plastique [33]. Dans le premier cas, les étapes de fabrication et d'assemblage sont longues et souvent très techniques, consistant en plusieurs étapes de photolithographie et de gravure successives et nécessitant un personnel dédié. Pour les dispositifs en verre, seules les structures très simples peuvent être fabriquées. Enfin, dans le cas du plastique, la problématique est quelque peu différente puisque le principe de fabrication est aussi celui de la réplique d'un moule. L'avantage de l'utilisation d'élastomères réside alors dans les propriétés intrinsèques du matériau et dans leur facilité à être manipulés. Ce point sera amplement détaillé dans le paragraphe suivant. Notons cependant que le silicium et même le plastique bénéficient

d'avantages importants par rapport aux élastomères en ce qui concerne l'industrialisation. Le silicium, tout particulièrement, est usiné par les techniques de microfabrication plus précises et très largement implantées dans les industries.

Les coûts et difficultés liés à la lithographie molle résident seulement dans l'obtention ou la fabrication des structures qui serviront de moule. La fabrication des moules se fait avec les techniques usuelles de photolithographie (voir Annexe A), et les efforts mis en œuvre pour l'obtention des moules sont équivalents à ceux nécessaires pour le développement des autres types de dispositif. Les avantages de la lithographie molle apparaissent seulement ensuite, dans la fabrication aisée de prototypes en grand nombre. Leur validation ou invalidation est facilitée, ce qui, en retour, accélère le processus de développement et d'optimisation par essai/erreur. Enfin, une fois un dispositif validé, sa fabrication et son utilisation deviennent indépendantes du laboratoire de développement et peut se faire avec commodité dans n'importe quel environnement. C'est pour ces raisons que les dispositifs développés par lithographie molle sont de plus en plus utilisés dans les divers laboratoires scientifiques ou exploités par les industriels.

### 1.1.2 PDMS

Les polymères en général, plastiques ou élastiques, sont plus facile à fabriquer et assembler que le verre ou le silicium, mais ils présentent néanmoins quelques désavantages. Le contrôle de leur état de surface demande une attention particulière, plus complexe que pour le verre ou le silicium. De plus, ils sont souvent incompatibles avec les solvants organiques, et sont généralement incompatibles avec les hautes températures.

Pour la lithographie molle, les matériaux le plus souvent utilisés sont le Polyuréthane, le Fluorosilicone ou autres polymères siliconés. Pour les applications biologiques, souvent en solution aqueuse, tous les matériaux cités précédemment peuvent être utilisés, mais le matériau de choix est le PDMS - polydiméthylsiloxane, un polymère organique siliconé transparent, inerte et non toxique.

#### Réticulation du PDMS

La formule chimique du PDMS est la suivante :  $(\text{H}_3\text{C}) [\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]_n \text{CH}_3$ . La figure 1.2 donne la formule semi-développée du PDMS ainsi que la réaction de réticulation. Le PDMS utilisé au laboratoire, RTV 615, se présente sous forme d'un produit bicomposant A et B, où A correspond au polymère de base et B correspond à l'agent de réticulation. Ce dernier est composé de chaînes courtes du polymère de base où les groupements terminaux vinyloxy sont remplacés par un groupement méthyle. La réaction de réticulation peut se faire à température ambiante en une journée, mais est accélérable à chaud : le temps de prise complète peut être réduit à une heure à 150 °C. La réaction peut être de surcroît accélérée par l'addition d'un sel de platine. Nous laissons habituellement la réaction se faire pendant deux heures à 80 °C.

#### Modification des propriétés de surface

Une fois pris, le bloc de PDMS présente une surface hydrophobe. La chimie de surface peut être contrôlée par des méthodes bien développées [34], notamment celle de l'introduction de groupes polaires de type silanol (Si-OH) au détriment des groupements méthyles (Si-CH<sub>3</sub>) par exposition de la surface à un plasma à air [35]. De plus, par ses propriétés de surface et sa flexibilité mécanique, le PDMS peut adhérer à une surface relativement plane par contact

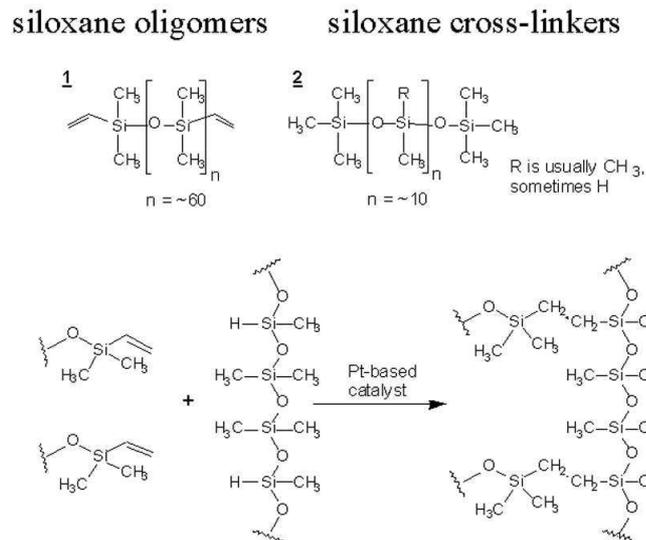


FIG. 1.2 – Réticulation du PDMS. en haut : Formule semi-développée du polymère de base et de l'agent de réticulation. en bas : Réticulation du PDMS

conforme, en épousant parfaitement la surface du substrat. Il peut alors pallier les défauts mineurs de planéité de la surface grâce aux interactions van der Waals créés à l'interface. Ce contact conforme est réversible et une déformation du bloc de PDMS permet de le décoller de la surface plane. Lorsque la surface de PDMS est oxydée par le plasma, et que le bloc de PDMS est en contact conforme avec un substrat, il peut se produire des réactions de condensation entre les groupements silanol (Si-OH) et les groupements appropriés (OH, COOH, C=O) du substrat. Les liaisons covalentes résultantes contribuent à l'adhésion irréversible du bloc de PDMS sur le substrat.

Il est possible de faire adhérer ainsi le PDMS sur des substrats de différentes natures [34] : PDMS, verre, silicium, silice (SiO<sub>2</sub>), quartz, nitrure de silicium (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>), polyéthylène, polystyrène et carbone vitreux. Cependant, cette méthode n'est pas efficace sur tous les polymères. Le PDMS ne peut s'assembler de cette manière sur les substrats suivants : Saran, polyimide, poly(méthylmethacrylate) et polycarbonate.

Enfin, l'hydrophilie créée par le plasma disparaît au bout de quelques heures du fait du réarrangement des chaînes de polymère au sein du bloc de PDMS [36]. Elle peut néanmoins être conservée plus longtemps si cette surface est maintenue au contact d'une solution polaire ou si un traitement de surface par greffage de molécules est effectué [34].

### Avantages du PDMS par rapport aux les polymères plastiques

Le PDMS polymérisé est une matière élastique très facile à manipuler, couper ou trouser. Il retrouve sa forme après la plupart des déformations mécaniques et permet un démoulage facile sans risque d'abîmer le moule qui représente le coût de fabrication le plus important. La réplique de structures à l'échelle de la centaine de nanomètres a été réalisée avec grande fidélité [37]. De surcroît, le PDMS est considéré comme optiquement transparent jusqu'à 280 nm, ce qui le rend

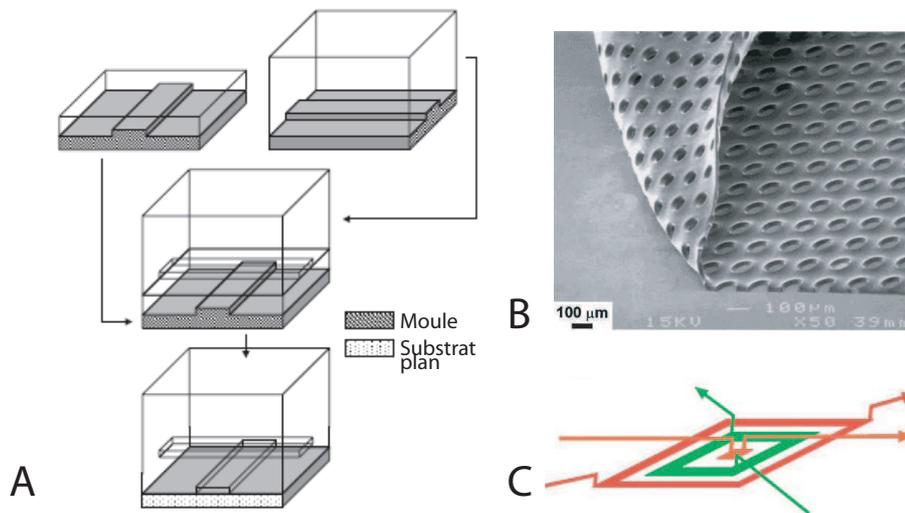


FIG. 1.3 – Lithographie molle multicouche, adaptée de [38, 40, 39]. A. L’assemblage de blocs d’élastomères préalablement moulés permet la superposition de réseaux de canaux. L’espacement entre chaque réseau de canaux correspond à l’épaisseur de la couche du bas, à l’épaisseur d’un canal près. B. Une membrane de  $50\ \mu\text{m}$  d’épaisseur de PDMS contenant des ouvertures de  $100\ \mu\text{m}$ . C. En reprenant le schéma A, l’utilisation d’une couche inférieure fine contenant des ouvertures au-dessus des canaux permet, après l’assemblage du bloc d’élastomère supérieur sur la membrane trouée, la réalisation d’un réseau de canaux interconnectés en trois dimensions. Ceci permet la circulation des fluides dans des réseaux de canaux en trois dimensions.

compatible avec de nombreuses méthodes de détection, notamment la mesure d’absorbance en UV/visible ou en fluorescence. Enfin, le PDMS est biologiquement inerte, perméable à l’air et stérilisable à haute température. Ceci rend possible la culture cellulaire ainsi que la manipulation de cellules vivantes dans les dispositifs constitués de ce matériau. Toutes ces propriétés font du PDMS un matériau de choix pour les dispositifs microfluidiques dédiés à l’analyse et la manipulation d’échantillons biologiques.

### 1.1.3 Lithographie molle « multicouche »

Les dispositifs fabriqués par lithographie molle sont par nature répartis sur un seul et même niveau, rendant difficile l’introduction d’éléments actifs ou mobiles, et empêchant la formation de structure en trois dimensions développée. Pour pallier ces difficultés, la lithographie molle multicouche, ou *multi-layered soft lithography* [38], a été développée dans un premier temps par le groupe de S. Quake. Cette technique consiste en la superposition et l’assemblage irréversible de plusieurs couches de dispositifs fabriqués par lithographie molle (figure 1.3 A). La facilité de leur assemblage étanche a permis une ouverture vers la verticale des dispositifs microfluidiques en élastomère. Il est désormais possible de fabriquer des dispositifs de plusieurs couches avec la même aisance que ceux fabriqués par la technique standard de lithographie molle. Parallèlement, l’équipe de G. M. Whitesides a développé une technique similaire pour créer des canaux microfluidiques en trois dimensions [39]. Celle-ci consiste en l’assemblage irréversible d’un bloc d’élastomère moulé par lithographie molle par dessus une membrane de ce même



FIG. 1.4 – Déformation d’une membrane de PDMS entre un canal de contrôle et un canal fluide (de profil rectangulaire A., et arrondi B.), adapté de Unger 2000

élastomère structuré et troué par une technique de lithographie molle légèrement modifiée. La connexion entre les deux couches se fait grâce aux trous de la membrane (figure 1.3 B et C).

L’intérêt principal de la lithographie molle multicouche réside dans l’intégration d’éléments de contrôle actif dans une puce microfluidique. Ceci est rendu possible par la flexibilité des élastomères. Le module de Young de tels matériaux est d’environ 700 kPa, permettant une grande déformation de ce matériau par une force d’actionnement minimale. Il existe différentes méthodes pour provoquer la déformation d’une membrane d’élastomère fixée par son périmètre. Un premier exemple est celui du dispositif électromagnétique élastomérique [41]. En effet, il est possible d’imposer des propriétés magnétiques ou électriques à une membrane d’élastomère grâce à l’adjonction respective de poudre de fer ou de particules de noir de carbone. Cependant, la méthode la plus simple et directe est d’utiliser la membrane d’élastomère non modifiée et de lui appliquer une pression à sa surface. Sa déformation sera d’autant plus importante que le rapport entre ses deux plus petites dimensions ( $\frac{\text{épaisseur}}{\text{largeur}}$ ) est faible.

L’application de ce phénomène dans un dispositif fabriqué par lithographie molle multicouche est relativement aisée. Il suffit que les deux niveaux de réseau microfluidique soient séparés par une fine couche d’élastomère (figure 1.3 A), ce qui se retrouve systématiquement lorsqu’une couche d’élastomère structurée est assemblée sur une deuxième couche d’élastomère structurée de très faible épaisseur. Imaginons donc un canal de la couche de faible épaisseur. En supposant que la couche d’élastomère a été fixée à  $20\ \mu\text{m}$  et que le canal a une hauteur de  $10\ \mu\text{m}$ , il existe alors une membrane d’élastomère de  $10\ \mu\text{m}$  d’épaisseur suspendue au-dessus de toute la surface du dit canal. Si un bloc entier d’élastomère est assemblé par dessus la première couche fine, la membrane disparaîtra et fera partie intégrante de la masse d’élastomère rajoutée. Si, par contre, le bloc d’élastomère assemblé contient un canal, au croisement de ce canal avec celui de la couche fine, il restera une portion de la membrane de  $10\ \mu\text{m}$  qui ne sera pas collée au bloc d’élastomère rajouté (figure 1.3 A). Ainsi, cette membrane sera simultanément au contact du fluide circulant dans le canal du bas, canal de la fine couche initiale, et du fluide circulant dans le canal du haut, canal de la couche rajoutée. La distorsion de cette membrane est de fait contrôlée par la différence de pression entre les deux canaux. Selon la géométrie et la différence de pression, il est possible de déformer la membrane de telle sorte que l’un des canaux soit totalement obturé [38] (figure 1.4). Cette configuration est celle d’une vanne microfluidique. C’est ainsi que sont introduits divers éléments de contrôle actif tels que les vannes, les pompes péristaltiques et les mélangeurs. La commande de ces éléments de contrôle actif peut se faire au travers d’un système de commande de pression contrôlé par ordinateur grâce à une série d’électrovannes. Les détails de fabrication de tels éléments sont explicités en annexe A.

La différence fondamentale entre la lithographie molle et les autres techniques de microfabrication peut être résumée en deux points :

- La fabrication des dispositifs par lithographie molle, une fois le moule achevé, est très facile et très rapide. Ceci permet la fabrication aisée des prototypes en grand nombre et donc

facilite leur exploitation et leur validation ou invalidation. Le processus du développement se retrouvent alors grandement accéléré et l'utilisation des dispositifs rendue plus accessible pour les non-spécialistes.

- L'utilisation d'élastomères permet l'intégration d'éléments de contrôle actif au sein des dispositifs. Ceci permet la conception de microsystèmes sophistiqués tout en conservant la facilité et la rapidité dans leur fabrication.

## 1.2 Développement de dispositifs intégrés

Durant les années 1990, les efforts de recherche dans le domaine des microsystèmes appliqués à la biologie se sont concentrés sur le développement d'instruments d'analyse et de détection biochimiques miniaturisés et améliorés. Le changement d'échelle a en effet augmenté les sensibilités de détection, tout en réduisant les temps d'analyse et les quantités de réactifs utilisés. L'application de tels capteurs touche de nombreux domaines : la recherche fondamentale en biologie [42, 43], la détection chimique pour l'environnement [44, 45], les diagnostics cliniques [46, 47] et les industries agro-alimentaire, pharmaceutique [48, 49] et de défense [50]. Cependant, les prouesses techniques réalisées par ces microsystèmes n'ont pas particulièrement révolutionné la manière de concevoir les expérimentations en recherche biologique. Ceci peut s'expliquer par le trop grand écart technique entre la machinerie utilisé sur paillasse et ces microsystèmes, ainsi que le trop grand écart culturel entre les utilisateurs et les concepteurs.

La lithographie molle a contribué à un important changement dans ce domaine. L'aisance de fabrication des dispositifs a considérablement réduit le temps et les coûts nécessaires, rendant la technique accessible à de nombreux chercheurs, même non spécialistes. Parallèlement, de plus en plus de projets de recherche traitent de sujets pluridisciplinaires : il n'est donc plus rare de trouver des physiciens et des théoriciens dans les laboratoires de biologie comme de trouver des biologistes dans des laboratoires de physique ou de chimie. Avec l'atténuation de ces frontières, il s'est développé au fil des années de véritables échanges, centrés sur ces techniques nouvelles. De plus, la possibilité d'intégrer des éléments actifs de contrôle fluide grâce aux vannes pneumatiques a permis la conception et l'examen de systèmes complexes intégrant chambres de réaction, éléments de détection et de séparation au sein d'un même dispositif. Le champ d'application s'en est grandement élargi, et les possibilités semblent illimitées.

La recherche dans ces domaines continue d'évoluer et de nombreuses alternatives à la lithographie molle multicouche se sont développées. Le PDMS n'est plus le seul matériau utilisé pour les dispositifs microfluidiques aux applications biologiques et les éléments de contrôle actif de ses dispositifs sont désormais variés, allant des vannes pneumatiques hybrides en élastomères modifiés résistants aux solvants organiques [51] aux compressions mécaniques externes avec des systèmes de plage Braille [52]. Cependant, la lithographie molle demeure aujourd'hui encore un outil de développement de microsystèmes pour les applications biologiques extrêmement puissant et utile, par sa polyvalence, sa capacité à intégrer divers éléments et sa popularité grandissante dans les laboratoires de biologie.

### 1.2.1 Exemple de développement d'un dispositif intégré

Pour illustrer le processus de développement de dispositifs intégrés basés sur la lithographie molle, retraçons les étapes clés qui ont abouti à la réalisation d'une plate-forme multiplexe de

synthèse d'ADN complémentaires à partir d'ARN messagers extraits d'une cellule unique (plateforme multiplexe de RT-PCR) [53]. Le but d'une telle plate-forme est d'obtenir des informations exhaustives sur l'expression génétique d'une cellule unique, tout en gardant au sein de la même expérience un aspect statistique indispensable à l'interprétation des résultats obtenus. Cette approche aurait paru irréaliste il y a dix ans, devant l'importance des obstacles à franchir, mais elle est aujourd'hui presque habituelle. La clé de voûte de cette approche est l'analogie entre un dispositif microfluidique et un circuit électronique où chaque ensemble peut être subdivisé en entités élémentaires et simples, comme les transistors, les compteurs, les comparateurs, les multiplexeurs... Il est alors toujours possible de développer séparément chacun des éléments dans le but final de les intégrer dans un seul dispositif pour accomplir une tâche spécifique. C'est cette flexibilité retrouvée dans la lithographie molle qui permet d'envisager les projets les plus invraisemblables *a priori*.

Nous allons détailler ici les entités élémentaires simples qui permettent de rassembler différents éléments fonctionnels dans un dispositif intégré. Plaçons-nous dans le cadre d'un dispositif de PDMS fabriqué par lithographie molle multicouche où le transport dans un réseau fluidique pourra être contrôlé par une activation adéquate d'un ensemble de vannes située dans une couche supérieure. Chaque élément ou configuration de contrôle actif sera détaillé et discuté, et des exemples d'utilisation seront donnés.

### Gestion active des flux

- **Vanne** : L'élément de contrôle de base et de grande utilité est la vanne pneumatique, dite « de Quake », introduite précédemment, dans le paragraphe 1.1.3. Elle permet dans un premier temps d'arrêter le flux dans un canal, déviant alors le flux global vers les canaux non bloqués. Par ailleurs, elle peut servir de séparateur entre deux compartiments mettant en contact les fluides seulement au moment voulu, ou encore délimiter une zone « doseuse » qui correspondra à un volume de fluide fixé et utilisé par la suite.
- **Pompe péristaltique** : Lorsque trois vannes sont mises en série, il est possible de les actionner dans un certain ordre pour faire avancer le fluide de manière contrôlée. Cette configuration constitue celle d'une pompe péristaltique [38]. Dans ce cas, le sens de parcours du fluide est imposé par l'ordre selon lequel les vannes sont activées alors que la vitesse dépende de celle du cycle d'activation des vannes.

Ces deux éléments permettent déjà un contrôle sophistiqué des fluides dans diverses chambres et canaux. Un premier exemple d'utilisation directe est donné par un dispositif de tri de particules, de bactéries ou de cellules par fluorescence, en couplant le dispositif avec un système de détection optique [54] (figure 1.5 A). Un deuxième exemple fondé sur le système de vannes en tant que séparateur et délimiteur de volume est donné par un dispositif de criblage des rapports de concentration des réactifs pour la cristallisation de protéines en solution [55] (figure 1.5 B). Il s'agit ici de deux chambres microfluidiques, en parallèle, de volume connu et communicantes qui sont séparées entre elles par une vanne séparatrice et qui sont isolées du dispositif entier par deux vannes, correspondant chacune à l'entrée de chaque chambre. Une fois les chambres remplies et isolées, la vanne séparatrice est ouverte et les deux réactifs peuvent diffuser librement dans chacune des chambres. La variation du volume des chambres et la nature des réactifs injectés permettent de varier les différents paramètres.

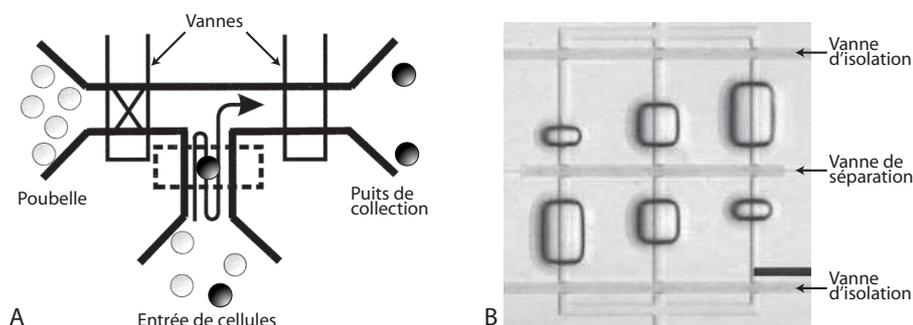


FIG. 1.5 – A. Schéma montrant le fonctionnement d'un dispositif de tri par fluorescence, adapté de [54]. Les objets à trier traversent la zone de détection, en pointillés, et sont orientés vers le puits de collection ou la poubelle selon leur nature grâce à des vannes pneumatiques. B. Microphotographie de chambres de cristallisation de protéine. Les chambres de taille variable permettent la variation des volumes mis en jeu. Les réactifs sont introduits séparément, par le haut et par le bas, avec la vanne de séparation préalablement fermée. Une fois les différents volumes remplis, les chambres sont isolées du reste du dispositif par la fermeture des vannes d'isolation et la diffusion des réactifs peu avoir lieu après l'ouverture de la vanne de séparation. Adapté de [55]. La barre d'échelle mesure  $500 \mu\text{m}$ .

### Mise en série des éléments microfluidiques

- **Tamis** : Une autre manière d'utiliser la vanne pneumatique est de ne la fermer que partiellement, en contrôlant sa géométrie ou la pression d'activation (plus la pression d'activation est grande, plus la membrane sera déformée, jusqu'à l'obturation complète du canal fluide). La vanne partiellement fermée fait office de tamis à travers lequel le fluide pourra passer, mais où les particules au-dessus d'une certaine taille se trouveront piégées.
- **Mélangeur/Réacteur** : Une méthode de mélange actif des fluides dans un canal microfluidique consiste à faire circuler les fluides dans un circuit fermé (figure 1.6 A). En effet, le pompage péristaltique induit un flux de type Poiseuille où la vitesse le long des parois des canaux est considérée nulle. Ainsi, au fur et à mesure du pompage, le front entre deux fluides se déforme en une parabole indéfiniment étirée. Notons que l'écoulement dans ces microcanaux est laminaire : les lignes de courant sont stables et ne se croisent pas. Les phénomènes de mélange ne sont possibles que par la diffusion des molécules dans le volume par mouvement Brownien. Le circuit étant fermé, l'étirement du front repasse par son point de départ et crée des couches superposées de fluides différents [56]. Dans le cas où les deux fluides diffèrent seulement par la nature de leurs solutés, par exemple des solutions aqueuses avec deux types de molécules différentes, les molécules peuvent diffuser librement à travers le front. Lorsque les distances entre chaque couche atteignent la dizaine de microns, distance caractéristique de diffusion de petites molécules dans l'eau, les deux fluides sont considérés comme mélangés.

Hong *et al.* ont utilisé ces éléments supplémentaires pour réaliser un dispositif d'extraction des acides nucléiques à partir d'un échantillon biologique [57], typiquement une bactérie ou une cellule de mammifère. Le principe de ce dispositif repose sur la lyse des cellules par mélange de l'échantillon biologique et du tampon de lyse dans le réacteur suivi de la concentration des acides nucléiques par purification du lysat au travers d'un amas de billes adéquates préalablement

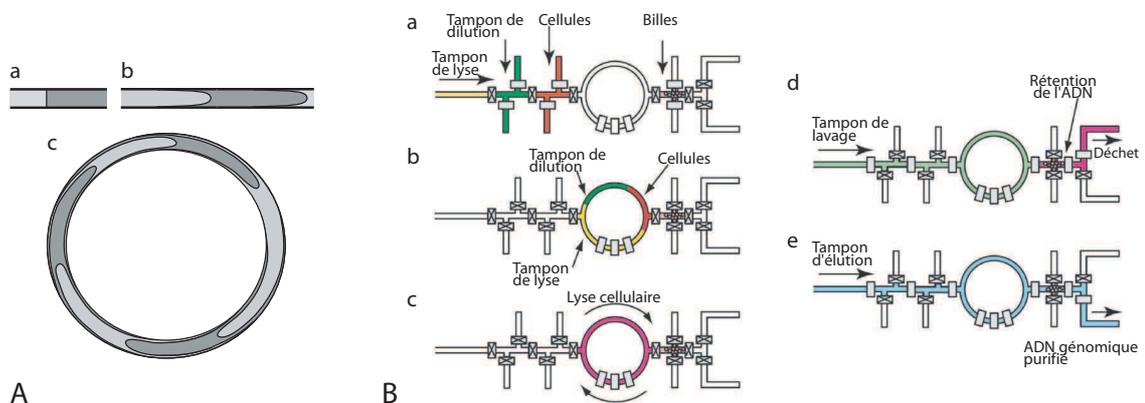


FIG. 1.6 – Utilisation du mélangeur circulaire A. Principe du mélangeur circulaire B. Etapes d'extraction d'ARN dans un dispositif fluidique, adapté de [57] - a. Positionnement des différents réactifs ; les billes servant de colonne d'extraction ont été immobilisées en utilisant le principe de tamis. b. Introduction des réactifs dans le mélangeur. c. Mélange et lyse des cellules. d. Passage du lysat dans la colonne d'extraction. e. Recouvrement de l'ARN purifié

piégées grâce au système de tamis (figure 1.6 B). L'extraction finale se fait par le passage d'un éluant à travers des billes sur lesquelles sont adsorbés les acides nucléiques.

### Mise en parallèle des éléments microfluidiques

- **Multiplexeur fluidique** : Il est possible de diminuer le nombre de vannes de contrôle tout en maintenant le nombre de canaux contrôlés lorsque celui-ci devient important. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser un réseau combinatoire de vannes. Différentes manières sophistiquées de multiplexer les vannes ont été développées [58, 59, 60]. Citons l'organisation du réseau de vannes en arbres binaires (figure 1.7), où  $2 \log_2 N$  vannes peuvent contrôler  $N$  canaux.

Grâce à ces cinq éléments, il a été possible de concaténer et de paralléliser des entités microfluidiques développées individuellement afin de réaliser une plate-forme capable d'effectuer des tâches complexes. Marcus *et al.* ont abouti à la plate-forme multiplexe de synthèse d'ADNc de la manière suivante :

- en intégrant, dans un premier temps, dans une même entité fluidique les cinq étapes suivantes : capture de cellule, lyse de cellule, purification d'ARNm, synthèse d'ADNc et purification d'ADNc [61]
- en parallélisant, dans un deuxième temps, cinquante de ces unités dans un seul et même dispositif microfluidique [53]

Le développement de cette plate-forme se fonde dans un plan plus large d'intégration à grande échelle de dispositifs microfluidiques, appelé mLSI - *microfluidic Large-Scale Integration* [62], développé par le groupe de S. Quake dans le but d'améliorer et d'automatiser les tâches expérimentales fastidieuses inhérentes à la recherche en biologie.

Le processus de développement pour arriver à une telle plate-forme a été extrêmement long et indirect. Beaucoup d'efforts et de moyens ont été nécessaires pour le mettre en œuvre, mais ces coûts étaient largement justifiés par la quasi certitude de résultat garantie par l'outil de

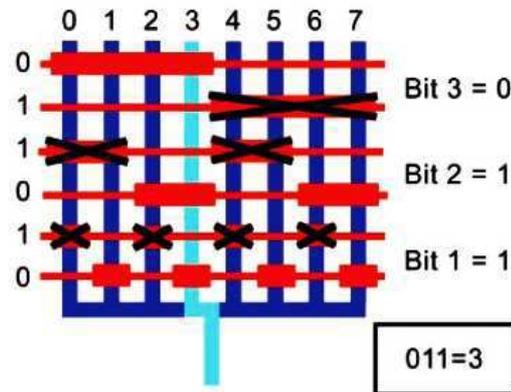


FIG. 1.7 – Multiplexeur fluide en configuration d’arbre binaire : utilisation de 3 paires de vannes (rouge) pour contrôler 8 canaux fluidiques (bleu), adapté de [58]. La pression d’actuation des vannes est choisie de telle sorte que seuls les emplacements de plus grande largeur de vanne puissent être fermés. Le choix de l’ouverture de chaque canal est représenté par une combinaison d’ouverture et de fermeture de l’ensemble du multiplexeur.

développement sur lequel se repose ce processus. Comme il a été démontré, la lithographie molle permet de développer indépendamment chaque unité fonctionnelle d’un dispositif intégré pour les assembler *in fine*.

### 1.2.2 Intégration d’éléments de détection

L’exemple précédent s’est focalisé sur le développement, avec les outils élémentaires de la lithographie molle, d’un dispositif intégré constitué en sa totalité d’élastomère. La fabrication de ce type de dispositif est constituée en elle-même d’un nombre minimum d’étapes et est à la portée de tous : il suffit de mouler les différents blocs d’élastomère et de les assembler. L’analyse et le contrôle de ces dispositifs se font alors par des techniques traditionnelles d’observation optique au sein même des dispositifs ou par des techniques habituelles d’analyses après extraction des échantillons.

La lithographie molle s’accommodant de divers types de substrats, il est bien évidemment possible d’intégrer des éléments non élastomériques dans les dispositifs à des fins de détection, d’analyse ou de contrôle. Il est à noter que l’ajout d’éléments intégrés sera fera systématiquement au détriment de la facilité de fabrication. Le développement des éléments d’analyse et de détection à l’échelle micrométrique voire nanométrique a été réalisé depuis de nombreuses années et il serait inutile d’en faire ici une liste exhaustive. Nous citerons plutôt des exemples simples et utiles de systèmes intégrés aux dispositifs microfluidiques pour illustrer leur potentiel d’adaptabilité.

#### Éléments externes

Avant d’aborder les éléments de détection intégrés dans les dispositifs microfluidiques, il est nécessaire d’évoquer les systèmes d’observation et de détection externes aux dispositifs souvent utilisés. Ces systèmes sont d’ailleurs tout à fait indépendants de la nature des dispositifs microfluidiques mais revêtent une importance capitale dans le domaine des microsystèmes.

Des efforts considérables ont été déployés pour répondre aux nécessités de détection de produits de volume extrêmement faible [63, 64]. Parmi les techniques nouvelles utilisées dans ce domaine, les méthodes optiques comme les mesures d'absorption [65], de chemiluminescence [66], de fluorescence induite par laser [67] ou de variation d'index de réfraction [68] sont importantes car elles sont non invasives et de grande résolution spatio-temporelle. Des techniques nécessitant un matériel plus spécifique comme les microscopes Raman [69], les systèmes d'imagerie de résonance plasmon de surface [70] ou des montages de microscopie à lentille thermique [71] ont également été utilisées avec grand succès. Il est à noter que les dispositifs microfluidiques fabriqués par lithographie molle sont totalement transparents, ce qui les rend particulièrement appropriés pour les techniques optiques de micromanipulation, telles que les pinces optiques.

Par ailleurs, les produits peuvent être extraits des dispositifs microfluidiques après traitements et réactions. De nombreux travaux ont été menés pour adapter les dispositifs aux outils d'analyse traditionnels comme pour la mesure par diffraction de cristaux de protéines [55] ou pour l'introduction d'échantillons dans un spectromètre de masse MALDI-TOF.

### Éléments intégrés au voisinage immédiat des canaux

Une première manière d'intégrer des éléments de détection dans un dispositif microfluidique est de l'intégrer de manière non invasive dans un voisinage immédiat des canaux.

La transparence et la qualité optique du PDMS ont permis la fabrication dans ce matériau d'éléments optiques tels que des miroirs de Bragg [72], des guides d'ondes [73], des lasers [74, 75], des réseaux blazés [76] ou des lentilles à immersion solide [77]. Ainsi, des fibres optiques et des éléments d'optofluidiques peuvent être intégrés au dispositif [78] pour la détection *in situ*.

Le PDMS pouvant être assemblé sur une grande variété de matériaux, les dispositifs hybrides ou semi-hybrides peuvent être fabriqués en modifiant le substrat sur lequel l'élastomère moulé sera assemblé. Ainsi, des éléments de contrôle de température peuvent être intégrés en utilisant un substrat de verre contenant des électrodes passivées, chauffant par effet Joule, ou en utilisant des systèmes plus complexes basés sur les technologies CMOS montés sur silicium. Les assemblages d'élastomères moulés sur substrats en silicium micro-usinés sont nombreux. Nous pouvons citer pour exemple les travaux de Lee *et al.* qui consistent à manipuler des cellules dans une puce hybride CMOS/microfluidique grâce à un réseau de micro-électro-aimants [79]. Pamme *et al.* ont compilé dans une revue complète d'autres utilisations du magnétisme dans le domaine de la microfluidique [80].

### Éléments intégrés dans les canaux

Enfin, il est possible d'intégrer des éléments de détection ou de contrôle au sein même des canaux microfluidiques par simple assemblage. Le premier exemple, et le plus important, est celui de l'assemblage d'élastomères moulés sur des électrodes planes sur un substrat de verre pour la détection électrochimique [81, 82]. Les techniques de mesures sont bien connues : ampérométrie, conductimétrie et potentiométrie. La nature des électrodes est à choisir en fonction de l'utilisation.

L'intégration d'éléments plus exotiques a été examinée comme l'utilisation d'hydrogels permettant un contrôle des canaux par le pH ou la température [83, 84, 85]. De telles intégrations ne sont pas aisées, et les temps de réponse de ces matériaux ne sont aujourd'hui pas assez faibles pour des applications habituelles, mais l'idée reste innovante.

### 1.3 Conclusion

Les techniques de microfabrication sont devenues de plus en plus accessibles au fil des années, mettant à disposition des chercheurs des outils sophistiqués et performants pour développer des systèmes expérimentaux novateurs, leur permettant de poursuivre leurs recherches de manière originale. Parmi ces outils, la lithographie molle offre un développement rapide et aisé de dispositifs avec un large éventail de fonctionnalités. La facilité de son utilisation rend perméable la frontière entre, d'une part, la conception et le développement des microsystèmes destinés à des applications biologiques et, d'autre part, leur exploitation dans un contexte biologique inédit.

C'est dans ce cadre de développement interdisciplinaire que se placent les travaux présentés dans cette thèse. Nous rassemblons des techniques d'analyses électrochimiques et des objets biologiques dans un contexte microfluidique nouveau. La réalisation d'un tel assemblage n'est pas simple, mais elle est rendue possible grâce à la lithographie molle. Nous verrons dans les chapitres suivants les différentes étapes menant à cette réalisation.

## Chapitre 2

# Développement d'une technique d'assemblage réversible

L'assemblage entre les blocs de polymère et leurs substrats constituant les dispositifs en PDMS se fait habituellement après une étape d'activation des surfaces qui permet de créer des liaisons covalentes entre l'élastomère et son substrat. Il en résulte une adhésion étanche résistante aux fortes pressions dans les microcanaux. De cette manière, il n'est pas nécessaire de prendre de précautions particulières lors de la manipulation des dispositifs, aussi bien dans la tenue du montage expérimental que dans les méthodes d'injections. Cependant, un tel assemblage rend difficile l'accès direct à l'intérieur des canaux. Pour remédier à ce problème, il est nécessaire d'éliminer le collage du bloc de PDMS sur son substrat et de se fier seulement à l'adhésion naturelle du PDMS sur son substrat pour pouvoir ensuite désassembler le dispositif après les manipulations. Cette manière de procéder demande beaucoup de précautions dans le montage expérimental et dans le système d'injection : il est d'abord impossible d'appliquer toute surpression importante dans les canaux, et un simple geste déplaçant le matériel connecté au dispositif peut le désassembler. Ces précautions rendent impossibles bon nombre d'expériences en microfluidique. Pour permettre malgré tout l'accès à l'intérieur des canaux, une solution intermédiaire d'activation partielle des surfaces a été envisagée par d'autres équipes. Elle permet de coller certaines parties du dispositif et de désolidariser, par dissection, les parties d'intérêt [86]. Le chapitre qui va suivre expose une technique d'assemblage de dispositif novatrice, permettant d'une part un assemblage réversible et par conséquent l'accès à l'intérieur des canaux, et d'autre part d'assurer une meilleure robustesse du dispositif afin qu'il puisse être utilisé avec le matériel microfluidique habituel et selon les procédures usuelles.

Ce travail a été effectué en étroite collaboration avec Maël Le Berre, doctorant du laboratoire de microfluidique, qui s'est attaché à l'élaboration du modèle physique du phénomène et à sa validation.

**2. Développement d'une technique d'assemblage réversible**

---

<b>2.1</b>	<b>La micro-aspiration : principe et intérêts</b>	<b>41</b>
2.1.1	Principe de la micro-aspiration	41
2.1.2	Comparaison avec d'autres techniques d'assemblage réversible	41
<b>2.2</b>	<b>Description physique du phénomène</b>	<b>42</b>
2.2.1	Modèle physique	42
2.2.2	Expérimentation et simulation	45
<b>2.3</b>	<b>Règles de conception et d'utilisation</b>	<b>49</b>
2.3.1	Géométrie optimale	49
2.3.2	Précautions d'utilisation	50
<b>2.4</b>	<b>Exemple d'un dispositif assemblé par micro-aspiration</b>	<b>52</b>
2.4.1	Chimie de surface à haute résolution	52
2.4.2	<i>Multi-Colour Microcontact Printing</i>	52
<b>2.5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>54</b>

---

## 2.1 La micro-aspiration : principe et intérêts

### 2.1.1 Principe de la micro-aspiration

Cette nouvelle technique d'assemblage réversible d'un dispositif microfluidique repose sur la déformabilité du bloc d'élastomère. Nous introduisons tout simplement des cavités sur les surfaces inutiles du dispositif (figure 2.1), tout autour des canaux, et y appliquons du vide. La déformation locale du bloc d'élastomère va se propager sur l'ensemble de la surface, se traduisant par un effet de ventouse, et plaquant alors le bloc sur son substrat. Nous appelons cette technique : la micro-aspiration.

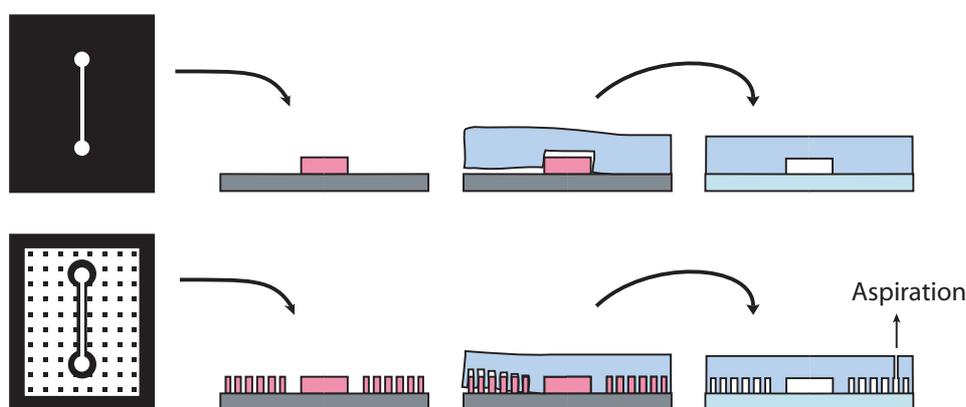


FIG. 2.1 – Comparaison de la fabrication d'un dispositif microfluidique standard (haut) et d'un dispositif microfluidique réversible (bas). La seule différence entre les deux dispositifs réside dans la cavité de micro-aspiration rajoutée permettant de coller de manière réversible un dispositif sur son substrat par effet de ventouse.

L'intégration de cavités pour la micro-aspiration est très simple. Il suffit de rajouter sur le masque de photolithographie utilisé lors de la microfabrication des motifs correspondant à une cavité entourant les canaux microfluidiques. Cette cavité doit contenir des piliers pour éviter que celle-ci ne s'affaisse et qu'elle n'empêche la bonne transmission du vide dans tout le dispositif. Ainsi, dans la cavité entourant le réseau de microcanaux circulera de l'air en dépression, et dans les canaux de travail circuleront des liquides.

### 2.1.2 Comparaison avec d'autres techniques d'assemblage réversible

L'utilisation de la micro-aspiration pour l'assemblage réversible de dispositifs de PDMS présente de sérieux avantages recherchés sur les pratiques d'assemblage mixte (activation partielle des surfaces puis dissection pour obtenir l'accès à l'intérieur des canaux). Ici, l'ensemble du dispositif est relativement robuste et supporte des pressions pouvant atteindre 1 bar dans les meilleurs des cas. Il est donc possible d'injecter des liquides dans les canaux assemblés de cette manière avec les techniques habituelles (*ie.* pousse-seringues, différence de pression hydrostatique, aspiration du liquide par la sortie) sans risque de fuites. Une fois la pression atmosphérique rétablie dans la cavité d'aspiration, il est possible de désassembler le dispositif, d'avoir accès à l'intérieur des canaux et même de réutiliser le bloc d'élastomère.

Une autre méthode d'assemblage réversible, plus robuste que la micro-aspiration, consiste à

placer le dispositif entre deux pièces de matériau solide et à maintenir l'ensemble solidaire par un système de vis ou de pinces. Le dispositif étant constitué en partie d'élastomère, toute fuite est empêchée par la force appliquée par ce système de pincement. Cette technique, appelée *clamping*, est efficace mais peu pratique puisqu'elle nécessite un système dédié de pincement bien souvent volumineux, ainsi qu'un certain travail d'ingénierie pour l'adapter aux systèmes d'observation et de détection standard comme les microscopes. De plus, son utilisation sur des dispositifs contenant les lames fines de microscopie pour effectuer des observations à fort grossissement est risquée à cause de la fragilité du dispositif lui-même. De ce point de vue, la micro-aspiration est plus adaptable que le *clamping*, malgré une robustesse plus faible.

Enfin, évoquons un phénomène secondaire provoqué par la micro-aspiration qui néanmoins lui procure un avantage manifeste sur toutes les autres techniques : le dégazage intrinsèque. En effet, le PDMS est perméable aux gaz [87] et le fait d'appliquer le vide dans la cavité d'aspiration entraîne un appauvrissement en air dans le bloc de PDMS. Ainsi, tout air contenu dans les canaux microfluidiques sera absorbé par les parois en PDMS, ce qui résulte en un dégazage automatique des dispositifs. Cet effet est particulièrement commode puisqu'il élimine la présence de bulles d'air dans les dispositifs microfluidiques, empêche leur formation et rend le remplissage des canaux plus aisé.

## 2.2 Description physique du phénomène

Afin de mieux comprendre le phénomène de micro-aspiration et de prévoir le comportement des dispositifs assemblés de cette manière, nous avons établi un modèle physique simple. Nous avons ensuite confronté ce modèle à la simulation numérique<sup>1</sup> et à des résultats expérimentaux afin de déterminer les conditions optimales d'utilisation. Nous relaterons ici seulement le principe général et les résultats de comparaison entre simulations, modèle physique et expérimentations.

### 2.2.1 Modèle physique

#### Modèle de déformation homogène

Commençons par envisager une cavité dans un bloc de PDMS soutenue par des piliers de hauteur  $h_p$ . Nous allons construire un modèle simple traduisant la déformation des piliers causée par l'application du vide dans la cavité.

De manière générale, la déformation verticale d'un parallélépipède soumis à une pression verticale est régie par la loi de Hooke de la manière suivante :

$$\frac{\Delta h}{h} = \frac{\Delta P}{E} \quad (2.1)$$

Où  $h$  correspond à la hauteur du parallélépipède,  $E$  son module de Young et  $\Delta h$  le déplacement résultant d'une pression  $\Delta P$ .

Les forces appliquées sur un bloc de PDMS soutenu par des piliers résultent de : i) la pression atmosphérique appliquée sur la face supérieure du bloc, ii) la pression du vide appliquée sur la surface libre de la cavité et iii) de la pression appliquée par le substrat sur les piliers. Si  $\alpha$  est le

---

<sup>1</sup>La simulation numérique, réalisée par Maël Le Berre, consiste en une simulation programmée par le couplage des logiciels *MATLAB* et *COMSOL*, utilisant la boîte à outil *Plane Stress* en deux dimensions du module de mécanique structurale du logiciel *COMSOL*.

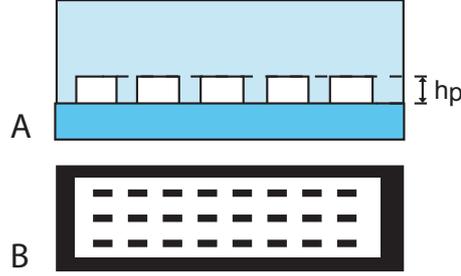


FIG. 2.2 – A. Schéma d'un bloc de PDMS comprenant une cavité de micro-aspiration au niveau de son contact avec son substrat.  $h_p$  est la hauteur des piliers et  $\alpha$  le facteur de remplissage. B. Schéma représentatif du dispositif vu de dessous. En noir est représentée la surface de contact entre le PDMS et le verre. La surface libre définie dans le texte correspond à la surface blanche, et la surface totale de la cavité correspond à la somme de la surface blanche et de la surface des petits carrés noirs correspondant aux piliers

facteur de remplissage du réseau d'aspiration ( $\alpha = \frac{\text{surface libre}}{\text{surface totale de la cavité}}$ , voir figure 2.2),  $P_{vac}$  la pression relative du vide,  $P_{atm}$  la pression atmosphérique et  $P_p$  la pression appliquée sur les piliers dû au contact avec le substrat, à l'équilibre, le bilan des forces appliquées sur le dispositif selon l'axe orthogonal à la face contenant la cavité s'écrit de la manière suivante :

$$\alpha(P_{atm} - P_{vac}) + (1 - \alpha)P_p = P_{atm} \quad (2.2)$$

Nous excluons dans ce modèle les valeurs de  $\alpha$  proches de 1 puisque le comportement du dispositif ne rentre plus dans les hypothèses posées au départ de la déformation d'un parallélépipède. En effet, lorsque  $\alpha$  se rapproche de 1, la surface des piliers est de plus en plus faible et prend le comportement d'une tige qui ne suit pas l'équation 2.1. En pratique, du fait de la déformation du bloc de PDMS, pour des valeurs de  $\alpha$  au-delà de 0,8-0,9 selon la rigidité du PDMS, la cavité de micro-aspiration s'effondre, créant automatiquement des piliers supplémentaires et abaissant par là automatiquement la valeur de  $\alpha$ . Soit, lorsque  $\alpha$  est inférieure à 0,9 :

$$P_p = P_{atm} + \frac{\alpha}{1 - \alpha}P_{vac} \quad (2.3)$$

Lorsque le vide n'est pas appliqué dans le dispositif, ou lorsque la surface libre est nulle ( $\alpha = 0$ ), la pression appliquée sur les piliers correspond à la pression atmosphérique. Ainsi, nous pouvons déduire que la pression supplémentaire  $\Delta P_p$  appliquée sur les piliers lorsque  $P_{vac}$  est appliquée dans la cavité correspond à :

$$\Delta P_p = \frac{\alpha}{1 - \alpha}P_{vac} \quad (2.4)$$

D'où la déformation  $\Delta h$  des piliers de hauteur  $h_p$  due à l'application du vide dans le dispositif :

$$\Delta h = \frac{\alpha \cdot h_p}{(1 - \alpha)E}P_{vac} \quad (2.5)$$

Dans le cas où la cavité couvre la majorité de la surface du dispositif, cette déformation induit un déplacement vertical  $\Delta h$  du bloc entier de PDMS.

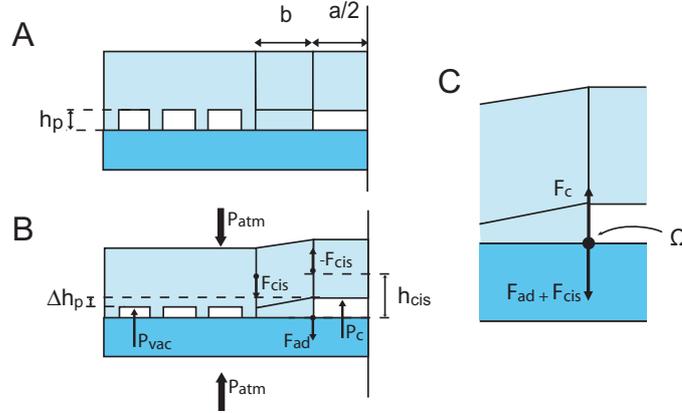


FIG. 2.3 – Modèle d'un dispositif assemblé par micro-aspiration. A : le dispositif au repos. B : une dépression est appliquée dans la cavité de micro-aspiration, entraînant la déformation des piliers. C : à la pression limite, la somme des forces appliquées au point de contact  $\Omega$  entre l'élastomère, le substrat et le liquide dans le canal est nulle.

### Modèle de déformation autour d'un canal

La question à laquelle nous cherchons à répondre avec ce modèle est celle de la pression maximale admissible dans un canal microfluidique lorsqu'il est assemblé par micro-aspiration. C'est la pression au-delà de laquelle l'assemblage n'est plus étanche, où une fuite apparaît dans le dispositif. Nous appellerons cette pression la *pression limite* notée  $P_{lim}$ .

Dans cet état limite, lorsque la *pression limite* est atteinte dans le canal, la contrainte résultant de la pression sur les parois du canal induit une force égale à celle maintenant le dispositif en place. Dans un dispositif microfluidique, trois forces sont exercées au point de contact  $\Omega$  entre l'élastomère, le substrat et le liquide dans le canal :

$F_c$  : La force due à la pression interne du canal, appliquée sur les parois. Nous considérons ici que le canal ne se déforme pas et que la force résultante est transférée sur les flancs du canal.

$F_{ad}$  : La force d'adhésion du PDMS à son substrat.

$F_{cis}$  : La force résultant de la déformation du dispositif due à la micro-aspiration. Cette force correspond au cisaillement du PDMS entre le canal et la cavité de micro-aspiration.

Dans le modèle qui va suivre, nous allons considérer le rapport des forces dans le plan orthogonal à un canal infini. Nous pourrions alors obtenir un premier modèle simple à deux dimensions qui permettra de décrire l'influence de la géométrie du dispositif sur la *pression limite*. Toutes les pressions considérées dans le modèle suivant sont alors des pressions linéiques.

En faisant le bilan des forces appliquées au point de contact  $\Omega$  entre la paroi du canal et le substrat, rapportées à l'axe vertical, nous avons l'égalité des forces :

$$F_{cis} = F_c - F_{ad} \quad (2.6)$$

La force exercée par la pression interne du canal rapportée sur la paroi supérieure s'écrit  $\frac{a \cdot P_{lim}}{2}$ , en posant  $a$  comme la largeur du canal. D'où :

$$P_{lim} = \frac{2}{a}(F_{cis} + F_{ad}) \quad (2.7)$$

La contrainte de cisaillement  $\sigma_{cis}$  sur le parallélépipède isolant le canal de la cavité de micro-aspiration peut être exprimée en fonction de  $G$ , le module de cisaillement du PDMS, et de  $\theta$ , l'angle de cisaillement, de la manière suivante :

$$\frac{\sigma_{cis}}{G} = \theta \quad (2.8)$$

La géométrie du système nous permet d'exprimer  $\theta$  en fonction de l'espacement  $b$  entre le canal et la cavité de micro-aspiration :  $\tan \theta = \frac{\Delta h}{b}$ , ce qui donne, au premier ordre :  $\theta \simeq \frac{\Delta h}{b}$ . D'où, en exprimant le déplacement vertical  $\Delta h$ , obtenu par l'équation 2.5, de la surface libre de la cavité de micro-aspiration en fonction de la pression relative du vide  $P_{vac}$  appliqué :

$$\sigma_{cis} = \frac{G \cdot \alpha \cdot h_p}{b \cdot (1 - \alpha) E} P_{vac} \quad (2.9)$$

Afin d'exprimer la composante  $F_{cis}$  de la force de cisaillement appliquée sur le point de contact  $\Omega$ , il faut définir une hauteur  $h_{cis}$  sur laquelle la force de cisaillement est appliquée :

$$F_{cis} = \frac{G \cdot \alpha \cdot h_p \cdot h_{cis}}{b \cdot (1 - \alpha) E} P_{vac} \quad (2.10)$$

De plus, la hauteur  $h_{cis}$  peut être exprimée dans une première approximation comme une fonction linéaire de  $a$  et de  $b$  (voir Annexe B, page 180), en faisant l'hypothèse qu'elle ne dépend pas de la hauteur des piliers  $h_p$ . Ainsi, nous posons :  $h_{cis} = \beta_a a + \beta_b b$ , avec  $\beta_a$  et  $\beta_b$  des facteurs sans dimension. Cette relation traduit l'invariance des déformations mécaniques pour un rapport d'aspect donné. Nous déduisons alors une expression simple de la *pression limite* :

$$P_{lim} = \frac{2}{a} F_{ad} + \frac{G \cdot \alpha \cdot h_p}{(1 - \alpha) E} \frac{\beta_a a + \beta_b b}{a \cdot b} P_{vac} \quad (2.11)$$

### 2.2.2 Expérimentation et simulation

Le modèle proposé précédemment nous permet d'établir *a priori* des liens simples entre les paramètres géométriques du dispositif et la pression limite. Nous allons, dans ce paragraphe, montrer la pertinence et les limites du modèle établi en le confrontant aux résultats d'expérimentations et de simulations.

#### Expérimentation

##### *Déformation des piliers*

Confrontons dans un premier temps le modèle de déformation des piliers présenté précédemment aux mesures expérimentales reliant la déformation  $\Delta h$  d'un bloc de PDMS et la pression relative du vide  $P_{vac}$  dans la cavité de micro-aspiration selon l'équation 2.5.

La figure 2.4 illustre le montage expérimental utilisé. Nous avons mesuré le déplacement net de la surface d'un bloc de PDMS contenant une cavité de micro-aspiration en fonction du vide relatif appliqué dans cette dernière. Pour cela, nous avons créé une cavité d'interférence de Fabry-Pérot entre le bloc de PDMS recouvert d'une fine épaisseur d'or et un miroir semi-réfléchissant

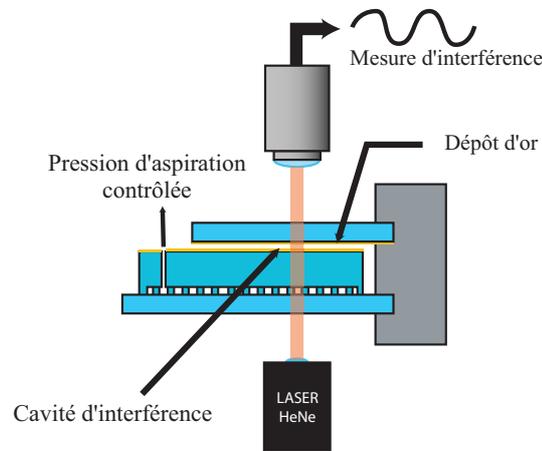


FIG. 2.4 – Montage expérimental de mesure par interférométrie du déplacement du dispositif en fonction de la pression du vide appliquée dans la cavité de micro-aspiration. La cavité d'interférométrie est formée par la face inférieure du miroir semi-réfléchissant et la face supérieure du dispositif sur laquelle a été déposée une fine couche d'or. La variation du vide relatif dans la cavité de micro-aspiration fait varier la hauteur du dispositif et par conséquent l'épaisseur de la cavité d'interférence. Les variations de la figure d'interférence qui en résultent sont analysées ensuite numériquement.

placé au-dessus. Un faisceau laser a été positionné à l'orthogonal de la cavité d'interférence et la figure d'interférence résultante a été enregistrée grâce à une caméra montée sur le microscope. En diminuant la pression dans le réseau, l'intensité du faisceau traversant la cavité varie périodiquement. Cette variation peut être corrélée à la variation de la taille de la cavité d'interférence qui est directement liée au déplacement du dispositif.

Le déplacement de la surface du dispositif en fonction du vide relatif dans la cavité de micro-aspiration paraît linéaire (ronds bleus dans la figure 2.5 A). Le résultat corrobore le modèle et donne une valeur du module de Young  $E$  de 7,4 Bar, proche de la valeur théorique de 7,5 Bar relevée dans la littérature, pour le PDMS 1 : 10 [88].

### *Mesures de la pression limite*

Pour valider l'expression de la *pression limite* linéique donnée par l'équation 2.11, nous avons effectué des mesures expérimentales de la *pression limite* admissible dans un canal en fonction de la pression relative du vide appliqué dans la cavité de micro-aspiration et des paramètres géométriques  $a$  et  $b$ , respectivement la largeur du canal et de l'anneau de garde. Nous avons utilisé pour cette étude un simple canal de différentes largeurs  $a$  entouré par un anneau de garde de différentes largeurs  $b$  et d'une cavité de micro-aspiration dont le facteur de remplissage a été fixé à  $\alpha = 75\%$ . L'ensemble des structures a une hauteur de  $20 \mu\text{m}$ . Des cavités supplémentaires ont été rajoutées à la verticale des accès fluidiques des canaux en apposant un bloc d'élastomère structuré sur le dispositif initial. Cette précaution permet d'isoler le dispositif des contraintes mécaniques provoquées par l'insertion de tubes métalliques nécessaires aux connexions fluidiques et de ne pas prendre en compte ces contraintes supplémentaires dans les mesures. Le détail de cette précaution sera présenté dans le paragraphe 2.3.2.

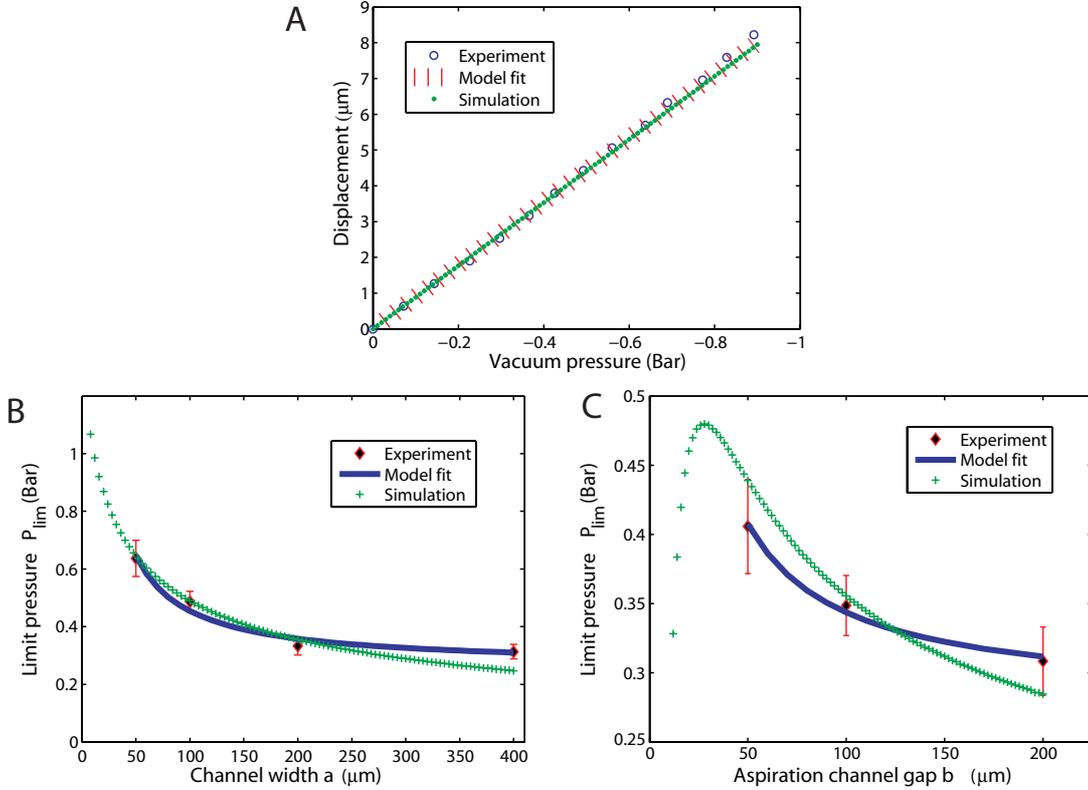


FIG. 2.5 – Confrontation entre les mesures expérimentales, le modèle et la simulation. A. Déplacement de la surface d'un dispositif assemblé par micro-aspiration en fonction du vide relatif appliqué. B. *Pression limite* en fonction de la largeur  $a$  du canal. C. *Pression limite* en fonction de la largeur  $b$  de l'anneau de garde.

Il est difficile de déterminer précisément la force native  $F_{ad}$  d'adhésion du PDMS au verre car elle varie fortement avec l'état de surface des deux substrats au moment de l'assemblage. Du point de vue expérimental, la pression limite de décollement d'un dispositif posé sur un substrat de verre est très variable, même après de strictes précautions de nettoyage. Les mesures de la *pression limite* pour un dispositif de micro-aspiration tout simplement posé sur son substrat, sans aucun vide relatif appliqué dans la cavité de micro-aspiration, donnent une pression limite moyenne de décollement de  $264 \text{ mBar}$ , correspondant à  $F_{ad} = 1,32 \text{ N.m}^{-1}$ .

Ensuite, la variation de la *pression limite* en fonction de la pression relative du vide appliqué dans la cavité de micro-aspiration a été mesurée pour différentes valeurs de  $a$  et de  $b$ , permettant d'identifier des différents facteurs du modèle :  $G.\beta_a$  et  $G.\beta_b$ . Les figures 2.5 B et C illustrent ces mesures, en bonne concordance par rapport aux prédictions du modèle physique.

## Simulation

A partir du module de Young  $E$  et de la valeur de la force d'adhésion du PDMS sur le substrat  $F_{ad}$  obtenus à travers les mesures expérimentales, nous avons effectué une simulation sur la déformation du bloc de PDMS. Ces simulations nous donnent facilement accès à l'influence de

l'ensemble des paramètres du dispositif sur la déformation du bloc de PDMS et nous permettent de déterminer une géométrie optimale pour la conception de dispositifs assemblés par micro-aspiration, ce qui serait inenvisageable par l'expérience. Nous avons effectué ces simulations en deux dimensions pour simplifier les géométries et diminuer les temps de calcul.

### *Calculs de la pression limite*

A partir des résultats expérimentaux, nous avons estimé la valeur maximale des contraintes que les flancs du canal peuvent supporter avant de briser le contact entre le PDMS et le verre, dans le cas d'un dispositif de micro-aspiration sans vide appliqué. Nous supposons ici que cette valeur est une traduction de la limite de la force native d'adhésion  $F_{ad}$  du PDMS sur le verre, dans le cas précis de l'expérimentation et nous faisons l'hypothèse que cette valeur reste la même quels que soient les paramètres du système. Malgré sa forte approximation, cette hypothèse nous permet de traduire la notion de *pression limite* en une équation simple.

A la limite du décollement du dispositif, dans le cas correspondant aux mesures expérimentales effectuées pour obtenir  $F_{ad}$ , la simulation nous donne une valeur pour la contrainte verticale sur le bord du canal de  $13,2 \text{ kPa}$  dans les conditions de la simulation. La *pression limite* sera alors définie comme la pression dans le canal nécessaire pour atteindre cette valeur de contrainte limite. Cette valeur de contrainte maximale que peut supporter un dispositif dépend de la manière de modéliser le contact et ne peut en aucun cas être confondue avec la valeur réelle de la force d'adhésion entre le PDMS et le verre qui pourraient être mesurée.

La figure 2.5 A propose une comparaison de la variation du déplacement de surface du dispositif en fonction du vide relatif dans la cavité de micro-aspiration obtenue par la simulation avec celle obtenue avec les résultats expérimentaux ainsi que par le modèle. La bonne concordance entre ces courbes conforte la pertinence de la simulation.

### *Concordance avec les résultats expérimentaux et le modèle*

Les figures 2.5 B et C montrent que les variations de la *pression limite* en fonction des paramètres géométriques  $a$  et  $b$  du dispositif obtenues par la simulation sont en bonne concordance avec les résultats expérimentaux. Des décalages peuvent être néanmoins observés, notamment pour les variations de  $P_{lim}$  pour les faibles valeurs de  $b$ , l'épaisseur de l'anneau de garde. Il sera nécessaire d'obtenir des valeurs expérimentales supplémentaires pour confirmer ces tendances qui paraissent justifiées dans la mesure où la surface d'adhésion du PDMS sur son substrat diminue avec  $b$ .

Une simulation supplémentaire des contraintes de cisaillement dans le bloc de PDMS aux alentours du canal et de l'anneau de garde confirme la relation de linéarité entre la hauteur  $h_{cis}$  sur laquelle la force de cisaillement est appliquée pour plaquer le dispositif sur son substrat et les paramètres  $a$  et  $b$ , ainsi que l'indépendance de cette hauteur  $h_{cis}$  par rapport à la hauteur du canal et de la cavité de micro-aspiration.

Ces simulations nous ont permis de plus d'étudier l'influence de paramètres supplémentaires tels que le facteur de remplissage  $\alpha$ , la hauteur des structures  $h_p$  ou l'épaisseur du bloc de PDMS. Ces différentes considérations nous ont permis de déterminer une géométrie optimale pour la conception des dispositifs assemblés par micro-aspiration.

## 2.3 Règles de conception et d'utilisation

Grâce aux réflexions autour du phénomène physique de la micro-aspiration, du modèle, des simulations et des études expérimentales, nous formulons quelques règles ou recommandations pour la conception et l'utilisation de dispositifs assemblés par micro-aspiration.

### 2.3.1 Géométrie optimale

Lors de la conception de dispositifs microfluidiques, les dimensions des canaux sont bien souvent déterminées *a priori* par l'objet des expériences. Ainsi, en reprenant nos paramètres de la simulation, la largeur  $a$  du canal et la hauteur  $h$  des structures seront dès le départ imposées. Pour ajouter la composante de micro-aspiration au dispositif, il faut alors définir les formes de la cavité de micro-aspiration ainsi que sa distance  $b$  aux canaux optimums.

#### Cavité de micro-aspiration

En ce qui concerne la cavité de micro-aspiration, les simulations, dont les détails se trouvent dans l'annexe B.3 page 179, montrent que le paramètre déterminant est son facteur de remplissage  $\alpha$ . Il doit être maximal tout en assurant le non-affaissement de la cavité. Pour l'utilisation quotidienne au laboratoire, les piliers sont carrés et séparés d'une distance égale à leur côté. La taille des piliers est ensuite contrainte par la hauteur de la cavité. Un rapport d'aspect d'environ 10 ne doit pas être dépassé pour la cavité elle-même, pour une hauteur de canaux de  $10\ \mu\text{m}$  et des piliers de  $100\ \mu\text{m}$  de large par exemple, les piliers seront espacés d'au plus  $100\ \mu\text{m}$ . Nous travaillons donc avec un facteur de remplissage  $\alpha = 75\%$ . Une étude complémentaire sur les formes et dispositions idéales des piliers permettrait d'améliorer les performances intrinsèques des cavités de micro-aspiration.

#### Épaisseur de l'anneau de garde

En ce qui concerne la distance  $b$  entre les canaux et la cavité de micro-aspiration, nous avons choisi de traiter le problème en raisonnant avec les rapports d'aspects caractéristiques du dispositif. Ce choix est justifié par le fait que les déformations élastiques soient invariantes suivant l'échelle. Ceci nous permet de n'utiliser comme paramètres indépendants que les rapports géométriques adimensionnels  $\frac{h}{a}$  et  $\frac{h}{b}$  pour traduire le comportement d'un dispositif assemblé par micro-aspiration. Les résultats de simulations disponibles dans l'annexe B.3 page 179 suggèrent qu'il existe un rapport d'aspect optimal, entre cette distance  $b$  et la hauteur des structures  $h$  quelle que soit la largeur des canaux, égal à  $\frac{h}{b} = 0,75$ . La simulation indique également que plus le rapport d'aspect  $\frac{h}{a}$  du canal lui-même est grand, plus la *pression limite* sera grande.

#### Considérations sur des améliorations possibles

Une limite à la réalisation d'un dispositif assemblé par micro-aspiration efficace est l'amplitude de la déformation de la cavité de micro-aspiration. Celle-ci est directement proportionnelle à la hauteur des piliers (équation 2.5), qui est elle-même définie identique à celle des canaux. Ce choix est d'ordre pratique puisqu'il est plus aisé de fabriquer ainsi les dispositifs.

Dans le cas où les géométries sont particulièrement défavorables à l'assemblage par micro-aspiration, ou tout simplement à la fabrication des dispositifs, il est possible d'augmenter la

hauteur de la cavité de micro-aspiration sans avoir à changer la géométrie des canaux. Pour cela, nous pouvons soit fabriquer des structures à plusieurs niveaux, ou plus simplement superposer à un dispositif habituel un deuxième dispositif ne contenant cette fois que la cavité de micro-aspiration (figure 2.6). De cette manière, en revenant sur le modèle physique (équation 2.11), nous agissons sur le terme  $h_p$  de la hauteur des piliers soutenant la cavité de micro-aspiration.

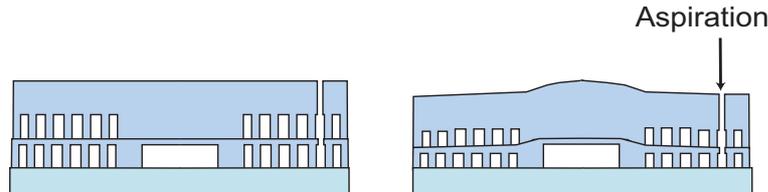


FIG. 2.6 – Principe d'un dispositif microfluidique réversible à deux couches, dans le but d'augmenter la pression appliquée sur les piliers, pour *in fine* augmenter la *pression limite*.

### 2.3.2 Précautions d'utilisation

Quoiqu'efficace, l'assemblage des dispositifs par micro-aspiration nécessite des précautions de conception et de manipulation pour être réellement pratique et efficace à l'utilisation. En effet, malgré les valeurs relativement élevées de la *pression limite* théoriquement admissible dans les canaux assemblés par micro-aspiration, il existe de nombreuses sources d'échec liées aussi bien à la fabrication du dispositif qu'à sa manipulation.

#### Préparation des surfaces

Tout d'abord, et peut-être de toute évidence, les surfaces du bloc de PDMS et du substrat doivent être parfaitement propres. En effet, le moindre défaut dans la fabrication ou la moindre poussière au niveau de l'anneau de garde abaisse fortement la valeur de la *pression limite*. La première précaution à prendre intervient dès les étapes de fabrication. La vérification de la qualité du moule servant à fabriquer les blocs de PDMS est cruciale. Les moulages et démoulages successifs entraînent fréquemment des fissures au niveau des structures bien souvent négligées à cause de la complexité du moule. Une attention particulière au niveau des canaux lors de la vérification des moules permettra d'éviter des défauts dans le dispositif final.

Au niveau des surfaces, outre la nécessité de leur propreté, l'état de surface du bloc de PDMS et du substrat en verre joue un rôle important dans l'efficacité de l'assemblage. Comme évoqué dans les paragraphes précédents, la force native d'adhésion du PDMS sur le verre,  $F_{ad}$ , dépend grandement de la géométrie de contact et de l'état de surface. C'est d'ailleurs en activant les surfaces du PDMS et du verre avec un plasma que nous assemblons traditionnellement des dispositifs : des liaisons covalentes se créent entre le PDMS et le verre, augmentant  $F_{ad}$  de plusieurs ordres de grandeur. Dans notre cas, avec un nettoyage systématique des surfaces ou un traitement particulier de celles-ci, nous pouvons augmenter la force d'adhésion du PDMS sur le verre et par là améliorer l'efficacité de l'assemblage par micro-aspiration. Cela peut se faire par un traitement du substrat pour le rendre hydrophobe, augmentant ainsi les interactions van der Waals entre le PDMS et le substrat, et donc  $F_{ad}$ . Dans le cas contraire, cette adhésion native du PDMS peut aussi être diminuée par certaines pollutions des surfaces. C'est notamment le cas lorsque le substrat a été en contact avec une solution contenant des molécules susceptibles de se

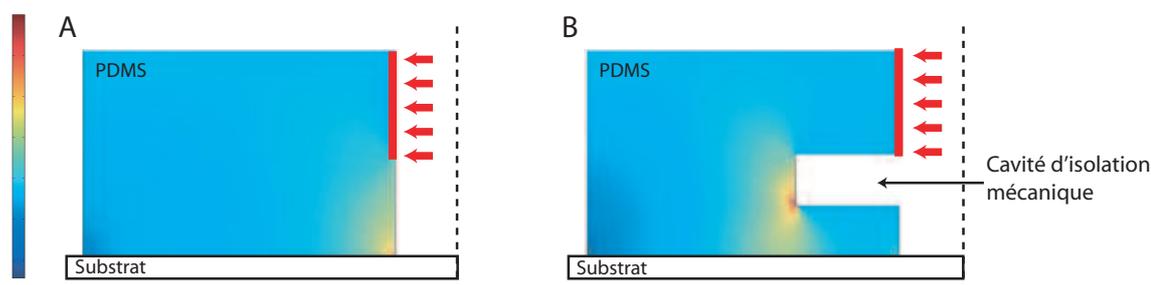


FIG. 2.7 – Simulation numérique des contraintes dans un demi bloc de PDMS lorsqu’une pression latérale est appliquée dans un accès fluide, ce qui se passe lors de l’introduction d’un tube de connexion fluide. Cette vue est une vue de coupe verticale, à partir de la paroi d’un accès fluide. La ligne rouge correspond à la partie subissant une pression latérale directe (représentée par les flèches). Dans un dispositif traditionnel où la connexion fluide se fait par un conduit cylindrique dans l’élastomère (A), la pression due à l’insertion de tubes est directement transmise au point de contact triple. Une cavité intermédiaire (B) permet de répartir la pression sur une surface plus grande, réduisant alors les contraintes causées par l’insertion de tubes aux accès fluidiques. L’échelle indique les valeurs fortes de contrainte positives en rouge, les valeurs fortes de contrainte négative en bleu marine et les valeurs neutre en vert.

déposer sur celui-ci. C’est pourquoi il n’est pas souhaitable de réutiliser un dispositif ayant déjà perdu son étanchéité sans nettoyage préalable des surfaces.

### Gestion des contacts

L’interface entre les canaux microfluidiques et l’utilisateur est souvent omise lors des descriptions physiques des systèmes. Le modèle physique et les simulations présentés dans le deuxième paragraphe de ce chapitre ne prennent effectivement pas en compte les déformations possibles du dispositif dues à l’action de l’utilisateur. Ces déformations sont nombreuses, et tout particulièrement au niveau des entrées et sorties des canaux. En effet, l’accès aux canaux microfluidiques se fait souvent par l’insertion de tubes dans les entrées et sorties fluidiques afin d’y injecter ou de collecter les liquides. La déformation du bloc de PDMS autour des tubes est d’ailleurs une cause importante de fuites (figure 2.7 A). Cependant cette déformation entraîne inévitablement de fortes contraintes sur l’anneau de garde au niveau des entrées ou sorties des canaux microfluidiques. Ceci rend l’utilisation des dispositifs microfluidiques assemblés par micro-aspiration particulièrement délicate. Une parade à ces contraintes indésirables est de découpler la déformation du bloc de PDMS par l’utilisateur de celle des anneaux de garde. Pour cela, nous réalisons un dispositif de micro-aspiration de fine épaisseur sur lequel est collé un bloc de PDMS contenant une cavité d’isolation mécanique aux endroits correspondants aux points d’accès du premier dispositif. Ainsi, en insérant un tube dans la partie supérieure du bloc de PDMS, seule la paroi supérieure de la cavité subira directement les contraintes dues à l’utilisateur. De cette manière, les contraintes de la déformation mécanique sont réparties sur une plus grande aire et notamment en deçà des points d’accès aux canaux (figure 2.7 B). La partie inférieure correspondant au dispositif de micro-aspiration subira alors dans une moindre mesure les perturbations liées à l’utilisateur.

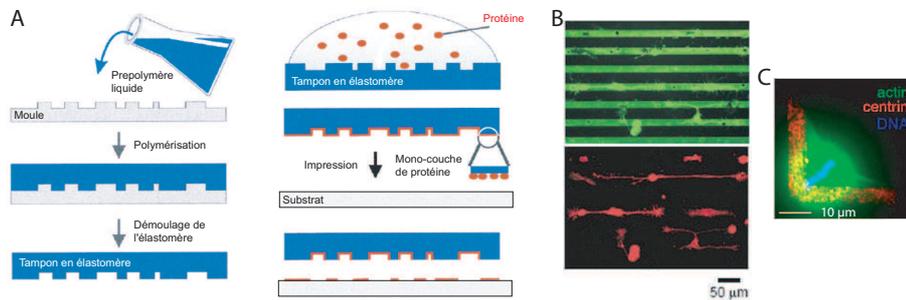


FIG. 2.8 – Principe et utilisations du Microcontact Printing, adapté de [90, 91, 92]. A. Schématisation de la fabrication d'un tampon par lithographie molle, ainsi que de son encre et du transfert de protéines. B. Croissance guidées d'axones (rouge) sur les rails de Laminine (vert). C. Contrôle de l'axe mitotique par un motif de Fibronectine en forme de « L » (rouge).

## 2.4 Exemple d'un dispositif assemblé par micro-aspiration

### 2.4.1 Chimie de surface à haute résolution

La microfluidique permet de gérer les petits volumes de fluide dans des milieux confinés et contrôlés. Cependant, un des inconvénients majeurs résultant des techniques d'assemblage habituels de la microfluidique est la difficulté d'accès à l'intérieur des microcanaux. En effet, une réaction mettant en jeu quelques picolitres de réactifs rares perd de son intérêt si le produit, en très faible quantité, qui en résulte devait être ensuite dilué pour rentrer dans le processus habituel d'analyses. La solution idéale serait de ne jamais interrompre la chaîne microfluidique et d'effectuer les analyses in-situ. Cependant, les développements des dispositifs microfluidiques intégrés ne permettent pas aujourd'hui d'effectuer de telles opérations.

Un dispositif assemblé par micro-aspiration ne constitue pas toujours une solution idéale pour le développement d'outils microfluidiques complexes dans la mesure où sa mise en œuvre requiert une certaine expérience dans leur manipulation. Il est cependant une composante pratique pour l'intégration d'une étape microfluidique dans une série d'expériences. Prenons pour exemple la modification de l'état de surface des canaux microfluidiques. Jusqu'à présent, les expériences sur ces surfaces modifiées étaient effectuées soit directement à l'intérieur des canaux, soit à l'extérieur, après un processus fastidieux de dissection du dispositif [89]. Ce qu'apporte la micro-aspiration ici est l'accès à la surface modifiée en désassemblant le dispositif et en utilisant le substrat modifié pour les expériences ultérieures.

### 2.4.2 Multi-Colour Microcontact Printing

Une application de l'exemple cité dans le paragraphe précédent est d'utiliser un dispositif microfluidique assemblé par micro-aspiration pour déposer des molécules biologiques de manière sélective sur la surface d'un substrat qui servira ensuite de tampon.

Le microcontact printing,  $\mu$ CP, est une technique très répandue d'impression de motifs de petite taille par contact conforme entre le substrat et le tampon en élastomère [93]. L'encre utilisée pour cette technique peut contenir différents types de molécules (silanes, protéines, particules), et une des nombreuses applications de cette technique est la fabrication de substrats de culture contenant des motifs en protéines [94, 95].

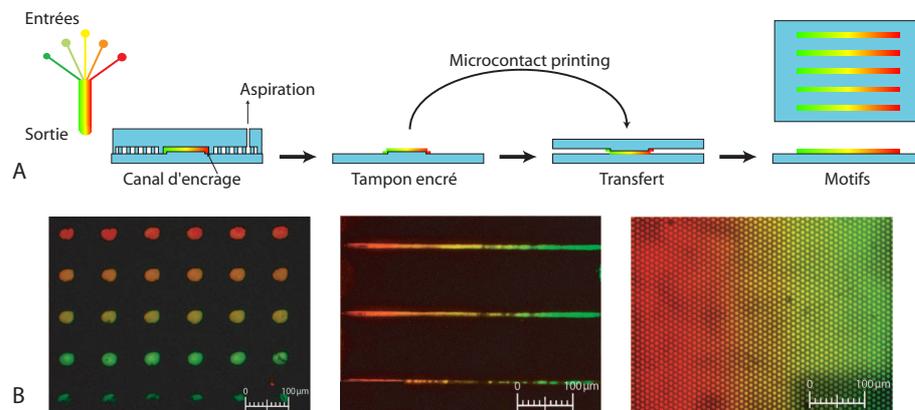


FIG. 2.9 – Multi-Colour Microcontact Printing. A. Principe d'encre par microcanaux et transfert. B. Exemples de motifs utilisés, de gauche à droite, des points de  $20\ \mu\text{m}$  de diamètre, des lignes de  $1\ \mu\text{m}$  d'épaisseur et de  $500\ \mu\text{m}$  de largeur et un réseau de points de  $3\ \mu\text{m}$  de diamètre. Les protéines utilisées pour réaliser le gradient sont la BSA fonctionnalisées par des fluorophores rouge (Cy3) et vert (FITC). Adapté de [96]

Le principe du  $\mu\text{CP}$  est illustré dans la figure 2.8. Le tampon est fait d'élastomère, souvent de PDMS. Celui-ci est structuré par la lithographie molle pour réaliser des motifs en sa surface. Après immersion dans un liquide contenant les molécules à déposer, le tampon est séché et mis au contact avec le substrat afin que les molécules puissent y être transférées. Enfin, le substrat est rincé pour ne garder en sa surface qu'une couche monoassemblée des molécules d'encre.

Dans notre cas, en assemblant de manière réversible des canaux microfluidiques sur les structures correspondant aux motifs, les volumes de liquide irriguant les tampons sont confinés dans des emplacements bien définis. Nous pouvons ainsi utiliser les outils de la microfluidique pour contrôler l'échelle spatiale des variations dans la composition de la solution d'encre. Les différents mélanges de protéines contenues dans le volume se déposent dans les mêmes proportions sur le tampon.

Nous avons de cette manière créé sur une distance de  $500\ \mu\text{m}$  un gradient de concentration en protéines dans le volume irriguant différents motifs (figure 2.9). Ce gradient en volume se répercute sur les proportions surfaciques de protéines déposées sur le tampon. Nous avons utilisé comme solution d'encre un mélange d'une même protéine, la BSA-albumine de sérum bovin, fonctionnalisée avec deux marqueurs fluorescents différents, représentés dans les figures par les couleurs rouge (Cy3) et vert (FITC). Une variation des proportions sur la largeur du microcanal a été établie, passant d'un côté du canal avec 100% de BSA-Cy3 à l'autre côté avec 100% de BSA-FITC. Une superposition des images par fluorescence a permis de mettre en évidence cette variation des proportions avec des teintes intermédiaires dans les parties centrales du canal. Les tampons ont ensuite été utilisés pour transférer ces mélanges de protéines sur un substrat de verre selon des motifs variés, comme des réseaux de points de  $3$  et  $20\ \mu\text{m}$  de diamètre ou des lignes de  $1\ \mu\text{m}$  d'épaisseur et  $500\ \mu\text{m}$  de largeur. De tels motifs présentant des variations dans la nature des protéines déposées sur des échelles de quelques centaines de micromètres ont une réelle signification biologique, mimant les variations de facteur à la surface des tissus. Seule la microfluidique permet de réaliser une telle décoration des surfaces, et la micro-aspiration offre un cadre expérimental pratique pour le faire.

## 2.5 Conclusion

Avec cette nouvelle technique d'assemblage réversible de dispositifs élastomériques, il est désormais possible d'envisager des expérimentations utilisant la microfluidique comme une simple étape. Chaque partie du dispositif peut alors être modifiée, réutilisée, ou assemblée à d'autres entités : le dispositif microfluidique n'est plus une unité irréductible.

L'avantage apporté par la technique d'assemblage réversible par micro-aspiration est, dans le cas d'une plate-forme intégrée de mesures électrochimiques sur cellules, essentiel. Envisager d'effectuer simultanément les manipulations de cellules, leur activation et les mesures électrochimiques dans des puces microfluidiques dans un premier essai est voué à l'échec. Chaque fonctionnalité d'un tel dispositif intégré est complexe et nécessite un grand travail d'adaptation et de compréhension. Le fait de pouvoir assembler et désassembler les dispositifs nous libère des considérations liées aux difficultés de couplage. La nécessité d'adapter le design du dispositif pour une réutilisation éventuelle des électrodes, difficiles à fabriquer, disparaît. Les problématiques de nettoyage des dispositifs pollués par l'accumulation de déchets biologiques n'a plus lieu d'être. Chaque élément expérimental, les électrodes, les pièges à cellule, le maintien des cellules dans un environnement stable et biologiquement viable, peut alors être traité de manière indépendante, sans le souci de recherche d'un dispositif idéal qui résoudra tous les problèmes simultanément.

Cet éclatement d'une problématique générale en unités plus simples est primordial dans la gestion du projet en son ensemble et a été un facteur essentiel à son démarrage. Comme souvent, redéfinir les problématiques pour les résoudre à différentes échelles apporte de la flexibilité dans le raisonnement. C'est que permet notre technique d'assemblage réversible par micro-aspiration.

## Chapitre 3

# Positionnement et gestion de flux dans un dispositif microfluidique

Les expérimentations de mesures électrochimiques sur des objets biologiques de taille caractéristique de l'ordre de la dizaine de microns se prêtent parfaitement à l'environnement microfluidique. En effet, grâce à la microfluidique, nous pouvons désormais imaginer contrôler des paramètres spatiaux-temporels jusqu'alors dépendants des montages expérimentaux. L'emplacement relatif des objets peut être prédéfini, les changements des milieux peuvent être nombreux et contrôlés dans le temps, et, moyennant une électronique adéquate, l'adressage potentiométrique des mesures peut être variable dans la nature et dans l'espace.

Dans ce chapitre, nous présentons un dispositif microfluidique destiné à accueillir les fonctionnalités d'analyses électrochimiques que nous décrirons dans la troisième partie de cette thèse. Nous traiterons dans un premier temps de la problématique toute microfluidique du positionnement et de la manipulation des objets biologiques. Les objets de mesure doivent être dans un premier temps positionnés précisément dans le dispositif microfluidique. Ces positions correspondent aux chambres de mesure qui donneront lieux ultérieurement à des mesures électrochimiques. Ainsi, le contrôle du milieu fluide de ces chambres nécessite une attention particulière : l'irrigation continue de liquides nécessaires à la survie ou à la stimulation des objets biologiques dans ces chambres doit aller de pair avec une stabilité des liquides au moment des mesures. Cette dernière particularité de l'expérimentation fera l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

**3. Positionnement d'objets et gestion de flux dans un dispositif microfluidique**

---

<b>3.1</b>	<b>Un dispositif pour piéger des cellules</b>	<b>57</b>
3.1.1	Piégeage de cellules	57
3.1.2	Pièges pour cellules dans un dispositif destiné à des mesures électrochimiques	58
3.1.3	Simulation et visualisation des lignes de courant	61
<b>3.2</b>	<b>Gestion du milieu fluide des pièges</b>	<b>62</b>
3.2.1	Le principe des chambres de mesure	62
3.2.2	Renouvellement du milieu des chambres de mesure	63
3.2.3	Estimation du temps de renouvellement	64
<b>3.3</b>	<b>Conclusion</b>	<b>66</b>

---

## 3.1 Un dispositif pour piéger des cellules

Considérons dans un premier temps le positionnement de cellules dans un dispositif microfluidique. Cette étape est la première d'une longue série d'expériences menant *in fine* à des mesures sur cellules. Elle se doit donc d'être simple et efficace, afin d'éviter de rendre l'ensemble de l'expérimentation irréalisable.

### 3.1.1 Piégeage de cellules

De nombreuses techniques ont été développées pour positionner des cellules dans un microsystème. Nous pouvons en distinguer deux grandes catégories, le positionnement actif et le positionnement passif.

Dans le cas du positionnement actif, les objets sont suivis par microscopie. L'utilisateur immobilise sa cible au moment et à l'emplacement voulus par le biais de divers actionneurs diélectrophorétiques [97], fluidiques [98, 99, 100], optiques [84, 101] ou électromagnétiques [102, 79, 103] parmi d'autres. Dans certains cas, les pièges peuvent être eux-mêmes contrôlés, déplacés, comme lors de l'utilisation de pinces optiques [84], et de nombreuses opérations peuvent avoir lieu, comme pour la « chirurgies à l'échelle nanométrique » [104]. Ces systèmes polyvalents permettent une manipulation extrêmement précise et adaptable à chaque expérimentation. Ils s'accompagnent invariablement d'une observation et d'un contrôle constants de l'utilisateur. Ces systèmes sont dédiés soit à une sélection spécifique des objets où la suite des mesures est routinière et automatisée, mais dont le montage est peu flexible, soit à des problématiques nécessitant une gestion des opérations au cas par cas. Ces systèmes sont peu adaptés aux questions nécessitant une réponse statistique puisque leur mise en œuvre ne peut être automatisée.

Dans le cas contraire, pour le positionnement passif, l'intervention de l'utilisateur est minimale et l'immobilisation des cellules est automatique, systématique et donc parallélisable. Les pièges en eux-mêmes peuvent être de plusieurs natures : chimique [40, 105, 106], électromagnétique [107, 108], acoustique [109] ou encore dépendante de la structure du dispositif. La dernière catégorie de pièges nous intéresse plus particulièrement puisque c'est elle qui procure la plus grande facilité de fabrication et d'utilisation, une fois la phase de développement passée. Les premiers exemples de positionnement cellulaire dans les puces microfluidiques sont basés sur la sédimentation des cellules au-dessus de structures implémentées au fond du canal pour former un réseau de puits. Le surplus de cellules est ensuite chassé par le flux qui ne perturbe pas le milieu fluide des puits. Ce type de dispositif a été particulièrement utilisé pour les dispositifs de criblage par fluorimétrie [110, 111]. Enfin, le dernier grand type de pièges est basé sur le principe de barrage ou de filtre. Ces dispositifs contiennent des structures placées en travers du flux de cellules, bloquant dans ces pièges ainsi formés un nombre de cellules déterminé [112, 113, 114].

La classification des dispositifs de positionnement cellulaire évoquée dans ce paragraphe est loin d'être exhaustive. Chacun de ces dispositifs a été développé pour une application particulière, dans un environnement de laboratoire particulier. La flexibilité dans la conception des dispositifs microfluidiques permet de tirer parti au maximum du potentiel à notre disposition, que ce soit en logistique ou en expertise. Pour cela, une imagination au-delà des repères est souvent nécessaire.

### 3.1.2 Pièges pour cellules dans un dispositif destiné à des mesures électrochimiques

Dans le cas d'un dispositif de positionnement cellulaire destiné à être intégré dans un dispositif final de mesures électrochimiques sur cellules, l'environnement fluide des chambres de mesure doit être particulièrement stable. En effet, aucun flux résiduel ne doit perturber ni la mesure ni l'objet de mesure. D'une part, les signaux mesurés étant particulièrement faibles, la stabilité de l'environnement de mesure assurera le minimum de perte des signaux. D'autre part, les cellules étant elles-mêmes des objets fragiles et sensibles à leur environnement, la moindre instabilité pourrait constituer un stress supplémentaire.

#### Configuration en cul-de-sac

Pour assurer une telle stabilité de milieu dans les pièges, nous avons envisagé une configuration dans laquelle, une fois les cellules piégées, le flux dans les pièges seraient réduits au minimum. Cela est possible en utilisant les chambres de mesure elles-mêmes comme pièges, et en utilisant les objets une fois piégés comme bouchon empêchant tout flux. Ce concept a été récemment utilisé par Tan *et al.* pour réaliser un travail très intéressant sur l'immobilisation et la libération sélective de billes dans un réseau de pièges [115]. La configuration que nous exposons pour le piégeage des cellules est similaire à leur piège à billes, mais les géométries que nous avons choisies sont contraintes par des considérations pratiques que nous expliciterons dans la deuxième partie de ce chapitre, liées à l'utilisation de nos pièges comme chambre de mesure électrochimique.

Considérons un canal présentant un rétrécissement de telle sorte que les cellules d'intérêt soient bloquées. La présence d'une ou plusieurs cellules bloquées en amont de ce rétrécissement diminue grandement le flux à travers le piège. En ajoutant en entrée du piège des canaux de délestage, une fois les pièges remplis, le flux principal sera donc dévié à travers ces derniers (figure 3.1).

De par son caractère clos, cette configuration convient particulièrement à l'intégration dans une plate-forme microfluidique d'analyse électrochimique de cellules. En effet, une fois piégées, les cellules ne seront plus perturbées par les flux. Il suffit ensuite de les maintenir en vie et de les activer en faisant diffuser dans les chambres les produits nécessaires avant d'effectuer nos mesures.

Nous avons réalisé la simulation numérique par éléments finis des flux traversant une telle configuration de microcanaux avec le logiciel *COMSOL* en utilisant l'outil correspondant à la dynamique des fluides, avec l'équation de Navier-Stokes pour un fluide incompressible, en deux dimensions. La figure 3.1 résume les résultats de la simulation, correspondant à la configuration en cul-de-sac additionnée d'un canal de délestage. La diminution de vitesse, due à l'ajout d'un obstacle devant le rétrécissement, est de 26 fois. Le canal de délestage absorbe la différence de débit. Il existe une relation de proportionnalité, donnée par les rapports de résistances fluidiques, entre la vitesse en entrée du piège et la vitesse dans le rétrécissement. Pour s'assurer que les cellules ne soient pas trop perturbées, il suffit de choisir la vitesse en entrée en conséquence.

#### Contrôle du nombre de cellules piégées

Les paramètres caractéristiques du piège sont les dimensions du conduit bloquant les cellules et la taille des chambres. Il suffirait que les dimensions du conduit soient inférieures au diamètre

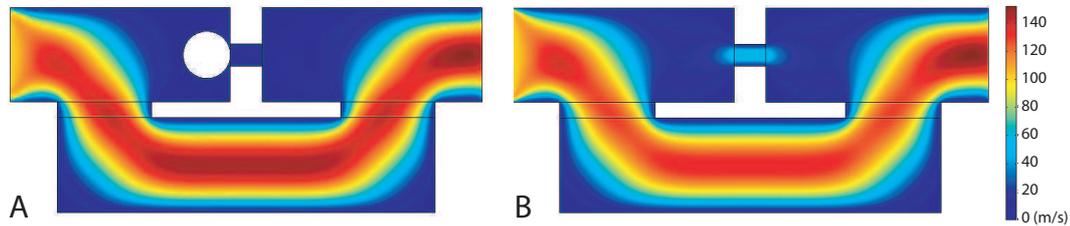


FIG. 3.1 – Piège à cellule dans la configuration en cul-de-sac. La simulation par éléments finis d'un écoulement de Stokes plan en 2 dimensions dans cette configuration, sans et avec un pilier circulaire de  $15 \mu\text{m}$  de diamètre en guise de cellule piégée, nous permet de jauger les vitesses relatives entre les différentes parties. Sont représentées ici les distributions des vitesses dans les deux conditions.

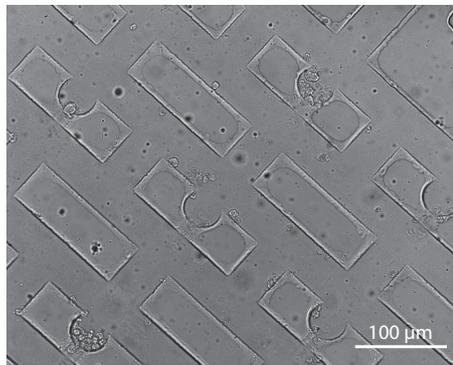


FIG. 3.2 – Microphotographie de la première génération de dispositifs de positionnement exploités, dans lequel une solution contenant des cellules a été introduite, dans le sens NE-SO (de en haut à droite à en bas à gauche). Les canaux mesurent  $40 \mu\text{m}$  de large et  $30 \mu\text{m}$  de haut. Malgré la grande section des canaux, les cellules et les débris cellulaires s'accumulent dans les parties à faible débit.

d'une cellule, estimé à  $10 \mu\text{m}$ , pour réaliser le piège bloquant. Dans ce cas idéal, une seule cellule suffirait à boucher le piège. Cependant, la fabrication de dispositifs complexes de différentes hauteurs et de formes n'est pas aisée. De plus, la solution contenant les cellules est souvent polluée par des débris cellulaires et divers éléments sécrétés par les cellules en culture. Nombreuses sont les sources de bouchage avant même que les cellules puissent se loger dans les pièges (figure 3.2).

Nous choisissons alors une méthode plus robuste, qui consiste à fixer une dimension du conduit à environ  $7 \mu\text{m}$ . Ceci permettra l'évacuation plus facile des débris et diminuera par conséquent la probabilité de trouver un piège sans cellules. De ce fait, le conduit ne pouvant plus être complètement bouché, il sera nécessaire de limiter les dimensions des chambres en fonction du nombre de cellules voulu dans chaque piège.

Dans le cas de pièges pour cellules uniques, les chambres auront des dimensions légèrement supérieures au diamètre des cellules, évitant ainsi un trop grand confinement de ces dernières. Il est à noter qu'un flux résiduel ne pourra jamais être éliminé dans cette configuration, et qu'il sera nécessaire de concevoir les canaux de délestage de sorte que, une fois une cellule logée dans le piège, les suivantes soient emportées par le flux dévié. Dans le cas de pièges pour cellules multiples, ce problème ne se pose pas.

### Efficacité du piégeage

Dans le cas d'un dispositif de positionnement cellulaire destiné à contenir une grande quantité de chambres permettant l'accès à une grande quantité de données à chaque manipulation, le fait que tous les emplacements soient remplis est un prérequis.

Afin de s'assurer de l'efficacité maximale du piégeage, un équilibre entre le flux traversant le piège et le flux traversant les canaux de délestage doit être établi. Du fait de l'étranglement permettant de piéger des cellules, le débit dans le piège est inexorablement plus faible que celui d'un canal similaire sans étranglement. De plus, les canaux de délestage doivent permettre d'évacuer tous types de débris ou d'amas cellulaires contenus dans la solution. Si la différence de débit entre les deux types de canaux est trop grande dès le départ, la probabilité de piéger une cellule sera d'autant plus faible et, par conséquent, les manipulations nécessaires au positionnement cellulaire seront d'autant plus fastidieuses.

Comparons le débit dans les deux types de canaux dans une configuration qui correspondrait le plus au dispositif final. Nous pouvons effectuer un calcul approximatif pour déterminer le rapport entre les deux débits, le débit dans le piège  $Q_p$  et le débit dans le canal de délestage  $Q_d$ .

L'expression exacte du débit  $Q$  dans un canal rectangulaire de hauteur  $h$ , de largeur  $w$  et de longueur  $L$  est de [116, 117] :

$$Q = \frac{wh^3}{12\eta L} \Delta P \left[ 1 - 6 \frac{h}{w} \sum_{n=0}^{\infty} \lambda_n^{-5} \tanh(\lambda_n \frac{h}{w}) \right] \text{ avec } \lambda_n = \frac{(2n+1)\pi}{2} \quad (3.1)$$

où  $\eta$  est la viscosité du fluide et  $\Delta P$  est la différence de pression appliquée entre l'entrée et la sortie du canal. Nous pouvons considérer en première approximation :

$$Q \simeq \frac{wh^3}{12\eta L} \Delta P \left[ 1 - \frac{3.2^6}{\pi^5} \frac{h}{w} \right] \quad (3.2)$$

Cette expression donne une erreur inférieure à 10% pour  $\frac{h}{w} < 0,7$ .

#### *Estimation du rapport de débit entre un piège et un canal de délestage*

Le dispositif final aura une hauteur de canal fixée d'environ 20  $\mu\text{m}$  pour avoir une assez bonne proximité entre les cellules d'intérêt et les électrodes. Pour rester dans l'approximation de l'équation 2, nous choisirons pour largeur des canaux de délestage 30  $\mu\text{m}$ . Nous fixerons de plus leur longueur à 120  $\mu\text{m}$  pour des raisons de géométrie.

L'expression approximative du débit est linéaire par rapport à la chute de pression dans le canal et nous rappelle la loi d'Ohm pour les circuits électriques. Il est possible de démontrer l'analogie entre la fluidique et l'électronique où le débit, la différence de pression et le facteur que l'on appellera la résistivité fluidique joueraient respectivement le rôle du courant, de la tension et de la résistivité électrique [118]. Nous adopterons sans le démontrer le fait que les résistivités fluidiques de canaux en série s'additionnent.

La source de réduction de débit dans le piège provient du rétrécissement bloquant les cellules et du canal résultant (figure 3.1). La résistivité fluidique des parties en amont et en aval du rétrécissement sont négligeables devant celle du rétrécissement. Prenons comme estimation grossière que le rétrécissement et le petit canal résultant ont pour résistivité fluidique celle d'un simple canal de 7  $\mu\text{m}$  de haut, 20  $\mu\text{m}$  de large et 10  $\mu\text{m}$  de long. Cela donne alors un rapport des débits de  $\frac{Q_p}{Q_d} \simeq 34\%$ .

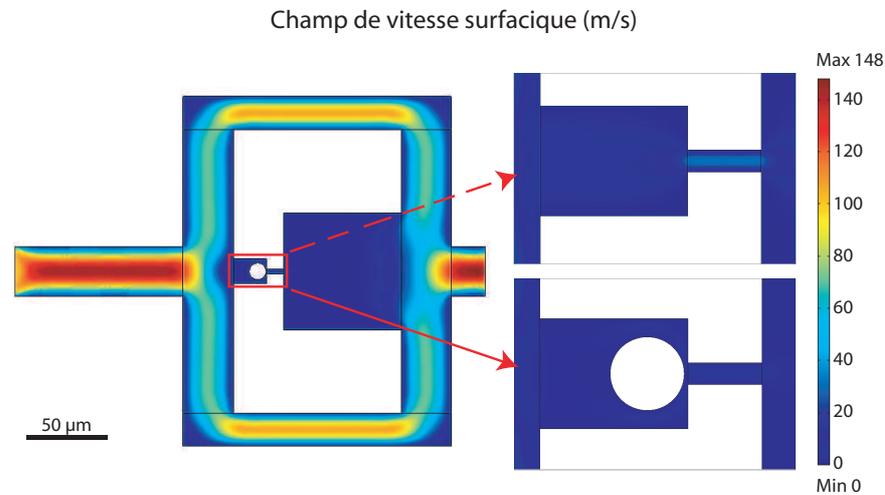


FIG. 3.3 – Une maille du réseau de pièges à cellules. Le sens de l'écoulement se fait de gauche à droite. Une intersection en T permet la division du flux de part et d'autre du piège. Les petites dimensions du piège ainsi que du petit canal qui le relie au reste de l'écoulement procurent une grande résistance à ce chemin fluide et empêchent tout flux, une fois une cellule est piégée, voir partie de droite. Seules les cellules qui étaient parfaitement au centre du canal en entrée auront une probabilité non nulle d'être piégées.

Pour toutes modifications dans la conception, il sera important de prendre en compte cette restriction sur l'efficacité du piégeage.

### 3.1.3 Simulation et visualisation des lignes de courant

#### Simulation de la répartition du débit

Les considérations précédentes ont posé les traits principaux de la structure d'un dispositif de positionnement cellulaire. Il s'agit maintenant d'appliquer cette structure dans un dispositif parallélisé. Nous avons alors répliqué ces pièges selon un réseau prédéfini. Ce réseau correspond en fait au réseau de microélectrodes que nous avons développé pour l'expérience. Ce réseau est un réseau carré à 36 emplacements, dont le pas est  $200\ \mu\text{m}$ .

Chaque maille du réseau est centrée sur l'emplacement où la ou les cellules seront piégées. Nous avons simulé numériquement les flux dans l'unité de base illustrée par la figure 3.3. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel *COMSOL* de simulation numérique par éléments finis, avec l'outil « dynamique des fluides » et l'équation de Navier-Stokes pour un fluide incompressible, en deux dimensions.

Dans le cas présent, la chambre de mesure a une largeur de  $15\ \mu\text{m}$ , équivalente à une chambre de capture de cellules uniques. Le rétrécissement est plus petit que dans le calcul précédent, large de  $3\ \mu\text{m}$  afin de capturer des cellules d'environ  $5\ \mu\text{m}$  de diamètre. Avec des canaux de délestage de largeur principale de  $20\ \mu\text{m}$ , nous obtenons une variation du rapport des débits  $\frac{Q_p}{Q_d}$  passant de 4,5% à 0,05% avant et après la capture d'une cellule. Un si faible rapport après qu'une cellule soit logée dans le piège nous assure la capture de cellules uniques puisque la chance qu'une cellule soit entraînée dans le piège par le courant diminue avec le débit.

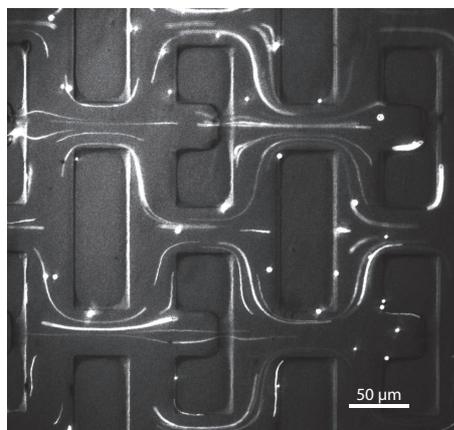


FIG. 3.4 – Microphotographie du flux de particules fluorescentes dans un dispositif de pièges à cellules. Les traînées blanches correspondent au trajet des particules. Le dispositif est conçu de la même manière que celui de la simulation précédente, mais les tailles des canaux,  $40\ \mu\text{m}$  de largeur, sont différents.

### Lignes de courant

Les étapes de fabrication d'un tel dispositif pouvant être nombreuses, il est nécessaire d'effectuer des vérifications en fin de parcours pour valider le moule. Pour s'assurer rapidement du bon fonctionnement d'un dispositif contenant une grande quantité de canaux, nous y introduisons des particules fluorescentes. Lors de la prise de microphotographie, avec un temps de pose correspondant approximativement au temps de parcours moyen d'une particule sur  $100\ \mu\text{m}$ , dans un montage spécial pour la fluorescence, le chemin parcouru par la particule sera enregistré sous forme de traînée (figure 3.4).

## 3.2 Gestion du milieu fluide des pièges

Une fois le positionnement des cellules effectué, il reste à préparer les cellules pour la mesure. Pour cela, la gestion des flux dans le dispositif est primordiale.

### 3.2.1 Le principe des chambres de mesure

Les signaux émis par les cellules sous forme de sécrétion d'espèces électroactives sont le plus souvent intenses mais très localisés. Ainsi, il est nécessaire de placer les instruments de mesure au plus proche des membranes cellulaires afin de ne pas diluer les molécules dans le milieu, au risque de noyer le signal dans le bruit ambiant. La stabilité de l'environnement dans les chambres de mesure nécessaire pour le maintien des cellules au niveau de stress minimal contribue également au bon déroulement des mesures puisqu'elle empêche les flux parasites de perturber le milieu.

Cependant, positionner les cellules dans les chambres ne suffit pas aux mesures électrochimiques dans un tel dispositif. L'intérêt de la microfluidique est le contrôle actif de l'environnement, nous devons être en mesure de contrôler précisément les changements de milieu dans les chambres de mesure. Dans un cas simple, cela revient à maintenir un apport en milieu de culture

frais pour la survie des cellules d'une part, et à injecter des composés chimiques pour activer les cellules avant les mesures d'autre part.

Étant donné la petite taille des chambres de mesure et la nécessité d'un environnement stable, l'apport d'éléments nutritifs ou d'activateurs chimiques pourra se faire par transport diffusif des molécules. Dans le souci de minimiser le flux dans les chambres de mesure tout en contrôlant l'efficacité du renouvellement du milieu, nous modifions le dessin et l'utilisation du dispositif de positionnement cellulaire. Le flux traverse désormais le dispositif perpendiculairement au flux permettant la capture des cellules, passant devant l'entrée des pièges sans pouvoir les traverser. Les échanges de molécules pourront se faire grâce au flux constant de milieu frais à l'entrée du piège, et ce, indépendamment de la vitesse imposée au liquide.

### 3.2.2 Renouvellement du milieu des chambres de mesure

Comme toute unité du vivant, la cellule puise de son milieu environnant ce dont elle a besoin pour survivre et transforme ces éléments nutritifs de base en énergie, en produits nécessaires à son activité et en déchets. Pour un milieu clos et stable, l'environnement autour de la cellule s'appauvrit au fur et à mesure en éléments nutritifs et s'enrichit en espèces toxiques. Le renouvellement régulier, voire constant, du milieu est donc nécessaire. Voici la composition des milieux de culture cellulaire :

- Eau
- Ions minéraux dont la nature et la concentration sont spécifiques aux types cellulaires. L'osmolarité des milieux est celle du sérum physiologique (9 g de NaCl par litre).
- Source de carbone et d'énergie, souvent apportés par du glucose
- Source d'azote, exclusivement apportée par les acides aminés
- Facteurs de croissance (acides aminés essentiels, vitamines, acides gras), notamment des facteurs de croissance cellulaire hormonaux, apportés par un ajout de sérum foetal de veau
- Gaz : O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>
- pH constant vers 7,4
- Absence de flore microbienne, assurée par l'ajout d'antibiotiques et même d'antifongiques

Toutes ces espèces sont des composés chimiques de petite taille. Nous considérerons leur coefficient de diffusion moléculaire de l'ordre de  $D = 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  pour les composés les plus gros. Ce coefficient de diffusion est aussi convenable pour les activateurs ajoutés avant les mesures électrochimiques.

#### Transport des espèces par diffusion

Pour évaluer le nombre de Péclet à l'intérieur de la chambre de mesure, nous avons effectué une simulation du profil de vitesse dans le dispositif (figure 3.5).

Ce nombre  $Pe = \frac{lv}{D}$ , où  $l$  est la longueur caractéristique de la chambre de mesure,  $v$  la vitesse à 20  $\mu\text{m}$  de l'entrée de la chambre, et  $D$  le coefficient de diffusion des espèces d'intérêt, nous permet de comparer l'importance du transport de la matière par convection à celui par diffusion. Dans le cas d'un mouvement des fluides causé par la différence de pression hydrostatique entre l'entrée et la sortie du dispositif, le débit dans les canaux principaux est estimé à 25  $\text{nL}.\text{min}^{-1}$ . La simulation évalue la vitesse au milieu de la chambre de mesure à 1  $\mu\text{m}.\text{s}^{-1}$ , d'où  $Pe = 0,2$ , montrant la dominance du transport de la matière par le phénomène de diffusion.

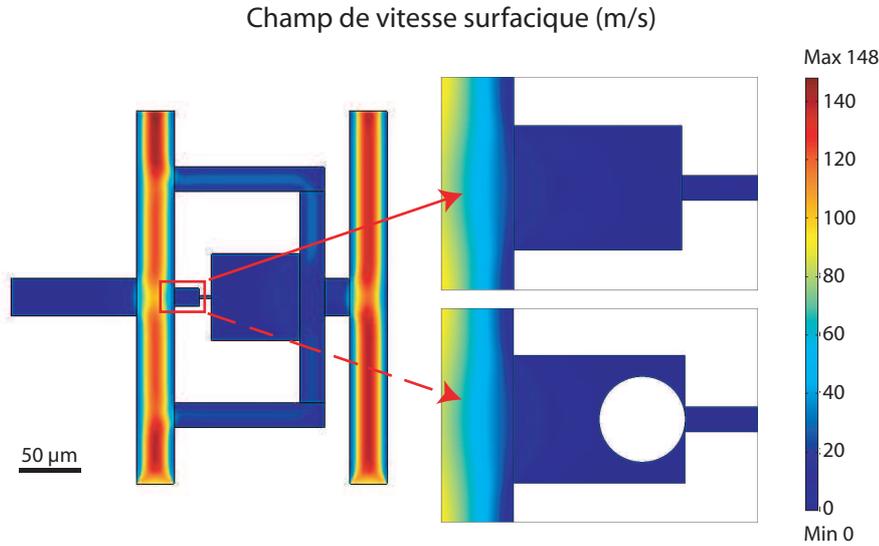


FIG. 3.5 – Une maille du réseau de pièges à cellules dans la configuration de chambre de mesure. Le flux se fait dans le sens perpendiculaire au premier. La simulation illustre le faible flux dans les chambres de mesure dans cette configuration.

### Visualisation des lignes de courant

De la même manière que pour le positionnement cellulaire, nous avons validé le dispositif en utilisation transverse par la capture par microphotographie des lignes de courant grâce à l'introduction de particules fluorescentes (figure 3.6).

### 3.2.3 Estimation du temps de renouvellement

Considérons le cas d'un changement de la concentration d'une espèce chimique dans la chambre mesure. La concentration initiale de la chambre de mesure est à  $C_0$ . L'introduction continue dans les canaux transverses de la nouvelle solution fixe la concentration à l'entrée des chambres de mesure à  $C_1$ . La première loi de Fick stipule que le flux de matière est localement contrôlé par le gradient de la concentration. Cette loi s'énonce :

$$\vec{J} = -D\vec{\nabla}C \quad (3.3)$$

$\vec{J}$  correspond au flux de la matière,  $D$  au coefficient de diffusion moléculaire de l'espèce d'intérêt et  $C$  sa concentration. Ce comportement tend à atténuer toutes les variations de la concentration, vu que les molécules se déplacent toujours d'un lieu de haute concentration vers un lieu de plus basse concentration. En traduisant la conservation de la matière en terme de variation de flux de molécules, nous obtenons l'équation de diffusion suivante :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\vec{\nabla}\vec{J} = D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (3.4)$$

Cette équation n'a de solutions analytiques que dans des cas particuliers de conditions aux limites. Le cas de la chambre de mesure peut être assimilé à un problème unidimensionnel en considérant les parois de la chambre de mesure comme absolument inerte vis à vis des molécules.

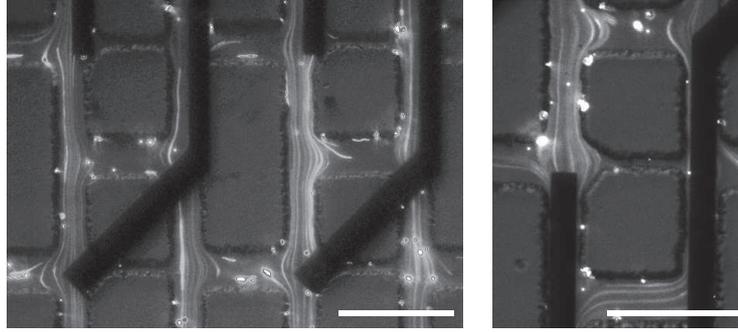


FIG. 3.6 – Microphotographie du flux de particules fluorescentes dans un dispositif de pièges à cellules dans la configuration de chambre de mesure. Le flux se fait du bas vers le haut. Ce dispositif est légèrement différent des autres dans la forme triangulaire des chambres : cette forme triangulaire favorise le passage du flux dans les pièges, rendant ces derniers peu efficaces. Les pistes noires correspondent aux électrodes assemblées dans ce dispositif. Les barres d'échelle correspondent à  $100 \mu\text{m}$ .

Cette hypothèse est convenable dans la mesure où l'adsorption des protéines sur la surface des canaux et des chambres s'effectue très rapidement et ces derniers deviennent effectivement inertes après une première saturation des surfaces. Nous allons considérer alors la résolution de ce problème dans le cas d'un demi-plan infini où la concentration à  $x = 0$  est constante et imposée égale à  $C_1$ .

Cette approximation est relativement forte, mais elle nous permet d'effectuer des calculs d'ordre de grandeur. La diffusion étant *a priori* plus rapide dans un milieu confiné que dans le plan infini, nous considérerons alors que les temps de renouvellement obtenus par la résolution analytique d'un problème idéal seront une limite supérieure des temps de renouvellement effectifs.

La solution de l'équation de diffusion dans le cas d'un plan infini, ayant comme concentration initiale uniforme  $C_0$ , et comme condition à  $x = 0$  une concentration constante  $C_1$  est la fonction suivante :

$$C(x, t) = C_0 + (C_1 - C_0) \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad \text{avec} \quad \operatorname{erfc}(y) = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-\zeta^2} d\zeta \quad (3.5)$$

La fonction *erfc*, qui est la fonction complémentaire à la *fonction d'erreur de Gauss*, est bien connue. Le temps  $\tau$  de renouvellement, donnée par l'expression  $\tau \simeq \frac{x^2}{D}$ , est défini comme le temps nécessaire à la concentration de la chambre pour atteindre la concentration intermédiaire suivante,  $C(\tau) = \frac{1}{2}(C_1 - C_0)$ . Pour un emplacement à  $20 \mu\text{m}$  de l'entrée et un coefficient de diffusion  $D \simeq 10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour les petites molécules, nous obtenons un temps de renouvellement de 4 secondes. Par contre, la limite  $C_1$  ne pourra théoriquement jamais être atteinte. Il sera nécessaire d'attendre 5 minutes pour obtenir une concentration  $\frac{C}{C_1} \simeq 93,5\%$  (figure 3.7 A). Ce temps de renouvellement total est tout à fait raisonnable en pratique dans les cas d'activation lente. C'est ce que nous utiliserons dans les expérimentations ultérieures. Ce délai pour le changement du milieu dans la chambre de mesure est malheureusement trop lent pour les situations d'activation cellulaires rapides, où la réponse des cellules aux stimuli sont quasiment immédiats. Dans ce cas, il sera nécessaire de concevoir d'autres systèmes d'injection, par exemple avec un

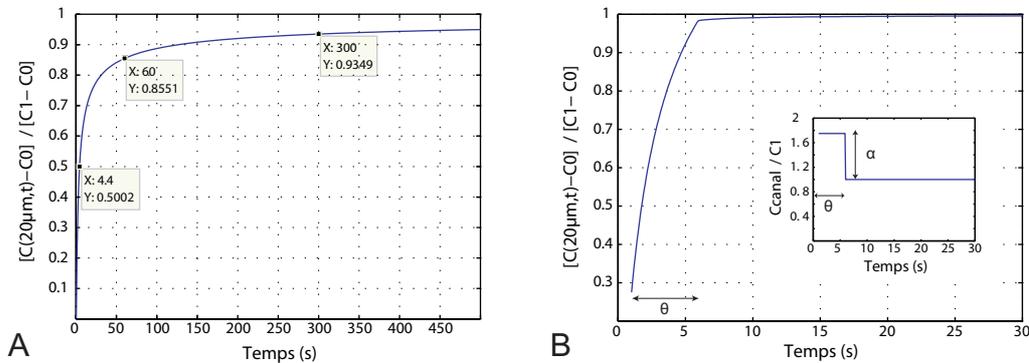


FIG. 3.7 – Evolution de la concentration au centre de la chambre de mesure lors d’un changement du liquide inoculé. A. La concentration des canaux d’irrigation reste constante égale à la concentration finale  $C_1$ , le temps de renouvellement total des molécules est alors de l’ordre de 5 minutes. B. Pendant la durée  $\theta=6\text{s}$ , la concentration des canaux est fixée à  $C=(1+\alpha).C_1=1,75.C_1$ , puis retrouve la concentration d’activation  $C_1$ ; dans ces conditions, le temps de renouvellement total est de 5 secondes.

système de vannes qui contrôlerait précisément le volume et le moment d’injection, permettant une rapide montée de la concentration d’activateur puis sa stabilisation grâce à l’injection successive de solutions de concentration différentes comme nous le montre la figure 3.7 B. Un tel système est dans un premier temps inadéquat puisqu’il compliquerait considérablement le montage en rajoutant des réservoirs supplémentaires et un système de contrôle actif qui pourrait être source de bruit.

### 3.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons introduit la conception de dispositifs de piégeage de cellules et discuté de leur efficacité, aussi bien concernant le positionnement cellulaire que concernant la gestion fluïdique des pièges. Comme pour tous les dispositifs microfluidiques, la géométrie et les tailles relatives des canaux sont des facteurs essentiels pour leur efficacité. Toute modification dans le *design* sans tenir compte de l’importance de ces facteurs peut provoquer des comportements imprévus et difficilement contrôlables.

Ce dispositif de positionnement cellulaire destiné à une plate-forme de mesures électrochimiques remplit de manière efficace les fonctions imposées, dans le cas d’une situation idéale. Cependant, les difficultés d’intégration de la manipulation effective de cellules et de microélectrodes dans un tel dispositif restent non résolues. Dans quelle mesure pouvons-nous estimer qu’une cellule piégée dans ce type de chambre de mesure reste-t-elle viable? Comment estimer le stress provoqué par la contrainte des microcanaux et le confinement des chambres microfluidiques? Qu’en est-il des mesures électrochimiques dans ces chambres de mesure? Comment positionner les électrodes de travail et les électrodes de référence? Dans quelle mesure pourra-t-on comparer ces analyses électrochimiques aux analyses habituelles en boîte de Pétri avec des ultramicroélectrodes, bien maîtrisées au laboratoire?

Ce travail d’intégration et d’exploration sera l’objet des parties suivantes.

Deuxième partie

Culture cellulaire en microsystemes



# Introduction

Grâce à la souplesse de notre technique de microfabrication, la lithographie molle, nous avons pu développer une technique d'assemblage de dispositifs microfluidiques originale nous procurant une grande flexibilité pour nos recherches et l'optimisation d'un système d'analyse électrochimique sur cellules uniques dans un microsysteme. La concentration de nos efforts dans les étapes particulières d'isolement d'objets de dimensions comparables aux cellules et de contrôle dynamique des flux dans des chambres microfluidiques a abouti à un système microfluidique simple consistant en un réseau de chambres microfluidiques dont la manipulation en deux étapes permettrait le positionnement de cellules uniques suivi d'une diffusion de différents facteurs solubles dans les chambres sans perturbation dans le volume. Ces chambres microfluidiques constituent un micro-environnement idéal pour des mesures électrochimiques sur cellules uniques.

Cependant, la manipulation de cellules vivantes est infiniment plus complexe que le manie-ment d'objets modèles tels des billes de polystyrène de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cette partie sera consacrée aux développements nécessaires d'outils de culture cellulaire et de manipulation de cellules vivantes dans des dispositifs microfluidiques. Nous décrirons dans un premier temps les outils liés à la culture cellulaire dans les microsystemes développés dans notre laboratoire avant d'aborder dans un deuxième temps le contrôle dynamique de l'environnement cellulaire dans deux configurations distinctes. Une première configuration concerne des populations de cellules adhérentes en culture dans nos microsystemes. Nous avons mis en place le contrôle, sur de longues périodes de temps, de stimulations chimiques variées dans le but d'induire la réactivité cellulaire de cellules souches mésenchymateuses vers la voie de différenciation neuronale. Une deuxième configuration concerne la manipulation de macrophages de souris isolées, dans le dispositif de positionnement et de stimulation cellulaire que nous avons décrit dans la partie précédente. Ainsi, nous avons pu aborder la problématique de la viabilité des cellules et de la pertinence de réaliser des mesures électrochimiques de stress oxydant dans de tels dispositifs.



## Chapitre 4

# Manipulation et culture de cellules

La cellule, unité de base du vivant, est une entité particulièrement complexe qui fait l'objet d'une discipline à part entière : la biologie cellulaire. Sa manipulation dans des microsystèmes est non triviale et soulève un certain nombre d'interrogations et de précautions à l'origine de nombreux travaux scientifiques dans ce domaine depuis ces cinq dernières années.

Aujourd'hui encore, la culture cellulaire reste l'outil principal pour la recherche en biologie cellulaire et moléculaire. Néanmoins, malgré le rythme effréné de développement des nouvelles techniques d'analyse qui lui sont associées, telles le séquençage génomique ou l'imagerie médicale, les méthodes utilisées pour la culture cellulaire n'ont guère évolué. Depuis plus de cent ans, ces techniques consistent essentiellement en l'immersion d'une grande population de cellules dans un milieu liquide homogène. Elles nécessitent de grandes surfaces et volumes de culture, des incubateurs volumineux, ainsi qu'une main d'œuvre qualifiée et du matériel coûteux. Les cellules, de taille micrométrique, répondent aux concentrations locales de différentes molécules qui ont trois provenances possibles : elles peuvent être dissoutes dans le milieu extracellulaire, elles peuvent être adsorbées sur le support de culture, et elles peuvent être également sécrétées par les cellules voisines sous forme de molécules membranaires ou solubles. Le volume qui est effectivement « vu » par les cellules correspond au plus à quelques fractions de microlitre. Leur culture dans une population de plusieurs millions d'individus, dans des volumes de l'ordre de plusieurs millilitres, paraît quelque peu excessive pour la plupart des expériences en biologie cellulaire.

Les technologies de microfabrication offrent de nombreuses possibilités de développement d'outils de culture et d'analyse de petites populations de cellules ou de cellules uniques en grand nombre. Elles permettent également le contrôle d'un micro-environnement de grande pertinence physiologique, avec la possibilité de variations très localisées de certains paramètres. Dans ce chapitre, nous détaillerons d'abord les travaux de culture cellulaire dans les microsystèmes présentés dans la littérature, avant de décrire les outils que nous avons développés au laboratoire de microfluidique aussi bien pour la décoration des surfaces dans les microsystèmes que pour la culture cellulaire.

#### 4. Manipulation et culture des cellules

---

<b>4.1</b>	<b>Biologie cellulaire dans les microsystèmes : généralités . . . . .</b>	<b>73</b>
4.1.1	Microréacteurs pour la culture cellulaire . . . . .	73
4.1.2	Stimulation des cellules par microfluidique . . . . .	75
4.1.3	Outils d'analyse . . . . .	76
<b>4.2</b>	<b>Modification des surfaces de culture . . . . .</b>	<b>77</b>
4.2.1	Microstructuration des surfaces . . . . .	78
4.2.2	Fonctionnalisation des microcanaux . . . . .	81
4.2.3	Décoration chimique des surfaces . . . . .	82
<b>4.3</b>	<b>Manipulation de cellules vivantes en milieu confiné . . . . .</b>	<b>85</b>
4.3.1	Considérations sur la géométrie des chambres de culture . . . . .	86
4.3.2	Notion de flux idéal pour chaque configuration . . . . .	87
4.3.3	Importance de la densité d'ensemencement . . . . .	88
<b>4.4</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>88</b>

---

## 4.1 Biologie cellulaire dans les microsystèmes : généralités

Les microsystèmes ouvrent de nouvelles opportunités de contrôle spatio-temporel de la culture cellulaire et des stimuli appliqués sur les cellules en combinant des surfaces reproduisant la géométrie et la biochimie complexes de la matrice extracellulaire et grâce à des canaux microfluidiques régulant le transport des fluides et des facteurs solubles. Jusqu'à présent, les dispositifs microfluidiques d'analyse biologique sont restés au stade de preuve de principe justement à cause du passage non trivial entre les techniques de manipulation et de culture cellulaire macroscopiques et les techniques d'analyses en microsystèmes. L'intégration des premières étapes des expérimentations en biologie cellulaire dans les microsystèmes permettra d'approcher d'une part le concept de « laboratoire sur puce », où tous les éléments d'expérimentation (culture cellulaire, stimulations, sélection et observation, lyse et analyse) seraient intégrés dans un même microsystème, et d'autre part de rendre les microsystèmes d'analyse plus accessibles aux chercheurs en biologie.

Nous allons passer en revue les outils principaux de biologie cellulaire développés dans les microsystèmes ces dernières années.

### 4.1.1 Microréacteurs pour la culture cellulaire

Le contrôle du micro-environnement pour la culture cellulaire peut se faire de deux manières très différentes : en surface et en volume. Le contrôle des surfaces consiste en la structuration et/ou la décoration chimique des supports de culture cellulaire de manière contrôlée grâce aux différentes techniques de microfabrication. Le contrôle en volume correspond au contrôle microfluidique des flux et des concentrations dans les milieux confinés comme les microcanaux et les microréacteurs pour la culture cellulaire. Les outils de microfluidique interviennent pour maîtriser dynamiquement les flux traversant les microréacteurs, la vitesse et la nature des liquides qui y sont perfusés.

### Culture sur substrats micro-usinés

Les nombreuses techniques de microfabrication, notamment de modelage des contours pour former des motifs micrométriques de surface promouvant l'adhésion cellulaire [119] ou de modelage de volumes pour construire des échafaudages en trois dimensions dont les tailles caractéristiques sont inférieures au micromètre [120], ont abouti à des avancées marquantes dans la compréhension de l'interaction entre les cellules et leur substrat.

En limitant dans l'espace les surfaces d'ancrage des cellules sur leur substrat, il a été montré que de nombreux processus biologiques sont dépendants de ces interactions cellules/substrat. Les diverses techniques de *micropatterning*, que ce soit par estampillage ou par l'utilisation de masques de pochage microfabriqués, permettent la création de motifs de protéines favorisant les interactions avec les cellules et la transformation du reste du substrat en une surface inerte vis-à-vis de ces dernières. La variation de la taille de ces motifs ont montré par exemple, l'influence de la forme des cellules sur leur vitesse de croissance et leur mort, l'apoptose [121, 122], plus précisément, la diminution des surfaces d'adhésion favorise la mort cellulaire des cellules endothéliales humaines. Il est également montré, grâce à la variation des motifs d'adhésion, que l'orientation de la division cellulaire est dépendante de l'organisation de son cytosquelette, lui-même dépendant des liaisons focales que la cellule effectue avec son substrat [10].

La force exercée par les cellules sur leur substrat est mesurée en détectant les distorsions du substrat par les cellules. Là encore, les techniques de microfabrication interviennent pour fournir des outils précieux et modulables. Ces détections peut être mises en œuvre en plaçant une cellule sur un réseau de colonnes d'élastomère et en mesurant les distorsions de ces colonnes par les cellules [123].

### Culture en microréacteurs

La culture cellulaire dans les microsystèmes a été démontrée pour la plupart des types cellulaires cultivés dans les conditions macroscopiques [124], utilisant des microréacteurs de matériaux et de géométries multiples. Citons les travaux remarquables de Lee *et al.* pour leur adaptabilité à de nombreuses applications. Un réseau de 64 chambres de 3 nL en volume a été créé, permettant la culture en parallèle de plusieurs types cellulaire dans des conditions variables [12]. Le milieu de culture circule dans des canaux entourant les chambres de culture et la perfusion des nutriments se fait indirectement grâce à un interstice de 2  $\mu\text{m}$  reliant les chambres de culture aux canaux principaux. Cette technique de perfusion permet de mimer, dans les ordres de grandeurs des cinétiques d'échange, l'apport de milieu nutritif à un tissu par l'irrigation de vaisseaux sanguins. La culture de la lignée cellulaire cancéreuse HeLa dans ces microréacteurs pendant deux semaines et la variation des conditions de culture, notamment dans le taux d'apports nutritifs par adjonction de sérum, ont montré un comportement similaire à la culture macroscopique dans des boîtes de Petri, aussi bien pour le taux de croissance que la viabilité cellulaire. Ce réseau de microréacteurs a été utilisé également pour la culture de fibroblastes NIH3T3, de cellules endothéliales bovines primaires, d'hépatocytes HepG2 et de neuroblastomes humaines SY5Y pour démontrer sa pertinence en tant qu'outil de culture cellulaire standardisé dans les microsystèmes. Pour la plupart des travaux concernant la culture cellulaire en microsystème, le PDMS est le matériau le plus utilisé du fait de sa biocompatibilité et sa perméabilité aux gaz convenable à la culture cellulaire dans un incubateur standard [125, 87, 126]. Notons que les observations et les analyses effectuées sur les cultures issues de microsystèmes se font *in situ* par les techniques habituelles de microscopie.

Outre la miniaturisation, la culture cellulaire dans les microsystèmes a ouvert la voie pour la culture *in vitro* de types cellulaires qui étaient auparavant inaccessibles du fait de la difficulté de maintenir leur phénotype dans les conditions de culture standard. C'est notamment le cas des cellules de foie et de certaines cellules constitutives du tissu osseux. La culture de ces cellules requiert un environnement en trois dimensions particulièrement complexe. Les cellules de foie nécessitent ainsi un microenvironnement particulier constitué d'un échafaudage de matrice extracellulaire et d'un assemblage de différents types de cellules-nourrices. La culture d'hépatocytes viables, en maintenant leur phénotype jusqu'à trois semaines, a été réalisée en utilisant un microréacteur en trois dimensions en silicium. Une précolonisation des sites de culture par des cellules-nourrices a permis l'établissement d'un environnement de culture favorable permettant aux hépatocytes, cellules de foie, d'établir des jonctions serrées et des desmosomes observés dans les tissus *in vivo* [127, 128]. L'étude de l'influence d'une co-culture d'hépatocytes avec différents types cellulaires sur le maintien de phénotypes peut être améliorée grâce aux nouvelles méthodes développées par microfabrication [129, 130]. Dans le cas de cellules constitutives du tissu osseux, il peut être parfois nécessaire d'apporter des stimulations mécaniques constantes. Il a également été montré qu'un échafaudage en trois dimensions, alimenté en facteurs solubles par perfusion mimant les conditions physiologiques, améliore la production de tissus osseux par les ostéoblastes.

C'est plus particulièrement la colonisation d'un substrat en hydroxyapatite spongieux qui apporte aujourd'hui les meilleurs résultats de culture d'ostéoblastes. Deux facteurs spécifiques à ces substrats sont déterminants. La structure de ce substrat permet de confiner partiellement les cellules, et ainsi de les placer dans un contexte proche de l'os. La perfusion du morceau d'hydroxyapatite permet également le renouvellement du micro-environnement cellulaire de manière semblables aux conditions physiologiques. Notons de plus que le parcours du milieu de culture à travers le substrat apporte une contrainte mécanique qui s'est avéré bénéfique pour ces cellules [131, 132].

#### 4.1.2 Stimulation des cellules par microfluidique

La maîtrise de l'environnement spatial et fluide des cellules grâce à la microfluidique est également un outil puissant pour contrôler dans une certaine mesure les stimulations d'origines chimiques ou mécanique afin d'effectuer des analyses fines de la réactivité cellulaire. Un grand nombre de dispositifs microfluidiques ont été conçus pour l'étude de différentes voies de signalisation biochimiques, de décision du destin cellulaire (prolifération, différenciation ou mort cellulaire) ou de la morphogenèse de tissus biologiques.

Le contrôle des flux dans les dispositifs microfluidiques permet non seulement l'apport de facteurs solubles avec précision aussi bien dans l'espace, dans le temps que dans les concentrations, mais aussi l'application d'une certaine contrainte physique due au cisaillement du fluide sur les cellules, comme vu dans le paragraphe précédent pour le cas des ostéoblastes. Bien qu'il existe des dispositifs microfluidiques qui manipulent des cellules, non adhérentes, dans des gouttelettes et qui basent leur stimulation sur le parcours de gouttelettes à travers des emplacements particuliers, par exemple à travers des thermostats pour une stimulation thermique [133], il est généralement admis que la stimulation fluide de cellules pour les expériences de biologie cellulaire dans les microsystèmes consiste en l'irrigation contrôlée de mélanges de fluides à travers des cellules immobilisées. Dans le cas des cellules non adhérentes, c'est-à-dire des cellules qui par nature n'interagissent avec aucun substrat, leur immobilisation se fait grâce à des pièges, le plus souvent dielectrophorétiques [134, 97] ou encore hydrodynamiques [135, 112, 114]. Les stimuli appliqués dépendent alors du liquide dans lequel elles baignent et dont le flux est contrôlé de manière précise par les outils de microfluidique. Des réponses cellulaires rapides comme le flux de calcium à travers la membrane cellulaire, observées sur des cellules Jurkat activées par de l'ionomycine, ont pu être suivies grâce au contrôle rapide des flux, avec des temps de réponse du système fluide de l'ordre de la centaine de millisecondes [112]. Il est également possible de concevoir les pièges cellulaires de telle sorte que des paires de cellules soient positionnées en regard, permettant ainsi d'analyser les interactions cellule-cellule dans différents environnements fluidiques [136].

Dans les cas des cellules adhérentes, la culture cellulaire s'effectue dans des chambres de culture et c'est la réactivité cellulaire par rapport aux différents flux de facteurs solubles traversant ces chambres qui sera étudiée. Le grand intérêt qu'apporte le contrôle microfluidique des liquides est la maîtrise de combinaisons complexes d'environnements fluidiques sur des distances caractéristiques de quelques microns ou dizaines de microns. Ainsi, la création de gradients, statique ou dynamique, de molécules sur une distance de quelques dizaines de microns permet d'étudier la chimotaxie, c'est-à-dire la migration des cellules en réponse à un stimulus chimique [137, 138]. Le maintien d'un tel gradient dépend très largement des constantes de diffusion des molécules d'intérêt. Il est possible, au contraire des gradients, de limiter la diffusion

des molécules et de concentrer le flux des molécules d'intérêt dans une zone précise du canal (*hydrodynamic focusing*). Ceci résulte alors en des stimuli extrêmement réduits dans l'espace, permettant une stimulation d'une partie seulement des cellules. Cette propriété a été utilisée pour observer la migration d'organelles à l'intérieur d'une cellule grâce à un marquage différent des mitochondries dans des parties différentes d'une même cellule [11]. Une technique similaire introduisant des paliers de température a permis l'étude des perturbations dues à la température lors du développement d'un embryon de *Drosophila* [139].

### 4.1.3 Outils d'analyse

Les applications de ces techniques de culture et de stimulation de cellules sont nombreuses, allant de sondes biologiques détectant des éléments pathogènes ou de pollution [140, 141] aux analyses biochimiques de cellules uniques [57, 142, 143] en passant par les études de culture et de différenciation de cellules souches [144, 145, 146]. Nous évoquerons dans ce paragraphe quelques exemples d'outils développés pour l'analyse des expérimentations de biologie cellulaire dans les microsystèmes dans le but d'illustrer les nombreuses possibilités qu'offrent les microsystèmes pour résoudre des problématiques biologiques.

#### Tri cellulaire

Le tri de cellules est l'une des thématiques principales concernant la manipulation de cellules dans les dispositifs microfluidiques puisque ces technologies rendent possible l'isolement et l'analyse de quelques cellules rares d'une large population lorsque ces dispositifs de tri sont couplés à des dispositifs d'analyse biochimiques. Les critères de tri se reposent sur les propriétés physico-chimiques des cellules, essentiellement les caractéristiques électriques, et la possibilité de marquage biochimique.

La possibilité d'intégrer facilement des électrodes dans les dispositifs microfluidiques a permis le développement et l'exploitation de la diélectrophorèse pour isoler, bouger et positionner les cellules [147, 148]. Cette technique permet alors, par exemple, d'isoler des cellules cancéreuses d'un échantillon sanguin [149] ou d'enrichir une population de cellules rares d'un facteur 200 à une vitesse de 10 000 cellule par seconde, vitesse comparable à celles atteintes dans les techniques macroscopiques, grâce à l'utilisation d'un marquage des cellules par des particules ayant des propriétés diélectriques particulières [150].

La miniaturisation des cytomètres de flux standards, FACS - *fluorescence activated cell sorters*, a fait l'objet d'une des premières applications des dispositifs comprenant des éléments de contrôle actif [54]. Les performances de ces systèmes restent très largement inférieures aux systèmes macroscopiques en terme de vitesse, souvent 100 cellules par secondes contre plus de 10 000 cellules par secondes, mais leur utilisation devient particulièrement intéressante sur les échantillons contenant peu de cellules, typiquement 100 000. Dans ce cas, les systèmes miniaturisés conservent leur efficacité de tri alors que le rendement chute fortement pour les systèmes conventionnels.

#### Outils d'analyse biochimique

Des efforts significatifs ont été déployés au fil des années pour le développement d'outils d'analyses biochimiques intégrés aux microsystèmes pour gagner en sensibilité et en pertinence vis-à-vis des objets mesurés. Une des problématiques non résolue aujourd'hui, et qui représente

un réel défi à réaliser dans les microsystèmes, est celle de l'analyse du protéome, l'ensemble des protéines présentes dans une cellule. En effet, une cellule est constituée d'un ensemble extrêmement complexe de protéines d'une grande variété, avec certaines protéines en grande abondance et d'autres extrêmement rares, les rapports d'abondance pouvant atteindre  $10^5$ . L'impossibilité d'amplifier les protéines, contrairement aux acides nucléiques comme l'ARN et l'ADN, rend l'analyse exhaustive des protéines présentes dans une cellule dans un état précis particulièrement problématique.

Parmi les outils de lyse cellulaire disponible dans les microsystèmes, l'utilisation de détergents, comme le Triton X-100 ou de SDS - sodium dodecyl sulfate -, [151] ou de l'électroporation grâce à l'intégration de microélectrodes [152, 153] sont particulièrement efficaces dans les microsystèmes. En comparaison aux techniques miniaturisées de lyse mécanique [154], les techniques précédentes assurent d'excellents taux d'extraction et constituent les meilleurs candidats pour l'extraction de molécules rares dans les cellules. Le choix entre ces deux méthodes sera déterminé par leur compatibilité avec les techniques d'analyses utilisées en aval.

Les outils de préparation des lysats développés en microsystèmes proviennent également directement des techniques macroscopiques habituelles, comme les techniques de séparation électrophorétiques diverses (électrophorèse capillaire [155], électrophorèse en gel [156], électrochromatographie [157] ou focalisation isoélectrique [158]) ou les techniques d'amplification d'acides nucléiques comme par exemple la PCR [159, 160]. L'adaptation dans les microsystèmes de ces techniques présente des avantages notables au niveau de l'amélioration des rendements et dans la diminution du temps de réaction. L'avantage majeur des microsystèmes réside en la facilité de coupler ces techniques de préparation des échantillons avec les techniques de détection, soit par mesure électrochimique, soit par simple marquage fluorescent. Le couplage de ces dispositifs d'analyse avec des spectromètres de masse afin d'accéder à la nature des produits obtenus est de plus en plus utilisé [161, 162]. En outre, le couplage de ces microsystèmes avec des « puces à ADN », à ARN ou même avec « puces à protéines » a été démontré [91, 163]. De nombreuses techniques originales tirant pleinement parti des avantages des caractéristiques des éléments microfabriqués comme les nanotubes de carbone [164], les nanofils de silicium [165] ou les cantilevers [28, 166] ont été développées pour offrir des alternatives aux détections par fluorescence ou luminescence.

Les nombreux travaux de recherche sur les systèmes microfluidiques d'analyse ont montré leur pertinence et leur efficacité dans la manipulation des échantillons de petit volume en combinant les étapes de préparation des échantillons, de séparation et d'analyse. De tels outils sont particulièrement intéressants pour leur potentiel révolutionnaire quant à la résolution de problématiques en biologie cellulaire, à l'instar des puces à ADN qui ont révolutionné le domaine de la génétique et qui ont été à l'origine de la génomique.

## 4.2 Modification des surfaces de culture

La manipulation de cellules vivantes dans les microsystèmes demande une bonne compréhension de leur comportement général dans les milieux confinés et sur les surfaces microstructurées. Nous avons développé au laboratoire quelques outils simples de modification des surfaces des microsystèmes dans le but d'une part de nous familiariser avec ces objets complexes que sont les cellules, et avec les techniques de culture cellulaire qui leur sont associées, et d'autre part de développer nos compétences autour de la thématique générale de manipulation de cellules

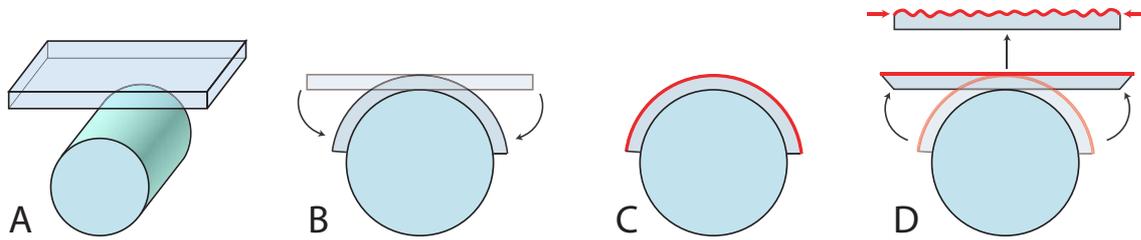


FIG. 4.1 – Schéma représentant les différentes étapes de fabrication de structures en vaguelettes. A et B. Une plaque de PDMS est plaquée et fixée sur un tube cylindrique pour déformer la face supérieure de l'élastomère. C. L'ensemble est traité au plasma pendant une durée d'environ 15 minutes pour permettre à une couche d'oxyde, représentée en rouge, de se former. D. Après le traitement au plasma, le dispositif est relâché délicatement du tube pour retrouver la forme initiale. Cependant, la surface représentée en rouge est devenue rigide à cause de la couche d'oxyde et ne peut pas retrouver la forme originale. La contrainte imposée par le restant du bloc de PDMS oblige alors un changement de topographie afin de minimiser les contraintes surfaciques.

vivantes dans les dispositifs microfluidiques. Ces outils n'ont pas été utilisés pour les analyses sur cellules présentées dans les travaux décrits dans ce manuscrit, mais constituent néanmoins un acquis extrêmement utile pour les améliorations éventuelles de nos microsystèmes.

#### 4.2.1 Microstructuration des surfaces

Les techniques traditionnelles de microfabrication facilitent la structuration des surfaces utilisées dans les dispositifs microfluidiques, essentiellement les substrats de verre et de PDMS par des étapes de gravure et de moulage. De nombreux travaux ont par ailleurs étudié la sensibilité des cellules vis-à-vis de structures de tailles et de formes différentes [167] et ont montré de grandes spécificités selon les types cellulaires [168]. La compréhension des mécanismes biologiques à l'origine de ces sensibilités reste approximative, mais les effets bien connus de guidage cellulaire selon ces structures peuvent être exploités avec facilité dans les microsystèmes. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la fabrication de microstructures parallèles en forme de vaguelettes [169] (figure 4.1 D). Ces structures présentent deux intérêts : le matériel nécessaire à leur fabrication se limite à une machine générant un plasma à air, ne nécessitant donc pas de salle blanche, et la surface générée est lisse, ne présentant aucune singularité anguleuse inhérente aux techniques de microfabrication habituelles. L'adaptation de cette technique a été effectuée dans le cadre d'un séjour de deux mois en Chine, au département de physique de l'Université de Pékin auprès du professeur Hang Ji et au Centre National pour les Nanosciences et les Technologies auprès des professeurs Dong Han et Xingyu Jiang.

#### Structures en vaguelettes

Les microstructures générées sont des structures parallèles et uniformes sur une longueur caractéristique de quelques millimètres. La coupe transversale du bloc de PDMS microstructuré présente à sa surface une sinusoïde régulière. L'amplitude et la période de ces structures sont respectivement typiquement de l'ordre de 100 nm et de 1  $\mu$ m.

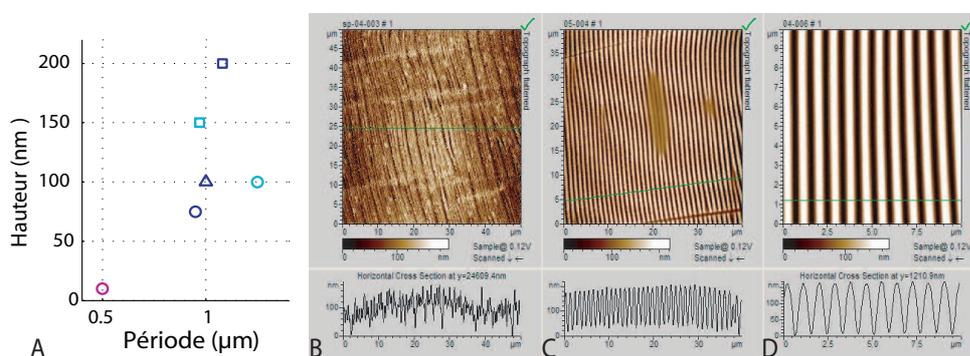


FIG. 4.2 – Caractérisation par AFM de surfaces microstructurées dans différentes conditions. A. Graphique récapitulatif des caractéristiques géométriques des surfaces. Il n'existe aucune corrélation claire dans les coordonnées des points. B, C et D. Topographies la surface microstructurée enregistrée lors de la caractérisation de ces surfaces par microscopie à force atomique. La condition la plus stable correspondant à l'image D a été choisie pour la culture de cellules.

La fabrication de ces vaguelettes s'effectue par l'oxydation d'un morceau de PDMS déformé autour d'un objet cylindrique, suivi de la relaxation du bloc d'élastomère afin qu'il retrouve sa forme initiale (figure 4.1). Après cette manipulation, nous observons systématiquement des irisations sur la face déformée et exposée au plasma. Les mécanismes décrivant la génération de telles structures [170, 171] peuvent être résumés de la manière suivante. La déformation du morceau de PDMS autour d'un objet cylindrique impose une contrainte mécanique sur la surface de l'élastomère, résultant en une extension de cette dernière le long de la circonférence du cylindre. Après son oxydation, une couche fine mais rigide d'oxyde se forme sur la surface du morceau de PDMS déformé. Ainsi, lorsque le morceau de PDMS, une fois relâché du cylindre, retrouve sa forme initiale, cette relaxation impose à nouveau une contrainte sur la surface exposée au plasma. Cependant, la rétraction naturelle de la surface grâce à l'élasticité du PDMS est rendu impossible par la présence de la couche rigide d'oxyde. Ceci résulte alors en la compression de la surface et en la formation de structures en trois dimensions pour soulager les contraintes surfaciques.

En variant différents paramètres caractéristiques de la fabrication, comme l'épaisseur de la couche d'oxyde ou la compression appliquée sur la surface relaxée, nous pouvons obtenir des vaguelettes d'amplitude et de périodicité variées. La figure 4.2 A illustre le résultat de la formation de telles structures à partir de blocs de PDMS de caractéristiques variées. Nous avons fait varier trois paramètres : i) la longueur du bloc de PDMS, qui fait augmenter avec elle la maniabilité du morceau de PDMS et qui permet un maintien de la forme du bloc pendant toute la durée de l'expérience ; ii) l'épaisseur du morceau de PDMS qui fait monter avec elle la résistance à la déformation de l'élastomère ; iii) le taux de réticulant des blocs de PDMS qui joue un rôle principal dans l'élasticité du PDMS.

L'expérience s'est révélée très peu reproductible en dehors de la condition standard se rapprochant de celle décrite dans le travail du professeur Jiang [169]. Ceci est représenté par les images B, C et D de la figure 4.2 représentant la topographie de surface oxydée du bloc de PDMS, obtenues par microscopie à forces atomiques (AFM). Sur l'ensemble des échantillons réalisés, nous avons choisi un morceau de PDMS avec une proportion volumique de réticulant de 6%, de 2 mm d'épaisseur et de 3 cm de longueur. Les dispositifs microfluidiques habituels

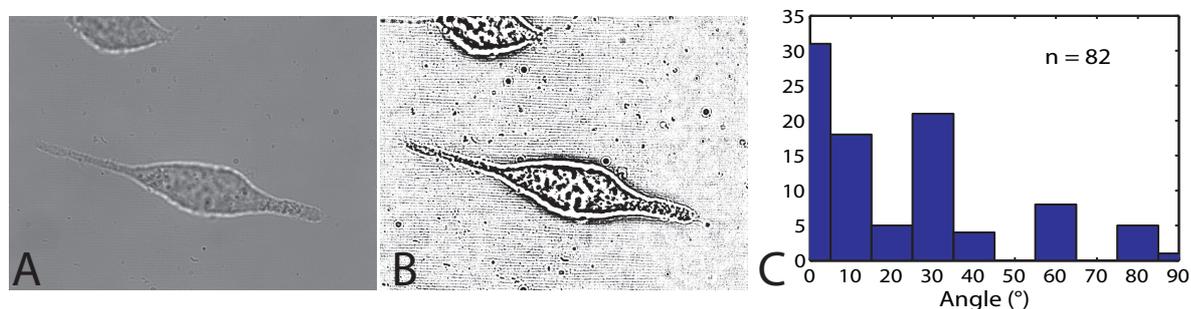


FIG. 4.3 – A. Microphotographie d'un fibroblaste 3T3 sur les structures en vaguelettes. B. Traitement d'image pour ensuite faire la détection automatisée des angles. C. Répartition des angles entre la cellule et les structures, mesures effectuées sur 82 cellules. Nous observons un guidage incomplet des cellules par nos microstructures.

sont réalisés avec une proportion volumique de réticulant de 10%. Cependant, l'utilisation de ce rapport donnait des morceaux de PDMS très probablement trop rigides, et leur surface microstructurée était parsemée de brisures visibles au microscope. Par ailleurs, les vaguelettes, quoique présentes, étaient trop petites et cassantes pour être détectées par microscopie à forces atomiques. Au contraire, en passant à une proportion plus faible de 5%, nous avons obtenues des vaguelettes faciles à caractériser, mais dont la périodicité était variable selon l'endroit du morceau de PDMS, ce qui peut être expliqué par une répartition non homogène du réticulant lors du mélange avant la cuisson de l'élastomère. Les quelques caractéristiques de hauteur et de périodicité des microstructures obtenues sont représentées dans la figure 4.2 A. Nous ne décrivons pas plus les résultats obtenus car ils ne représentent aucune tendance fiable et reproductible.

Cette méthode permet néanmoins d'obtenir des substrats de caractéristiques variables, dont la période peut varier entre 500 nm et 1,5  $\mu\text{m}$  et dont l'amplitude peut varier de quelques dizaines de nanomètres pour atteindre 200 nm. La reproduction et la caractérisation systématique des surfaces obtenue pourraient déterminer un protocole fiable pour la fabrication de vaguelettes de caractéristiques variées.

### Détection de l'orientation des cellules

Après la fabrication de moules à partir de ces structures en vaguelettes, de nombreux substrats de PDMS microstructurés ont été réalisés et stérilisés. Une étape importante de trempage pendant 24 heures des substrats dans de l'eau déionisée stérile, renouvelée à trois reprises, a été nécessaire pour éliminer toute trace de produit anti-adhésif nocif utilisé lors du moulage du PDMS. Des fibroblastes 3T3 ont ensuite été cultivés sur ces substrats.

Les premiers résultats obtenus ont montré une orientation des cellules selon le sens des rigoles, formées par les vaguelettes, dans la moyenne, mais l'effet n'est pas franc. Comme nous le montre l'histogramme 4.3, sur l'ensemble des cellules analysées, seulement une moitié s'oriente avec les microstructures. Notons néanmoins que les cellules avaient une morphologie inhabituellement arrondie, et ce même lorsqu'elles étaient cultivées sur boîte de Petri standard. L'étude prévue qui consistait à influencer le guidage des cellules sur un tel substrat en variant les caractéristiques topographiques et les caractéristiques de chimie de surface a été gelée pour des raisons techniques.

Malgré le peu de données expérimentales, nous avons néanmoins poursuivi ce travail par l'éta-



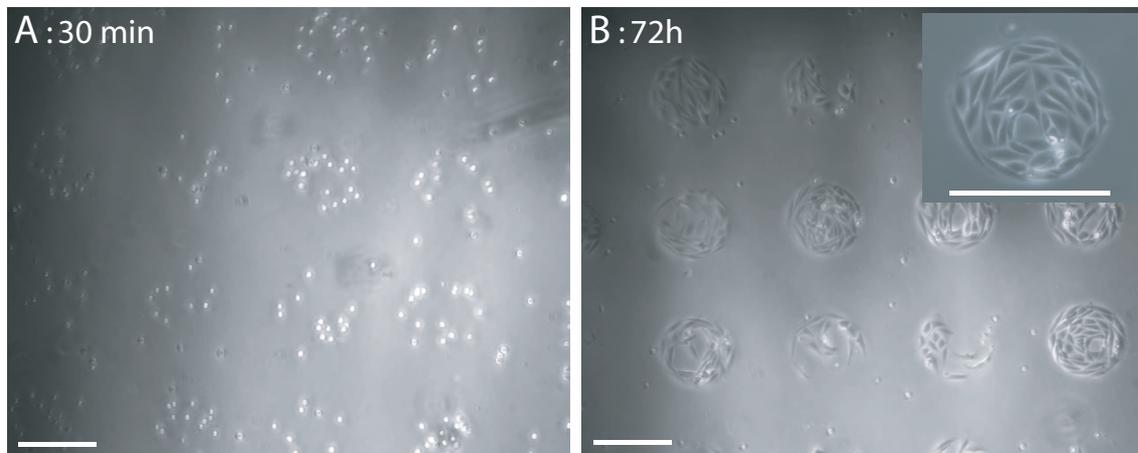


FIG. 4.5 – Microphotographies de la culture de cellules RPE1 30 minutes après l'ensemencement (A) et après 72 heures de culture (B). Les cellules sont effectivement spatialement confinées par les motifs circulaires de  $200\ \mu\text{m}$  de diamètre.

le protocole de fonctionnalisation des surfaces de verre et de PDMS établi au laboratoire par Zhiling Zhang [172] pour la culture de fibroblastes de souris S180. Cette lignée cellulaire est particulièrement sensible à la chimie de surface et à la présence de protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine. Le protocole de fonctionnalisation peut se résumer en un changement à chaque étape de la fonction chimique de la surface en y greffant une succession de molécules bifonctionnelles capables de réagir et de se lier covalamment à la surface (figure 4.4 A).

Ainsi, après l'oxydation au plasma des lames de verre et des blocs de PDMS contenant les empreintes des microcanaux et leur assemblage irréversible, une série de réactions chimiques ont été effectuées dans les microcanaux. Ces réactions permettent dans un premier temps le greffage sur les fonctions hydroxyles  $-\text{OH}$  présentes sur le verre et le PDMS d'une chaîne polycarbonée terminant en un groupement amine  $-\text{NH}_2$  et dans un deuxième temps de greffer sur ces groupements amines des protéines (figure 4.4 A). Ces protéines sont alors liées à la surface des microcanaux par des liaisons covalentes stables. Les protéines que nous utilisons pour améliorer notre culture cellulaire sont des anticorps polyclonaux reconnaissant la fibronectine. Ainsi, une fois la fonctionnalisation en anticorps effectuée, une solution de fibronectine est incubée dans les microcanaux. Cette fonctionnalisation indirecte assure une meilleure biodisponibilité de la fibronectine puisque les anticorps utilisés reconnaissent différents épitopes et donc immobilisent différentes parties de la fibronectine.

La figure 4.4 B illustre l'amélioration apportée par une telle fonctionnalisation des microcanaux pour l'immobilisation et la culture des fibroblastes de souris.

### 4.2.3 Décoration chimique des surfaces

Un des grands succès de la microfabrication dans les expériences de biologie concerne le modelage de contours micrométriques, *multipatterning*. Ce paragraphe décrira deux techniques de *multipatterning* utilisées au laboratoire, la première directement adaptée d'un protocole fourni par Matthieu Piel, chargé de recherche à l'UMR 144 à l'Institut Curie, et la deuxième entièrement

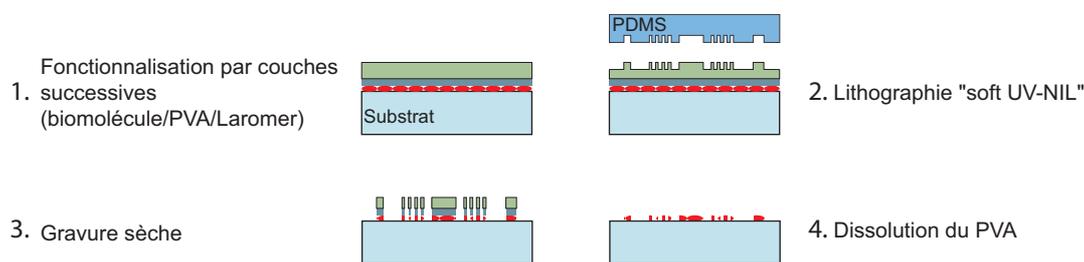


FIG. 4.6 – Schéma de principe du transfert de motifs de biomolécules par GLM.

inventée par Jian Shi, doctorant du laboratoire. Nous nous permettons ici d'exposer ces deux techniques qui complètent parfaitement les acquis permettant de mieux contrôler la manipulation de cellules vivantes dans les microsystèmes.

### Microcontact Printing

La première technique est le *Microcontact Printing*, une technique d'impression de motifs de petite taille par contact conforme entre le substrat et le tampon en élastomère. L'encre utilisée est une solution aqueuse contenant un mélange de molécules promotrices de l'adhésion cellulaire, CAM - *cellular adhesion molecule*. Ainsi, après la mise en contact du tampon et du substrat, les molécules constituant l'encre seront transférées selon des motifs précisément définis par les structures du tampon.

Pour nos utilisations, le tampon de PDMS, fabriqué par les techniques usuelles de lithographie molle, est préalablement stérilisé, puis la surface contenant les structures est plongée dans une goutte de solution aqueuse stérile contenant les molécules choisies à une concentration de  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  durant 45 minutes. En parallèle, le substrat de verre est également nettoyé et stérilisé avant l'impression. Une fois le tampon séché, il est mis en contact sur le substrat durant 5 minutes et est ensuite délicatement retiré. Le substrat est ensuite rincé à l'eau stérile déionisée et peut éventuellement être mis à chauffer à  $140^\circ\text{C}$  pendant 30 secondes afin de fixer les protéines. Une étape de passivation des surfaces non imprimée est ici nécessaire pour rendre ces surfaces neutre vis-à-vis des cellules. Cette étape est assurée par une incubation pendant une heure du substrat dans un tampon (HEPES 10 mM) contenant un copolymère PLL-*g*-PEG, - poly(L-lysine)-*graft*-poly(éthylène glycol), à  $0,1-0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ . La partie poly(L-lysine) du copolymère assure une adsorption effective sur la surface de verre par des effets électrostatiques, alors que la partie poly(éthylène glycol) garantit la réduction d'adsorption de protéines ainsi que des interactions avec les cellules. L'efficacité de cette passivation dépend fortement de l'architecture de la molécule, c'est-à-dire de la combinaison de la masse moléculaire des chaînes de PEG et de leur densité de greffage sur la chaîne principale. Des détails du protocole de *Microcontact Printing* peuvent être trouvés dans l'annexe C, page 185. Après le rinçage du substrat dans un tampon PBS, celui-ci est immédiatement utilisé pour le dépôt des cellules et leur culture (figure 4.5).

### Transfert de motifs par Nanoimprint - GLM

Cette technique, nommée GLM - *General Lithography Method for biomolecules patterning* par son inventeur, consiste en l'immobilisation des molécules sur toute la surface du substrat,

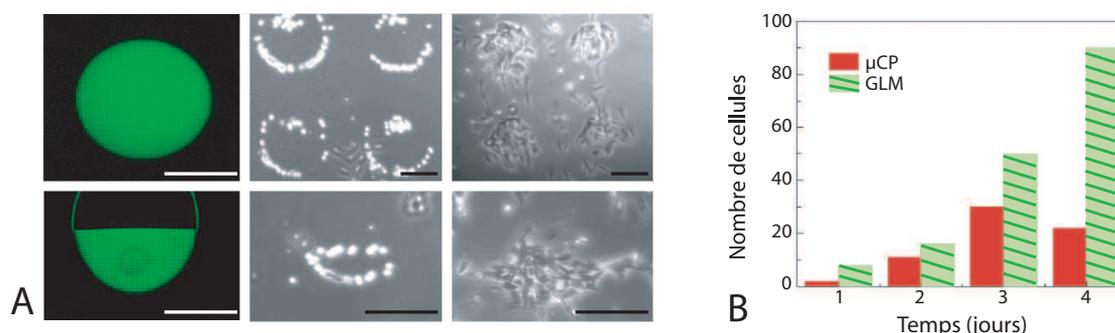


FIG. 4.7 – A. Microphotographies de la culture de cellules RPE1 à des temps successifs sur les motifs de poly-L-lysine déposés par GLM. Les cellules adhèrent préférentiellement sur le pourtour avant de s'étaler sur le centre du motif. B. Comparaison du nombre de cellules en cultures sur des motifs identiques déposés par *microcontact printing* et par GLM, dans des conditions d'ensemencement et de culture équivalentes. Les motifs déposés par GLM semblent à première vue plus stable que les motifs déposés par *microcontact printing*.

puis en leur élimination aux emplacements prévus par gravure sèche de l'ensemble protégé au préalable par une double couche, de polymère protecteur et de résine photosensible structurée. Cette technique est née d'un couplage astucieux entre la mise au point précise des étapes de la gravure sèche d'une part et d'autre part la parfaite maîtrise de la technique de lithographie molle assistée par la nanoimpression et l'exposition aux UV, UV-NIL - *soft UV nanoimprint lithography*. La clé de voûte de cette technique repose sur l'utilisation d'une couche de polymère protectrice, soluble à l'eau, éliminant l'utilisation de solvants organiques lors des étapes de microfabrication.

Dans cette étude (figure 4.6), la poly(L-lysine) fluorescente est utilisée pour créer des motifs promoteurs d'adhésion cellulaire observables par microscopie. Ainsi, un substrat en verre préalablement nettoyé et stérilisé a été plongé dans une solution contenant la PLL-FITC pour obtenir un dépôt uniforme. Après un rinçage et un séchage du substrat, une couche protectrice de 400 nm de PVA, alcool polyvinylique à 4%, a été déposée avec une tournette. Après une étape de chauffage de 30 secondes à 100 °C, une couche de 220 nm d'épaisseur de résine photosensible, Laromer, est déposée. Un moule en PDMS a été utilisé pour transférer les structures sur la résine photosensible par simple impression. Pendant l'impression, la résine a réticulé grâce à une exposition simultanée aux UV à une énergie de 7 Joules/cm<sup>2</sup>. Une fois le moule retiré, l'ensemble du substrat et de ses trois dépôts, PLL-FITC, PVA et Laromer structuré, sont introduit dans une machine dédiée à la gravure sèche, la RIE - *Reactive Ion Etching*, pour les différentes étapes de gravure. Une première étape consiste à graver uniquement la couche de résine de telle sorte que seule la partie imprimée par le moule disparaisse et qu'il ne reste plus qu'un relief de résine correspondant aux parties à protéger. Ensuite, le PVA est gravé ainsi que la PLL-FITC correspondante sont éliminés par plasma oxygène. Ces étapes ne sont pas nocives pour les molécules protégées par la double couche de PVA et de Laromer. Une fois la gravure sèche effectuée, le substrat est nettoyé à l'eau stérile déionisée par sonication. Cette étape permet la dissolution du PVA et l'élimination de la couche résiduelle de Laromer. Enfin, avant l'utilisation du substrat contenant des structures de poly(L-lysine), l'ensemble est plongé dans une solution de PLL-*g*-PEG pendant une heure pour la passivation des surfaces ne contenant pas de molécule

adhérente. Des motifs de poly(L-lysine) de 400 nm ont pu ainsi être déposés sur un substrat de verre.

Nous avons utilisé les deux techniques, *microcontact printing* et GLM, pour transférer des motifs identiques de poly(L-lysine)-FITC sur un substrat en verre et réaliser une culture de cellules RPE1 - *retinal pigment epithelial cells*, issues de l'épithélium pigmentaire de la rétine. La qualité des motifs déposés est comparable, mais la culture des cellules pendant plusieurs jours semble montrer une meilleure stabilité des motifs déposés par GLM. La figure 4.7 A montre l'évolution de la culture des cellules RPE1 sur des motifs en forme de disques de 120  $\mu\text{m}$  de diamètre contenant un réseau de points de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il est à noter que les cellules évoluent préférentiellement sur la circonférence du disque de plus grande taille puisqu'il semble y avoir une plus grande concentration de molécules adhérentes, comme le montre l'impression d'un disque partiellement rempli du réseau de points (figure 4.7, ligne du bas). Pour les motifs déposés par GLM, les cellules prolifèrent jusqu'à la colonisation des espaces passifs. Ceci peut être expliqué par la dégradation du dépôt de PLL-*g*-PEG passivant les espaces non adhérents également observée dans la littérature [173]. Au contraire, pour les motifs déposés par *microcontact printing*, les cellules prolifèrent pendant les quatre premiers jours puis se détachent progressivement du substrat. Ceci peut être expliqué par la dégradation, cette fois, des motifs adhérents, probablement dû à la maîtrise seulement partielle de la technique de *microcontact printing*. A ce stade de l'étude, nous ne pouvons réellement conclure de la plus grande efficacité d'une technique par rapport à une autre. Des analyses plus exhaustives, contrôlant plus exactement le nombre initial des cellules déposés et le taux de croissance moyen par motif, seront nécessaires pour déterminer les limites de chacune des techniques. La seule conclusion que nous pouvons établir *a priori* est qu'à expérience d'utilisation égale, pour le dépôt de poly(L-lysine) sur le verre, la méthode de GLM semble produire des motifs plus stables que *microcontact printing*. Il ne faut néanmoins pas oublier que la méthode de GLM n'a pas encore été testée avec d'autres molécules que la poly(L-lysine), notamment des protéines, plus fragiles, qui risquent d'être dénaturées par l'irradiation aux UV par exemple.

### 4.3 Manipulation de cellules vivantes en milieu confiné

La culture cellulaire dans les dispositifs microfluidiques n'est pas une chose triviale et demande une mise au point expérimentale extrêmement précise, quels que soient les types cellulaires utilisés. A travers le développement de la culture cellulaire de deux types de cellules différentes utilisées pour des analyses de réactivité cellulaire décrites plus tard dans ce manuscrit, nous dégageons quelques notions à prendre en considération lors de mise en place de cultures cellulaires dans des microsystèmes. Les cellules utilisées sont, d'une part, des RAW 264.7, une lignée de macrophages de souris souvent utilisée pour l'étude de nombreuses problématiques liées au métabolisme, à l'inflammation et à l'apoptose, et d'autre part, des cellules souches mésenchymateuses, CSM, humaines ou murines, qui sont des cellules multipotentes<sup>1</sup> à l'origine des différents tissus du feuillet mésodermique<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Des cellules multipotentes sont des cellules capables de se différencier en divers tissus d'un même feuillet, contrairement aux cellules pluripotentes qui sont cultivées à partir de tissu foetal humain et capables de produire les cellules des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, ectoderme et endoderme).

<sup>2</sup>Le feuillet mésodermique est à l'origine des tissus mésenchymateux constitués d'os, de cartilage, de muscles, de moelle osseuse, de tendons et de ligaments, et d'autres tissus conjonctifs.

Ces travaux ont été réalisés tout au long de la durée de cette thèse grâce aux collaborations successives avec plusieurs stagiaires, doctorants et post-doctorant du laboratoire. Notons tout particulièrement les contributions précieuses d'Issa Tapsoba lors de l'établissement des conditions de culture des macrophages et de Xiaofang Ni lors de l'établissement des conditions de culture des deux types de CSM.

### 4.3.1 Considérations sur la géométrie des chambres de culture

Les macrophages RAW 264.7, par nature des cellules partiellement circulantes, sont des cellules robustes qui supportent remarquablement les flux de liquide dans un système confiné. Ainsi, leur culture nous a donné une marge de manœuvre appréciable, contrairement à d'autres types cellulaires dont nous avons entrepris la manipulation dans les microsystèmes, comme par exemple les embryons de Xénope qui auraient été un modèle d'étude particulièrement pratique, mais qui à l'utilisation supportent très mal le confinement des microcanaux. Ainsi, nous avons concentré pleinement nos efforts sur la conception du système expérimental de culture cellulaire. Un autre avantage de la culture des macrophages dans les microsystèmes est la tolérance de ces cellules aux substrats de verre et de PDMS, ne nécessitant alors aucun traitement surfacique particulier.

Les caractéristiques géométriques des chambres de culture ont une grande influence sur la répartition des flux dans les dispositifs microfluidiques. Au regard des nombreux travaux de culture cellulaire effectués dans les microsystèmes, ainsi que des différents modèles de chambres cellulaires conçues, la géométrie des chambres de culture, pour la plupart des types cellulaires, doit respecter les contraintes pratiques suivantes :

- le flux de milieu doit générer le minimum de cisaillement sur la population de cellule en culture ;
- le temps de renouvellement du milieu dans la chambre doit être adaptable selon le métabolisme des cellules en culture, mais doit rester largement négligeable devant la durée du cycle cellulaire d'une cellule, généralement au-delà de 12 heures ;
- le chargement des chambres de culture en cellules doit être relativement homogène pour permettre des analyses quantitatives non biaisées.

Une des solutions les plus efficaces pour respecter les deux premières contraintes est d'utiliser des dispositifs contenant des canaux de différentes tailles permettant la perfusion des chambres en milieu de culture [125, 174, 175] rapidement mais avec un minimum de perturbation pour les cellules. Cependant, la fabrication de tels dispositifs n'est pas toujours aisée, notamment lors de la mise en place des expériences d'analyse qui nécessitent souvent des changements de géométrie pour résoudre des problématiques d'ordre pratique.

Il est à noter que la présence de bulles d'air dans des dispositifs de culture cellulaire en microsystème se traduit systématiquement par la dégradation des cultures à cause des blocages éventuels des microcanaux et de la perturbation des flux. Ces bulles d'air proviennent soit de l'air résiduel lors du premier remplissage des dispositifs, soit des bulles qui s'introduisent dans les microcanaux à cause de la non étanchéité des connexions fluidiques ou lorsque le milieu est traité pendant la culture par bullage au  $\text{CO}_2$  et au  $\text{O}_2$ . Nous avons résolu le problème causé par l'apparition de bulles d'air en prenant les précautions suivantes :

- l'utilisation du PDMS favorise les échanges de gaz et élimine la nécessité de traiter le milieu de culture au  $\text{CO}_2$  et au  $\text{O}_2$  ;

- l'élimination de géométries angulaires diminue le piégeage de l'air résiduel ou de bulles d'air dans le dispositif;
- la vérification de la qualité du dispositif tout particulièrement au niveau des connexions fluidiques minimise l'entrée d'air pendant la culture cellulaire et diminue l'accumulation de débris cellulaires;
- lors du nettoyage préalable à la stérilisation, le dispositif rempli est placé sous une cloche à vide pour éliminer tout résidu gazeux;
- en utilisant l'assemblage réversible par micro-aspiration des dispositifs microfluidique, la présence de bulles d'air est totalement empêchée par le vide relatif présent dans la cavité de micro-aspiration : le dispositif est constamment dégazé; notons que cet effet peut être nocif vis-à-vis des cellules puisque le vide relatif pourrait perturber l'équilibre des gaz à travers les mailles de l'élastomère.

#### 4.3.2 Notion de flux idéal pour chaque configuration

Le débit de perfusion du milieu de culture nécessaire dans les dispositifs varie grandement en fonction du type cellulaire, qui aura un métabolisme spécifique et une sensibilité au cisaillement du flux de milieu plus ou moins grande; de la géométrie des chambres de culture, influant pour un même débit imposé sur les vitesses locales de flux; et enfin de la manière pratique dont le milieu sera perfusé. Il a été ainsi nécessaire, pour chaque changement de configuration de culture cellulaire, de réadapter expérimentalement les débits de perfusion en fonction de ces paramètres.

Notons que ces mises au point sont particulièrement consommatrices en temps et en main d'œuvre. En effet, les cultures doivent être répétées pour s'assurer de l'influence des différents paramètres et il est parfois difficile d'expliquer l'échec d'une expérience, souvent justifiée *a posteriori* par une perturbation de l'environnement du laboratoire ou le vieillissement des lignées cellulaires.

Type cellulaire	Géométrie	Configuration d'injection	Débit
RAW	1 chambre $section = 100 * 5.10^3 \mu m^2$	pousse-seringue	0,1 $\mu L/min$
CSM	8 chambres $section = 8 * 50 * 5.10^3 \mu m^2$	pousse-seringue	0,3 $\mu L/min$
		dépression par pompe à vide	0,1 $\mu L/min$
	8 petites chambres $section = 8 * 50 * 10^3 \mu m^2$	pousse-seringue	0,1 $\mu L/min$

TAB. 4.1 – Comparaison des vitesses de perfusion pour les différentes géométries de chambre de culture qui ont abouti à la survie des cellules pendant au moins 10 jours.

La circulation constante du milieu de culture au-dessus des cellules adhérentes impose une condition de culture particulière puisque le milieu est constamment renouvelé. Cette nécessité dans un milieu confiné de maintenir un apport continu de milieu frais et une élimination continue des produits du métabolisme cellulaire peut brider certains comportements de groupe importants pour la prolifération cellulaire et empêcher la communication intercellulaire. Cet aspect n'est pas abordé dans nos études mais fait partie des prochaines problématiques que nous devons résoudre pour mieux comprendre les effets de la culture confinée des cellules. Il sera tout particulièrement

intéressant d'envisager un système de recyclage d'une partie du milieu ayant déjà traversé la chambre de culture. La notion de force de cisaillement appliquée sur les cellules par un tel flux est à envisager afin de bien définir son influence.

### 4.3.3 Importance de la densité d'ensemencement

La culture cellulaire commence par l'ensemencement des cellules dans les chambres de culture. Cette étape est difficile à contrôler et la densité d'ensemencement est souvent variable d'une culture à l'autre. Or, ce paramètre est important pour la comparaison efficace des paramètres quantitatifs comme le taux de croissance. Le contrôle de l'adhésion des cellules sur leur substrat dans les moments suivant l'ensemencement est crucial pour la survie de l'ensemble de la population de la chambre de culture. Il semblerait qu'en-dessous d'une certaine densité, la culture se dégrade très rapidement. Cette densité limite, observée également dans les cultures en boîte de Petri, semble particulièrement élevée pour les microsystemes.

Nous avons donc conçu un dispositif qui, par la géométrie des canaux, distribue les cellules de manière inégale dans des chambres de culture de taille comparable (partie droite de la figure 4.8). La présence de séries de piliers en travers de chaque chambre de culture, au nombre de huit par dispositif, perturbe le flux des cellules et favorise leur adhésion dans zones les plus proches de l'entrée des cellules, correspondant à la zone 4 dans le graphe et le schéma. Nous avons ainsi observé l'évolution des cellules dans chacun de ces compartiments pendant les premières phases de culture. La figure 4.8 permet de comparer la variation de la densité cellulaire. Les chambres de cultures en parallèle sont considérées de conditions comparables. Ainsi, pour effectuer notre analyse, nous avons effectué une moyenne sur chaque zone, sur l'ensemble du dispositif. Cette première étude nous indique une plus grande cinétique de prolifération dans la zone 4, située en entrée des chambres de mesures, par rapport aux zones de plus faible densité. Il conviendra de vérifier, par une expérience où l'arrivée du milieu frais dans la chambre se fait par la zone 1, que cet effet n'est pas lié au sens du flux. En effet, en traversant une zone particulièrement dense en cellules, le milieu de culture se charge de déchets beaucoup plus rapidement et peut nuire à la prolifération cellulaire. Il conviendra par ailleurs de multiplier ces mesures, en variant les densités initiales avant d'affirmer le rôle important de la densité d'ensemencement des cellules sur la culture cellulaire dans un dispositif microfluidique.

Nous avons de plus remarqué que la prolifération des CSM dans les dispositifs était nettement plus lente que dans les boîtes de Petri. Dans la suite de ce travail, il sera également intéressant d'effectuer des comparaisons plus quantitatives des cinétiques de prolifération cellulaire, en partant de densité d'ensemencement égale.

Kim *et al.* ont publié tout dernièrement une revue particulièrement utile pour la conception des expériences de culture cellulaire, reprenant tous les travaux publiés à ce jour de culture de cellules adhérentes dans des microsystemes et analysant les problématiques liées aux conditions de perfusion du milieu de culture dans les dispositifs [176]. Les conclusions qui s'en sont dégagées sont tout à fait similaires à celle de notre étude.

## 4.4 Conclusion

Nous avons vu que la microfluidique fournissait des outils intéressants pour manipuler et analyser les cellules vivantes, les placer dans un micro-environnement entièrement contrôlé pour les

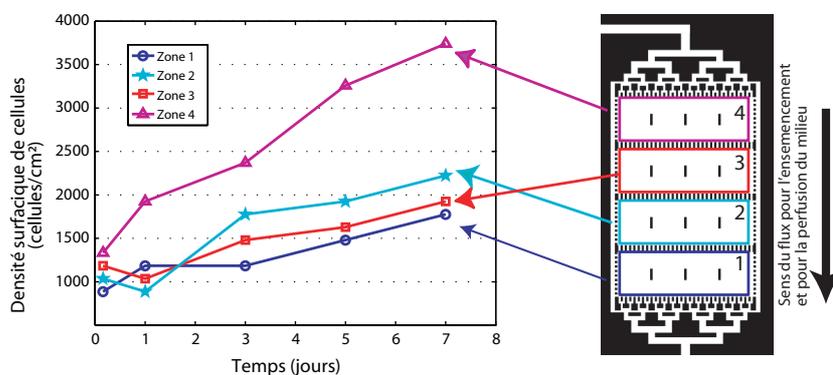


FIG. 4.8 – Graphe représentant la variation de la moyenne des densités surfaciques des cellules CSM pour chaque zone de notre dispositif présenté sur la droite. Les zones blanches du dispositif correspondent aux canaux et aux chambres fluidiques ( $5 \times 8 \text{ mm}^2 \times 50 \mu\text{m}$ ) et le dispositif est constitué de 8 chambres en parallèle, toutes équivalentes. Chaque chambre est divisée en quatre compartiments ou zones entre lesquelles, lors de l'ensemencement, la densité en cellules sera variée. En effet, la présence de piliers séparant chaque compartiment crée un « embouteillage » résultant en l'accumulation de cellules dans la zone 4, puis 3, puis 2. Ce fait est bien représenté par la variation de la densité initiale de cellules.

stimuler de manière originale et les analyser grâce aux différents outils optiques et de biochimie développés ces dernières années. Dans le but de développer un certain savoir-faire au laboratoire concernant la manipulation de cellules, nous avons mis en place des techniques de gestion des surfaces des microsystèmes et de culture cellulaire en milieu confiné. De cette manière, nous avons abouti à des outils nous permettant la conception et la fabrication de milieux confinés complexes, avec des surfaces micro- et nanostructurées, décorées ou non chimiquement. De plus, la recherche de conditions de culture stables pour certains types cellulaires nous a permis de mieux comprendre le comportement de ces cellules dans les dispositifs microfluidiques. C'est ainsi que nous sommes amenés à manipuler ces cellules dans des dispositifs destinés à l'analyse de réactivité cellulaire comme nous allons le voir dans le prochain chapitre.



## Chapitre 5

# Contrôle dynamique du micro-environnement cellulaire

Grâce aux outils de culture cellulaire dans les dispositifs microfluidiques développés dans le chapitre précédent, nous avons mis en place des montages expérimentaux destinés à sonder la réactivité cellulaire selon une approche analytique. Nous présentons dans ce chapitre deux thématiques que nous avons développées dans le laboratoire, consistant à sonder i) un ensemble de cellules en culture et ii) des cellules uniques ou de petits groupes de cellules.

Dans un premier temps, nous établiront les bases du contrôle en volume de stimuli chimiques sur une population de cellules adhérentes en culture. Nous appliquerons ce système à l'induction de la différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses. Dans un deuxième temps, nous détaillerons la manipulation des cellules de macrophages dans un dispositif de positionnement cellulaire destiné à l'analyse électrochimique de cellules uniques ou de groupes de cellules en faible nombre.

Notons que les travaux concernant la différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses sont issus d'une collaboration avec Luc Sensebé directeur médical scientifique, et son équipe de recherche, à l'Etablissement Français du Sang de Tours. La réalisation au laboratoire a été effectuée avec la participation active de Xiaofang Ni, doctorante.

**5. Contrôle dynamique en volume**

---

<b>5.1</b>	<b>Induction chimique de cellules en culture . . . . .</b>	<b>93</b>
5.1.1	Cadre des expériences . . . . .	93
5.1.2	Premier essai de différenciation cellulaire . . . . .	94
5.1.3	Vers la différenciation neuronale des CSM . . . . .	97
<b>5.2</b>	<b>Positionnement cellulaire dans un microsysteme . . . . .</b>	<b>102</b>
5.2.1	Cadre de l'étude . . . . .	102
5.2.2	Répartition des cellules dans les chambres . . . . .	103
5.2.3	Viabilité des cellules . . . . .	105
<b>5.3</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>105</b>

---

## 5.1 Induction chimique de cellules en culture

Une des particularités de la microfluidique que nous exploitons ici est la gestion automatisée des flux et des mélanges pour réaliser un criblage de stimuli chimiques<sup>1</sup> sur une population de cellules adhérentes. Aujourd'hui, ce type d'expérimentation se fait, dans les laboratoires de biologie, dans des puits de culture miniaturisés dans un volume de quelques microlitres. L'intérêt d'effectuer ces expérimentations dans un dispositif microfluidique ne réside donc pas dans la miniaturisation, puisqu'un nombre minimal de cellules adhérentes à interroger est déjà atteint dans les conditions actuelles et qu'il est donc inutile de réduire les surfaces de culture, mais réside plutôt dans le contrôle automatisé de l'environnement des cellules. Cette automatisation nous permettrait alors d'orienter nos efforts non pas dans la gestion des volumes, à travers des étapes laborieuses de micropipetage comme aujourd'hui, mais plutôt dans l'étude de l'influence de combinaisons de paramètres pour rendre le contrôle des stimuli plus fin. Nous décrivons dans ce paragraphe l'établissement d'un microsystème permettant de contrôler, dans le temps et dans l'espace, la nature du milieu introduit dans les chambres microfluidiques contenant différentes densités de cellules. Ce microsystème sera utilisé dans un premier temps pour reproduire des expériences de différenciation cellulaire connues avant de réaliser le criblage des différents paramètres des stimuli appliqués aux cellules. Ceci nous permettra de mieux comprendre les mécanismes à l'origine du déclenchement de la différenciation cellulaire et d'établir des protocoles complets d'induction de différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses (CSM) vers différents tissus biologiques.

### 5.1.1 Cadre des expériences

Nous nous intéressons, dans cette étude, au contrôle des voies de différenciation des cellules souches mésenchymateuses dans un environnement nouveau que constitue le dispositif microfluidique. Les CSM sont des cellules pluripotentes dont le prélèvement et la culture sont relativement aisés et dont l'utilisation possède un grand potentiel thérapeutique [177]. De grands efforts sont mis en œuvre pour générer, à partir de cellules que l'on peut facilement se procurer comme les CSM, des tissus qui ne se régénèrent pas naturellement dans le corps humain. Ainsi, il a été montré que les CSM peuvent être induites vers la voie de différenciation neuronales, donnant des cellules présentant des caractéristiques neuronales dans la morphologie et dans les protéines exprimées [178]. La bonne compréhension de la réactivité cellulaire vis-à-vis d'une telle induction permettra d'aboutir un jour à la production de tissus neuronaux pour des utilisations cliniques. Par ailleurs, la culture et la différenciation de cellules souches ont fait l'objet de quelques travaux relevés dans la littérature scientifique [145], mais de telles études n'ont d'une part jamais été effectuées avec les CSM et n'ont d'autre part pas fait varier les stimuli dans le temps comme le nécessite le protocole que nous utiliserons pour l'induction des CSM dans la voie de différenciation neuronale. C'est ce couplage entre la stimulation des CSM et le contrôle dans le temps de stimuli variés que nous souhaitons réaliser dans ce travail.

Nous partons donc du savoir faire de nos collaborateurs biologistes sur la culture, la stimulation et l'analyse des CSM ainsi que de nos propres systèmes de cultures en microsystèmes

---

<sup>1</sup>La réalisation d'un criblage de stimuli chimiques dans un dispositif microfluidique est facilitée par la gestion fiable des fluides dans de tels microsystèmes. Un système de mélange automatisé des fluides peut par exemple irriguer les chambres de culture de milieux contenant des inducteurs solubles à des concentrations variées. Il est également possible de varier des paramètres supplémentaires tels la densité cellulaire, l'état de surface des chambres de culture ou même la forme des cellules.

de ces mêmes cellules pour réaliser des inductions chimiques différenciées dans les chambres de cultures en parallèle. Comme nous allons le voir dans cette étude, la nature même des stimulations est modifiée par rapport aux expérimentations dans les puits où il suffisait de changer régulièrement le milieu dans lequel baignent les cellules. Ces stimulations consistaient en l'exposition des cellules à une série de mélanges de facteurs solubles différents pendant plusieurs semaines. Notre objectif premier a donc été de maîtriser la perfusion séquentielle de ces mélanges dans des concentrations adaptées, et ce pendant plusieurs jours, tout en maintenant la réactivité cellulaire.

Par ailleurs, l'analyse des inductions chimiques de la différenciation cellulaire se fait par immunofluorescence ou par analyses biochimiques à travers des puces à ADN. La deuxième problématique liée à cette étude est donc celle de l'adaptation de nos systèmes aux techniques d'analyses de routine. Le PDMS étant transparent, le suivi journalier des cellules par microscopie est aisé. Cependant, lors d'observations microscopiques par fluorescence, l'élastomère génère un bruit de fond conséquent, peu recommandable pour les analyses par immunofluorescence. Nous avons été amenés à faire des choix techniques afin de faciliter les analyses et l'accès aux cellules après l'induction chimique et d'éviter un travail de fond d'optimisation de protocoles de marquage cellulaire dans les microsystèmes.

### 5.1.2 Premier essai de différenciation cellulaire

Pour nous familiariser avec l'induction chimique de cellules en culture dans les microsystèmes, nous avons effectué une première expérimentation consistant en la différenciation de CSM humaines en adipocytes, des cellules présentes dans le tissu adipeux et spécialisées dans le stockage de lipides. Ce choix est justifié par la simplicité du protocole d'induction d'une part, nécessitant un seul type de milieu de différenciation, et d'autre part, par l'aisance de la détection du résultat de la différenciation, les adipocytes étant chargées de vésicules lipidiques visibles par observation directe au microscope.

#### Mise en place expérimentale

Pour cette étude, nous avons utilisé un dispositif microfluidique contenant huit chambres de culture en parallèle, une entrée et une sortie fluide. Chaque chambre de culture est séparée en quatre compartiments par un barrage de piliers de  $100\ \mu\text{m}$  de large et distants de  $100\ \mu\text{m}$ . Ces barrages perturbent le flux des cellules, lors de l'ensemencement et permettent une variation de la densité de cellules ensemencées dans chaque compartiment d'une même chambre (dispositif de la figure 4.8, page 89). Le flux est distribué uniformément entre les huit chambres et chaque chambre peut être considérée comme une expérience indépendante. Nous pouvons ainsi observer sans manipulation supplémentaire la différenciation de CSM en adipocyte sur des cultures de densités cellulaires variables.

Ainsi, une suspension de cellules à  $10^6$  cellules/mL, préalablement amplifiée par une culture normale en boîte de Petri, a été introduite à flux réduit dans le dispositif microfluidique stérilisé. Après un repos de quatre à cinq heures dans l'incubateur cellulaire à  $37^\circ\text{C}$  et à un taux de  $\text{CO}_2$  de 5%, les cellules ont pu adhérer aux parois internes du dispositif. Du milieu de culture a ensuite été perfusé par l'entrée fluide à un débit de  $0,3\ \mu\text{L}/\text{min}$  pendant un jour. Dans le cas où aucune dégradation de la culture n'a été observée, nous poursuivons l'expérience en perfusant

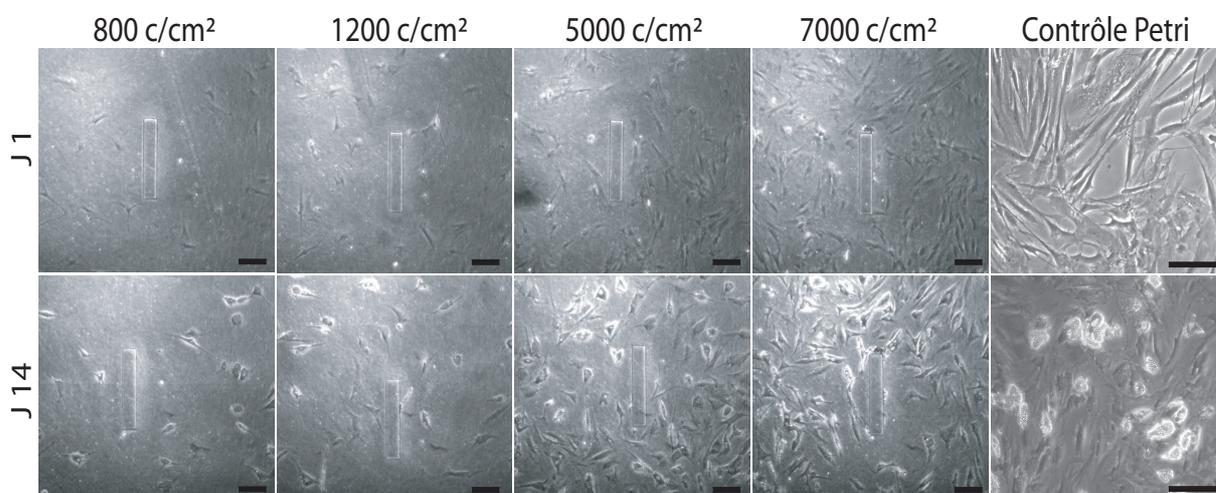


FIG. 5.1 – Séries de microphotographies avant et après le protocole de 14 jours de différenciation de CSM en adipocytes. La différenciation a été effectuée dans le dispositif microfluidique permettant de varier les densités surfaciques d'ensemencement selon quatre zones distinctes. Ces photos sont représentatives de chacune de ces zones. Le contrôle en boîte de Petri, représenté par une photo à plus fort grossissement, permet de voir ce à quoi ressemble une CSM différenciée en adipocyte. Les adipocytes ont le cytoplasme rempli de vésicules lipidiques qui changent l'indice de réfraction de la cellule. Les adipocytes apparaissent beaucoup plus brillantes que les CSM. La barre d'échelle mesure  $200 \mu\text{m}$ .

par l'entrée fluïdique à  $0,3 \mu\text{L}/\text{min}$  le milieu de différenciation<sup>2</sup>. Après 14 jours de perfusion du milieu de différenciation, les connexions fluïdiques sont débranchées et le contenu des chambres est analysé. Nous observons, par microscopie à contraste de phase, une proportion variée, selon les compartiments, de cellules contenant des vésicules lipidiques correspondant aux adipocytes (figure 5.1). Notons que la proportion de CSM différenciées en adipocytes dans les chambres microfluidiques est comparable, 35% en moyenne, au contrôle effectué en boîte de Petri.

### Analyse et marquage fluorescent

L'analyse du résultat de la différenciation cellulaire peut être effectuée par simple observation par microscopie à contraste de phase, mais elle est grandement facilitée par un marquage des vésicules lipidiques par une sonde fluorescente spécialisée, le rouge de Nil (figure 5.2 C). Ce marquage s'effectue par incubation à  $4^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes des cellules fixées dans une solution de rouge de Nil à  $1 \text{ mg}/\text{mL}$ . Ce protocole de marquage (décrit en Annexe C), réalisé avec grande facilité en boîte de Petri, a donné de piètres résultats dans le dispositif microfluidique (figure 5.2 A et B). L'adsorption du marqueur fluorescent sur les parois en PDMS du dispositif microfluidique est une des origines du bruit de fond lors de l'observation par fluorescence. Cependant, une telle adsorption n'explique ni la forte baisse de marquage des vésicules lipidiques, le signal mesuré par fluorescence dans les dispositifs étant diminué de dix fois par rapport aux boîtes de

<sup>2</sup>Le milieu de différenciation de CSM vers les adipocytes est constitué d'un milieu DMEM pauvre en glucose complété de sérum de veau fœtal (20%), de pénicilline (1%) et d'un antibiotique (1%), ainsi que d'un mélange de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) ( $0,5 \text{ mM}$ ), d'indométhacine ( $60 \mu\text{M}$ ) et de dexaméthasone ( $1 \mu\text{M}$ ).

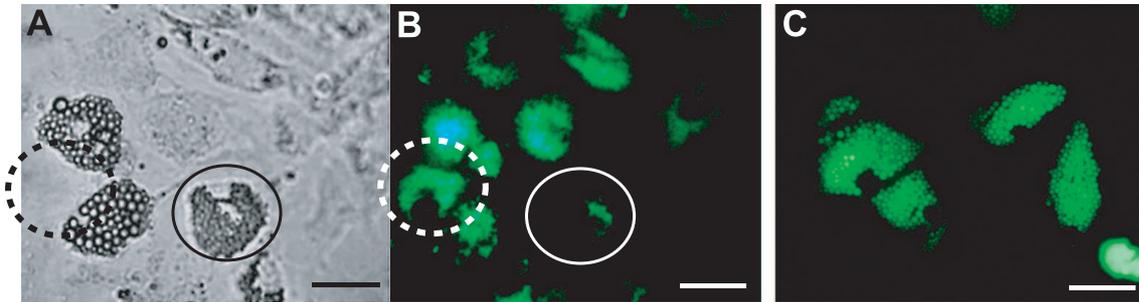


FIG. 5.2 – Microphotographie de CSM différenciées en adipocytes après la fixation et le marquage fluorescent par le rouge de Nil. Les microphotographies A et B correspondent aux images en contraste de phase et en fluorescent d'un même emplacement. La photo B apparaît très flou car son temps d'exposition est particulièrement long : le marquage n'était pas assez bon, le signal fluorescent est trop faible. De plus, des zones d'anomalies sont indiquées par les ronds : nous avons l'impression qu'entre la prise de vue en fluorescence et la prise de vue en fond clair, l'élément entouré a changé de place. Ainsi, outre le problème du marquage fluorescent, il nous semble que le protocole de fixation des cellules doivent être également modifié. La photo C est le résultat d'un marquage de cellules différenciées réalisé en boîte de Petri. Les barres d'échelle mesurent  $10\ \mu\text{m}$ .

Petri, ni la non correspondance des images en fond clair et des images en fluorescence, pourtant prises aux mêmes emplacements (voir les ronds dans la figure 5.2 A et B). Cette expérience montre d'ores et déjà que les protocoles de fixation et de marquage utilisés tels quels dans les dispositifs microfluidiques ne procurent pas de résultats exploitables. Il sera donc nécessaire de faire un travail d'adaptation de ces protocoles avant de les utiliser pour des analyses dans les microsystèmes.

Nous avons néanmoins effectué une analyse des résultats de la différenciation des CSM en adipocytes par observation de cellules non marquées. La confrontation du pourcentage de CSM différenciées en adipocytes avec la densité surfacique initiale montre une influence positive de ce paramètre sur l'efficacité de différenciation (figure 5.3). Cet effet est également observé lors d'expériences en puits ou en boîte de Petri. Notons que les densités d'ensemencement habituelles de  $50\ 000\ \text{cellules}/\text{cm}^2$  sont beaucoup plus élevées que celle réalisables dans les dispositifs microfluidiques pour une raison simple de différence de volumes mis en cause. En effet, l'ensemencement se fait dans les deux configurations, boîte de Petri et microsystème, avec une solution de cellules de concentration équivalente ( $10^6\ \text{cellules}/\text{mL}$ ), mais pour une surface donnée, la hauteur du liquide contenant les cellules à déposer est de plusieurs millimètres voire centimètres pour les boîtes de Pétri, alors qu'elle ne peut dépasser la centaine de micromètres pour un microsystème. Même en effectuant des ensemencements successifs, il est très difficile d'obtenir une densité surfacique de cellules élevée dans les dispositifs microfluidiques. Cependant, l'expérience de contrôle effectuée en boîte de Petri avec une densité surfacique de cellules de  $20\ 000\ \text{cellules}/\text{cm}^2$  a donné un rendement de 34%, ce qui est similaire à ceux observés dans les compartiments microfluidiques à  $5\ 000\ \text{cellules}/\text{cm}^2$ .

En conclusion, nous avons réalisé une première différenciation cellulaire dans un dispositif microfluidique avec une stimulation simple. Cette étude a montré l'influence de la densité

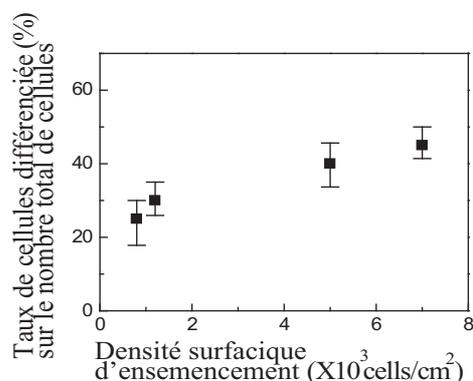


FIG. 5.3 – Résultats d’une expérience de différenciation cellulaire des CSM en adipocyte dans les huit chambres en parallèle, contenant chacune des zones de différentes densités. La représentation du taux de différenciation de cette expérience en fonction de la densité d’ensemencement indique que la densité d’ensemencement pourrait avoir une influence positive sur l’efficacité de la différenciation cellulaire dans les dispositifs microfluidiques.

surfacique de cellules sur l’efficacité de l’induction de la différenciation des CSM humaines en adipocytes. Cette étude a également révélé des difficultés futures pour l’intégration d’étapes de marquage par immunofluorescence au sein des chambres microfluidiques puisque les protocoles de fixation et de marquage des CSM utilisés en boîte de Petri ne semblent pas être utilisables directement dans nos microsystèmes. Des étapes d’adaptation et d’optimisation des protocoles seront nécessaires pour cela.

### 5.1.3 Vers la différenciation neuronale des CSM

Nous avons montré que les outils de culture cellulaire développés dans le laboratoire peuvent également être utilisés pour des expérimentations de différenciation cellulaire, moyennant quelques modifications dans le montage expérimental, notamment pour l’analyse des résultats par immunofluorescence. Nous décrivons ici la mise en place d’un montage expérimental dédié à l’induction des cellules souches mésenchymateuses de rat dans la voie de différenciation neuronale.

#### Une stimulation en plusieurs étapes

L’induction des CSM dans la voie de différenciation neuronale requiert un protocole particulier de stimulations, nécessitant habituellement plusieurs semaines d’induction ainsi que plusieurs changements de milieux de différenciation. Un tel protocole, établi expérimentalement, a résulté en l’engagement partiel des CSM dans la voie de différenciation neuronale, mais ne permet pas encore d’obtenir des neurones matures. Le but de ce travail est de parvenir, par la variation de différents paramètres, à mieux comprendre l’effet des diverses stimulations et à avancer dans la voie de différenciation neuronale. Nos collaborateurs nous ont fourni un protocole modifié et simplifié à tester en prenant en considération les difficultés de mise en place expérimentale et le fait que les cellules soient exposées constamment à un milieu de différenciation frais, contrairement à la configuration en puits où le milieu de différenciation est renouvelé tous les trois jours et où un gradient de concentration a eu le temps de s’établir dans le volume environnant le tapis

cellulaire. Les différentes étapes du protocole d'induction, ainsi que les différents mélanges de cytokines<sup>3</sup> à tester, sont résumés dans le tableau 5.1.

Jour 1	Ensemencement et culture
Jour 2	FGF2 (100 ng/mL)
Jour 5	FGF8 (50 ou 100 ng/mL) + SHH (10, 50, 100, 200 ou 500 ng/mL)
Jour 8	BDNF ou GDNF (10 ng/mL)
Jour 11	Fixation et marquage par immunofluorescence

TAB. 5.1 – Protocole d'essai pour l'induction sur onze jours de la différenciation cellulaire des CSM. Les différentes valeurs pour les cytokines FGF8 et SHH sont des mélanges de concentration à tester afin de déterminer les efficacités relatives entre les différentes variations du protocole.

La variation dans les concentrations des cytokines, FGF8 et SHH, essentielles à l'induction de la différenciation des CSM devrait permettre d'obtenir des réponses cellulaires différentes. Ces réponses se traduisent en des variabilités de phénotypes, détectées en immunofluorescence, par exemple, par l'étude de l'évolution des différents marqueurs suivants :

- nestine : protéine indicatrice de la différenciation neuronale précoce ;
- $\beta$ III-tubuline : protéine du cytosquelette dont un arrangement particulier, notamment pour la formation d'un axone, pourra indiquer le phénotype d'un neurone mature ;
- GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) : protéine caractéristique des astrocytes ;
- actine- $\alpha$ SM : protéine caractéristique des CSM.

### Culture et différenciation cellulaire avec un système de réservoirs

La réalisation de la variation des concentrations décrite dans le tableau précédent ne constitue pas une grande difficulté pour notre montage expérimental. Il suffit, pour cela, d'intégrer dans le dispositif un système de mélange passif bien connu dans le domaine de la microfluidique [86]. La réelle problématique réside d'une part dans le changement de solution sans perturbation pour les cellules, notamment sans l'apparition de bulles d'air, et d'autre part dans l'établissement de paramètres de culture, comme la densité de cellules, la vitesse et la configuration de perfusion, afin d'obtenir effectivement des réponses cellulaires et d'éviter la mort cellulaire que nous observons dans les premiers essais.

#### *Montage expérimental*

Nous avons commencé, pour des raisons de commodité de fabrication, par l'utilisation de dispositifs permettant de tester deux conditions de différenciations différentes. Les deux entrées fluidiques sont connectées à des tubes *Eppendorf* de 1,5 mL dont le contenu pourra être modifié au moment voulu. La sortie fluidique est connectée à un pousse-seringue programmé dans le sens inverse de l'utilisation habituelle pour travailler en pression négative : le contenu des différents réservoirs en entrée se vide au fur et à mesure dans le réservoir de la seringue. La culture cellulaire sur une semaine dans cette configuration de perfusion n'ayant montré aucune dégradation, ce

<sup>3</sup>Les cytokines utilisées sont : des facteurs de croissance des fibroblastes 2 et 8 (FGF - *Fibroblast Growth Factor*), la protéine appelée SHH - *Sonic Hedgehog* et les facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF - *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) et de lignées de cellules gliales (GDNF - *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*)

dispositif a été utilisé pour un premier essai de différenciation de CSM de rat selon les deux conditions de différenciation détaillées dans le tableau 5.2.

Jour 1	Jour 2	Jour 5	Jour 8
Culture	FGF2(100 ng/mL)	FGF8(50 ng/mL) + SHH(100 ng/mL)	BDNF(10 ng/mL)
Culture	FGF2(100 ng/mL)	FGF8(100 ng/mL) + SHH(100 ng/mL)	BDNF(10 ng/mL)

TAB. 5.2 – Résumé des deux protocoles que nous avons utilisés dans un premier temps dans nos dispositifs microfluidiques

Notons que la surface des chambres microfluidiques a été choisie égale à la cellule d’enregistrement de la caméra digitale afin de faciliter les prises de vues journalière. Ainsi, nous avons pu suivre l’évolution des cellules individuelles pendant toute la durée de l’induction. Un tel suivi constitue un aspect intéressant non pratiqué lors de manipulations dans des puits de culture ou dans des boîtes de Petri. Cela nous a facilité les observations et les descriptions des expériences lors de discussions avec les différents collaborateurs.

#### *Choix de la densité d’ensemencement*

La mise en œuvre de l’induction a cependant posé des difficultés au niveau la survie cellulaire, les cellules ne supportant pas, dans les dispositifs microfluidiques, les ensemencements à une densité aussi faible que 500 cellules/cm<sup>2</sup>, comme préconisé dans le protocole. Le maintien d’un tapis cellulaire avec cette densité d’ensemencement semble ne durer que quelques jours. Nous avons comparé l’évolution de cultures cellulaires dans notre dispositif à une densité de 800 cellules/cm<sup>2</sup>, voisine de celle indiquée par le protocole, à celle effectuée de manière routinière dans ce dispositif microfluidique et dans une boîte de Petri, à une densité habituelle de 3 000 cellules/cm<sup>2</sup>.

Type de culture	Jour 1	Jour 4	Jour 7
Dispositif	800	1 400	1 000
Dispositif	3 000	3 900	5 300
Boîte de Petri	2 600	3 700	12 000

TAB. 5.3 – Comparaison de l’évolution de cultures cellulaires selon différentes conditions. Les entrées correspondent à la densité cellulaire moyenne, en cellules/cm<sup>2</sup>, calculée sur huit prises de vue au niveau des chambres microfluidiques et à des emplacements aléatoires pour la boîte de Petri.

Ainsi, un ensemencement à densité trop faible ne permet pas la culture cellulaire dans les conditions de notre montage expérimental. Nous avons choisi de continuer les expériences de différenciation des CSM avec une densité d’ensemencement plus grande que celle préconisée par le protocole initial. Notons néanmoins que la prolifération cellulaire est plus faible dans notre dispositif que dans une culture en boîte de Petri.

#### *Influence du flux continu sur la différenciation des CSM*

Nous avons poursuivi les expériences d’induction de différenciation des CSM avec une densité d’ensemencement de l’ordre de 3 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Sur les quatre séries d’expériences que nous

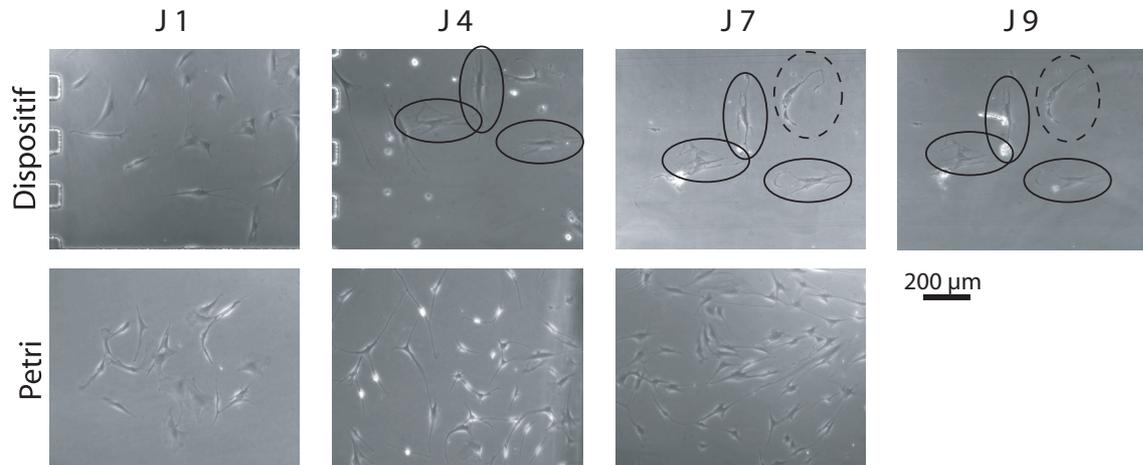


FIG. 5.4 – Suivi par microphotographie du déroulement du protocole de différenciation pour les CSM, dans une chambre microfluidique et dans une boîte de Petri. Dans la boîte de Petri, les cellules continuent de proliférer, mais présentent une morphologie changée. Pour ce qui est des chambres microfluidiques, au contraire, la diminution du nombre de cellules est visible dès le premier jour suivant l’ajout du FGF2 dans le milieu de différenciation. Notons cependant que les cellules qui survivent ont une morphologie très différente de celle des CSM. Notons également que la plupart des cellules survivantes restent figées dans la chambre de culture. La cellule entourée de traits pointillés semble avoir gardé une certaine motilité durant les premiers jours du protocole de différenciation, contrairement aux autres.

avons effectuées, une tendance générale peut être observée. Les cellules meurent et se détachent du substrat à partir de l’introduction des premières cytokines, dès le deuxième jour. La moitié des expériences a été arrêtée au bout du quatrième jour à cause de l’insuffisance de cellules vivantes dans les chambres microfluidiques. Enfin, pour les expériences qui ont été poursuivies jusqu’au onzième jour, nous remarquons que les cellules ayant survécu à la première étape du protocole de différenciation restent inchangées. Leur morphologie, quoique présentant des structures allongées, ne nous permettent pas de trancher sur le résultat de la différenciation : une analyse par immunofluorescence est nécessaire.

Ne possédant ni les anticorps pour l’immunofluorescence ni un protocole de marquage adapté, nous nous contentons pour l’instant d’observations morphologiques et de comparaisons simples avec la même expérience effectuée en boîte de Petri. Rappelons que le protocole que nous utilisons correspond à une modification du protocole initial de différenciation neuronale pour des stimulations en microsystèmes. Les concentrations sont plus faibles, et les temps de réactions plus courts. Nous avons prévu que la présence d’un flux augmenterait la concentration locale en cytokines et qu’elle accélérerait la réactivité cellulaire. La réalisation de ce protocole en boîte de Petri ne devrait donc pas résulter en l’induction de la différenciation neuronale. Cette expérience témoin nous permet seulement d’obtenir des indications supplémentaires sur l’évolution des cellules si elles ne se dégradent pas. La figure 5.4 montre qu’à concentration égale de cytokines, le comportement des cellules induites est complètement différent : dans les boîtes de Petri, les cellules continuent à proliférer et à modifier leur morphologie de telle sorte qu’elles présentent des protrusions très allongées, alors que dans les dispositifs, les cellules meurent massivement,

et celles qui survivent semblent ne plus évoluer morphologiquement à partir du cinquième jour de l'induction.

La mort cellulaire massive durant la première étape du protocole de différenciation est en désaccord relatif avec ce qui devrait se passer. En effet, la cytokine FGF2 a pour but de promouvoir la prolifération cellulaire et d'effectuer une sélection sur les cellules les plus robustes pour la suite des stimulations. Ainsi, une mort cellulaire doit être effectivement observée, ainsi qu'une reprise de prolifération des cellules survivantes. Cela n'a pas été le cas pour les expérimentations effectuées. Nous émettons donc l'hypothèse que la présence d'un flux continu joue un rôle plus important que celui d'augmenter la concentration locale en cytokines au voisinage direct des cellules comme nous l'avions prévu en début de l'étude. Il est possible que la communication intercellulaire soit particulièrement importante à ce stade de l'induction, or la présence de flux efface toute communication chimique intercellulaire en emportant avec lui les molécules d'information. De plus, il n'est pas exclu que le cisaillement exercé sur les cellules provoque une réaction de ces dernières pendant les stimulations, ou même de manière plus basique pendant la culture cellulaire. Ces deux hypothèses supplémentaires contribuent à expliquer l'écart du taux de prolifération cellulaire entre une culture dans le dispositif et dans la boîte de Petri, observé dans la figure 5.4. Notons de plus que l'optimisation de la vitesse de perfusion pour ce dispositif a été effectuée dans la configuration où le milieu frais provenait du pousse-seringue et contrairement à la configuration de perfusion utilisée ici, où le pousse-seringue sert à récupérer le milieu usé. Il est donc de plus possible que le flux imposé ne soit pas tout à fait adéquat pour la culture cellulaire.

Ces expériences sont poursuivies aujourd'hui encore, au laboratoire, pour confirmer ou infirmer ces différentes hypothèses et pour augmenter la statistique des phénomènes observés. Une étude plus systématique est mise en place, fixant pour chaque expérience des paramètres clés, comme la densité d'ensemencement et le taux de prolifération, afin de pouvoir comparer les expériences entre elles durant toute l'année.

### Utilisation d'un dispositif réversible pour faciliter les analyses

Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises, l'analyse par immunofluorescence est primordiale pour obtenir des informations fiables sur l'induction effective des CSM dans la voie de différenciation neuronale. Cependant, l'adaptation du protocole de marquage dans les dispositifs microfluidiques ne consiste pas simplement en l'application directe des protocoles utilisés habituellement en boîte de Petri, comme nous l'avons vu pour le marquage des vésicules lipidiques des adipocytes. Ainsi, dans un premier temps, nous prévoyons d'effectuer ces marquages en dehors des dispositifs microfluidiques afin d'orienter tous nos efforts vers la compréhension des réactivités cellulaires dans les microsystemes et d'éviter de passer trop de temps dans le développement technique.

Pour cela, il est donc nécessaire de défaire le dispositif microfluidique, c'est-à-dire de désolidariser la partie élastomérique de son substrat en verre. L'utilisation de la technique d'assemblage réversible des dispositifs par micro-aspiration développée dans ce travail de thèse est tout à fait à propos. Le développement d'un montage robuste évitant les perturbations mécaniques qui rendent cette technique peu abordable pour les non-initiés est en cours. Ainsi, nous pouvons poursuivre ce travail dans des dispositifs réversibles facilitant l'accès aux cellules une fois l'induction effectuée.

Une solution intermédiaire que nous envisageons est l'utilisation d'un substrat dont l'assem-

blage covalent avec le PDMS n'est que partiel. Les lames de polystyrène commercialisées sont adéquates pour cette utilisation, mais l'assemblage des dispositifs microfluidiques sur ce substrat reste pour l'instant hasardeux et demande encore quelques efforts d'optimisation.

La mise en place du montage expérimental pour l'induction des cellules souches mésenchymateuses nous a permis de soulever de nombreuses problématiques autour de la gestion en volume du micro-environnement entourant les cellules. Les nombreuses réalisations rapportées dans ce manuscrit serviront de bases solides pour la poursuite des travaux liés non seulement à la différenciation neuronale des CSM, mais aussi liés à la manipulation des cellules dans les microsystèmes de manière générale.

## 5.2 Positionnement cellulaire dans un microsysteme

Nous abordons dans ce paragraphe une thématique différente de l'induction chimique des cellules en culture. Ici, notre but est de fractionner l'ensemble des cellules à stimuler pour obtenir des réponses cellulaires à l'échelle de l'individu. En effet, lors de l'analyse de réactivités cellulaires sur une grande population, souvent de l'ordre du million de cellules, nous mesurons inévitablement une moyenne des réponses individuelles, empêchant souvent l'étude de cinétiques ou de mécanismes liés à des événements ponctuels. Cependant, l'accès aux informations disponibles seulement à l'échelle de la cellule unique se fait au prix de la perte de statistique. Ce type d'information est particulièrement biaisé par des paramètres de faible pertinence à l'échelle d'une population et donc souvent méconnu. L'interprétation de ces informations est rendue par là-même plus difficile.

Ce paragraphe traite du positionnement cellulaire dans un dispositif constitué d'un réseau de chambres discrètes, destinées à être le lieu d'analyses électrochimiques de la réactivité cellulaire suite à un stress oxydant. Nous définirons dans un premier temps la problématique avant d'aborder dans un deuxième temps la réalisation de la distribution des cellules dans les chambres discrètes, pour enfin finir sur des questionnements sur la viabilité de ces cellules dans de telles chambres microfluidiques.

### 5.2.1 Cadre de l'étude

Cette étude s'intègre dans le cadre plus général d'une étude du stress oxydant à l'échelle de la cellule unique grâce à un couplage entre la microfluidique et l'électrochimie. Nous avons conçu un dispositif de positionnement cellulaire, dont le principe de fonctionnement est détaillé dans le chapitre 3, permettant de piéger des objets de la taille d'une cellule dans des chambres prédéfinies. Le problème suivant est de piéger des cellules vivantes et de comprendre leur comportement dans un tel piège. Dans quelle mesure la manipulation des cellules dans les microcanaux stresse-t-elle les cellules? Combien de temps les cellules piégées restent-elles viables? La configuration en cellule unique n'est-elle pas toxique pour la cellule? La recherche de réponses à ces questions nous permettra alors de définir les limites des analyses de réactivités cellulaires dans cette configuration de piège cellulaire microfluidique.

Les cellules utilisées pour cette étude sont des macrophages de souris, provenant de la lignée RAW 264.7, bien connue comme système modèle pour les études liées à l'inflammation et à l'apoptose. Dans le cadre de l'étude de la réponse des macrophages RAW au stress oxydant activé par la présence de l'ionophore calcique (A23187), les cellules doivent être positionnées

dans des chambres de mesures contenant une microélectrode, stimulées par un activateur et produire des réponses qui seront détectées au travers des microélectrodes. Ces mesures durent en moyenne une vingtaine de minute, et il est primordial que les cellules soient maintenues vivantes et dans un état de stress minimum, hormis le stress oxydant, afin de s'assurer de la pertinence des mesures effectuées.

### 5.2.2 Répartition des cellules dans les chambres

La manipulation de cellules vivantes diffère de la manipulation d'objets modèles comme des billes de polystyrène en suspension dans une solution aqueuse. La cellule vivante est un objet déformable, plongeant dans un milieu non idéal contenant de nombreux débris cellulaires et autres molécules polluantes, et enfin ayant une durée de vie extrêmement limitée lorsqu'elle est manipulée dans un environnement non naturel.

Pour ces raisons, le principe du positionnement cellulaire conçu et prévu pour des objets idéaux doit être confronté à la réalité d'une solution biologique. Une première expérience a été effectuée dans des chambres carrées de  $40\ \mu\text{m}$  de côté dont l'entrée est placée perpendiculairement du flux arrivant de cellules. Au fond de la chambre, du côté opposé de l'entrée, se trouve un passage de  $2\ \mu\text{m}$  de hauteur, inférieure à celle de la cellule, permettant le passage du fluide sans le passage de cellules. Le principe du piège est donc basé sur l'entraînement des cellules par les fluides traversant les chambres pour coincer les cellules devant le passage étroit. Une fois le passage bouché, plus aucun flux ne le traverse et le piège devient hermétique vis-à-vis des cellules restantes.

La distribution des macrophages dans de telles chambres est illustrée par la figure 5.5. Après quelques minutes de passage d'une solution concentrée de cellules à travers le dispositif, quasiment tous les pièges du réseau contiennent une ou plusieurs cellules. Le nombre de cellules peut être ici supérieur à un puisque le passage coinçant les cellules mesure  $20\ \mu\text{m}$  de large et ne se bouche pas avec une unique cellule piégée. La présence de cellules supplémentaires dans certains pièges atteste de ce fait. Par contre, la solution contenant divers types de débris et de poussières, le passage suscité peut également se retrouver bouché avant qu'une cellule ne puisse se loger dans le piège.

Le contrôle de l'efficacité du positionnement cellulaire dépend non seulement de la géométrie des pièges, mais aussi de la qualité et de la concentration de la solution contenant les objets à piéger. Plus la solution est propre, plus les pièges et les passages pourront être petits pour loger exactement une cellule. C'est la géométrie du piège cellulaire, en relation avec celle des canaux fluidiques, qui déterminera la probabilité pour une cellule de se trouver piégée. Cette probabilité, nous l'avons vu dans le chapitre 3, est relativement faible, et diminue avec la taille des pièges. Ainsi, il est nécessaire d'augmenter le nombre de cellules de passage dans le dispositif.

Parallèlement, dans le cas des dispositifs dont les canaux sont tous de la même hauteur, la limitation de la hauteur des pièges à  $20\ \mu\text{m}$  par la configuration de mesure électrochimique restreint également la hauteur du reste du dispositif. Avec un dispositif de  $20\ \mu\text{m}$  de hauteur, tel celui utilisé précédemment, nous constatons un réel embouteillage à l'entrée du dispositif : seules les cellules individuelles peuvent passer. Or, les cellules ont tendance à former des amas cellulaires lorsqu'elles sont fortement concentrées dans une solution aqueuse. Cette forte concentration est nécessaire pour réduire au maximum le temps de piégeage au risque de réduire le temps de viabilité des cellules piégées. Cependant, la présence d'amas cellulaires contribue au bouchage de l'entrée du dispositif, et par conséquent, lors de l'augmentation de pression et de cisaillement,

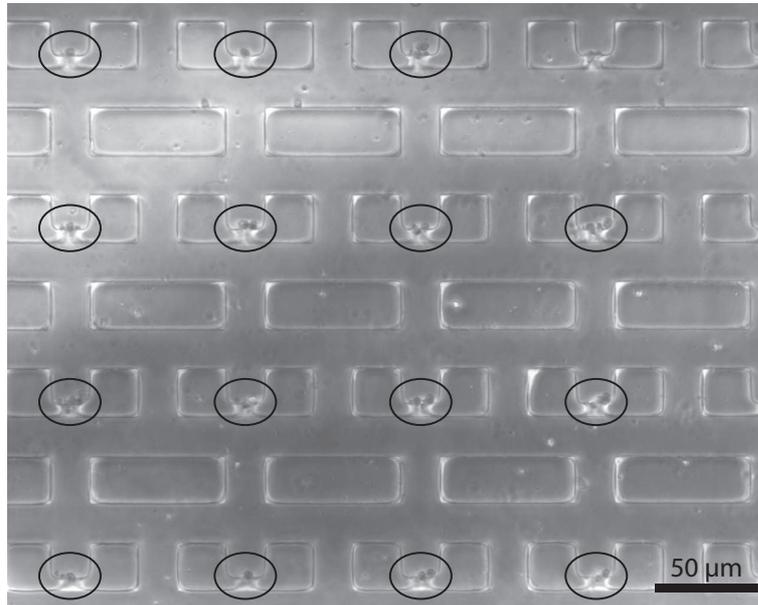


FIG. 5.5 – Microphotographie d'un réseau de chambres de positionnement cellulaire de macrophages de souris après 30 minutes de marquage au bleu Trypan. Les cellules sont colorées, ce qui indique que leur membrane cellulaire est devenue poreuse : les cellules sont mortes. Cependant, ces cellules colorées réparties dans des chambres de  $20\ \mu\text{m}$  de côté nous montrent : i) le piégeage effectif des cellules dans les chambres et leur maintien durable dans cette position, ii) la possibilité malgré une chambre aussi grande, par rapport à la cellule, de ne piéger qu'une seule cellule (la gestion du flux avec des canaux plus fins permettra la réalisation du piégeage unique dans un milieu moyennement confiné). Figure adaptée de [179]

cette présence contribue également à la désintégration des cellules et donc à la formation de nombreux débris néfaste au fonctionnement du dispositif.

Ainsi, il est recommandé d'utiliser des canaux fluidiques principaux plus hauts que les pièges eux-mêmes pour éviter le bouchage de l'entrée du dispositif, diminuer la génération de débris cellulaires et augmenter le nombre de cellules pouvant traverser le dispositif. Notons que cette solution n'est pas idéale : cette configuration diminue considérablement la probabilité pour une cellule de rentrer dans le piège puisque celui-ci est de section plus faible que celle des canaux. La fabrication d'une batterie de dispositifs de piégeage de cellules uniques présentant différentes géométries et hauteurs est en cours de réalisation pour permettre le choix par l'expérience de la géométrie optimale.

Notons également que lors de la culture cellulaire, les cellules sécrètent des protéines pour former une matrice extracellulaire correspondant à un assemblage de molécules dans lequel les cellules peuvent évoluer. Au moment de la récolte, une grande partie de cette matrice peut également être emportée avec les cellules. Avec l'expérience, nous recommandons d'effectuer une première filtration des cellules pour éliminer cette matrice résiduelle avant de procéder au positionnement cellulaire. En effet, la matrice résiduelle s'adsorbe très facilement sur les parois du PDMS pour former un gel qui dévie le parcours des cellules et qui rend la probabilité de piégeage quasiment nulle.

### 5.2.3 Viabilité des cellules

Nous avons vu au début de ce chapitre que les macrophages sont des cellules de nature partiellement circulantes. En effet, elles ont montré une meilleure résistance au flux à travers des canaux microfluidiques que d'autres types cellulaires, et notamment les CSM. De plus, une expérience de culture en parallèle dans un dispositif microfluidique perfusé et dans une boîte de Petri a montré la capacité des RAW à retrouver, dans le milieu confiné des chambres de cultures microfluidiques, une prolifération comparable à celle en boîte de Petri. Ainsi, nous estimons que les RAW sont de bonnes candidates pour être manipulées dans des chambres de mesures de volume particulièrement faible sans pour autant perdre de leur réactivité.

Nous avons vérifié partiellement cette affirmation en positionnant les macrophages dans les chambres de mesures et en remplaçant le tampon de mesure par une solution de bleu Trypan, marqueur de mort cellulaire, après 15 et 30 minutes de repos après le positionnement cellulaire. Pour l'incubation à 15 minutes, les cellules restent bien réfringentes dénotant une bonne intégrité cellulaire. Par contre, nous remarquons qu'une partie des cellules se colorent au bleu Trypan après 30 minutes de repos. Nous en déduisons dans un premier temps que les cellules piégées dans un milieu confiné dans le tampon de mesure se dégradent entre 15 et 30 minutes après le positionnement cellulaire. Une telle dégradation est également observée pour un tapis cellulaire laissé dans le tampon de mesure pendant plus d'une heure. L'accélération de la dégradation cellulaire pourrait alors être due à la manipulation des macrophages dans les microcanaux, leur isolation par rapport à la population initiale et/ou leur confinement dans la chambre de mesure.

Cependant, les expériences ne prennent pas en compte les fonctionnalités de maintien des cellules dans un milieu stable grâce à un flux transversal de milieu, permettant le remplacement des molécules dans les chambres grâce à la diffusion seule. Il serait intéressant d'étudier dans ces conditions la survie des cellules en fonction, bien sûr de la géométrie des chambres, mais aussi en fonction du nombre de cellules présentes dans chaque piège. Cette dernière configuration permettrait de confirmer la nécessité pour les RAW de réagir en groupe. De plus, il est souhaitable d'utiliser un marqueur de viabilité cellulaire non toxique comme la calcéïne, afin de s'affranchir de l'effet du marquage.

## 5.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré dans un premier temps la possibilité d'induire la différenciation cellulaire des CSM en adipocytes dans un dispositif microfluidique dans des conditions de densité cellulaire variables. Cette première expérience nous a permis de déceler les difficultés potentielles de marquage fluorescent pour l'analyse des résultats. Nous avons ensuite poursuivi en développant une gestion fluide un peu plus sophistiquée pour réaliser une induction des CSM vers la différenciation neuronale. Malgré les difficultés rencontrées dans la mise en œuvre d'une telle induction et son non-aboutissement, nous avons néanmoins acquis une meilleure compréhension de la manipulation, la culture et la stimulation des CSM dans nos dispositifs microfluidiques et proposé de nouvelles pistes de développement pour la réalisation du projet de criblage des conditions d'induction des CSM vers la différenciation neuronale.

Dans un deuxième temps, nous avons réussi le piégeage de macrophages dans différentes chambres isolées et obtenu une fenêtre de temps de viabilité de 15 minutes pour ces cellules. Les différentes difficultés rencontrées lors de cette réalisation nous ont permis d'optimiser le système de piégeage. Une étude plus poussée de la viabilité cellulaire nous permettra par la

suite de comprendre les facteurs limitants de nos dispositifs de positionnement cellulaire et améliorera les conditions d'analyse électrochimique des cellules piégées. Cette manipulation sera exploitée dans la partie suivante pour réaliser l'analyse électrochimique des cellules piégées dans les chambres de mesure.

Ces réalisations nous ont permis de manière générale d'avoir une meilleure compréhension du comportement des cellules dans les microsystèmes, aussi bien des cellules fragiles comme les cellules souches, qui nécessitent beaucoup de soins et d'optimisation pour des conditions de culture et de stimulation convenables, mais qui permettent néanmoins des études particulièrement fines et originales, que pour des cellules circulantes comme les macrophages dont la manipulation avec un minimum de perturbation physiologique permettra d'établir des configurations d'analyse pertinentes.

## Troisième partie

# Détection électrochimique dans un micro-environnement contrôlé



# Introduction

Nous nous sommes intéressés jusqu'à présent à l'étude qualitative du comportement de cellules vivantes dans des systèmes confinés. Grâce aux différents outils microfluidiques modulables de contrôle dynamique des micro-environnements que nous avons développés, nous avons réalisé diverses manipulations de culture et de stimulation chimique dans les chambres de culture microfluidiques et les chambres de positionnement cellulaire. Pour compléter cette étude, il est nécessaire d'entreprendre l'intégration d'outils analytiques, de mesures électrochimiques systématiques par exemple, adaptés à ces micro-environnements nouveaux. Cela sera la thématique de cette troisième partie.

La démarche logique que nous avons entreprise est la suivante : i) réaliser des mesures électrochimiques dans une configuration simple avec des outils intégrables dans un microsystème afin d'établir des éléments de comparaison avec les techniques d'électrochimie connues, ii) intégrer les mesures électrochimiques dans un dispositif microfluidique et iii) exploiter pleinement les avantages des microsystèmes pour étudier de manière nouvelle et unique les réactivités cellulaires.

Dans un premier temps, à travers une première application d'analyse électrochimique de réactivité cellulaire dans un microsystème, nous introduisons l'objet principal de l'outil analytique que nous souhaitons développer : la microélectrode. Ainsi, nous détaillerons leurs caractéristiques et leurs fonctionnalités, pour ensuite les exploiter à travers un système de couplage d'analyses électrochimiques et optiques pour la détection de l'exocytose sur une cellule chromaffine unique. Ensuite, nous nous intéresserons au développement d'un système microfluidique intégré, comportant des fonctionnalités de positionnement cellulaire, de stimulation chimique et d'analyse électrochimique que nous appliquerons à la détection du stress oxydant sur des macrophages de souris. Cette étude concernera plus particulièrement la construction et la gestion du micro-environnement des chambres microfluidiques de mesure que nous avons développé. Enfin, un dernier chapitre fédérateur nous permettra d'exploiter pleinement les avantages qu'apporte notre microsystème en détaillant les perspectives de son évolution vers un microsystème d'analyse électrochimique en parallèle.



## Chapitre 6

# Détection d'événements d'exocytose dans un micropuits

Nous avons vu lors de la présentation des techniques de développement de dispositifs microfluidiques qu'il existait de nombreuses méthodes de détection intégrables aux microsystèmes. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux analyses électrochimiques pour leur potentiel de miniaturisation et de parallélisation. En effet, lors d'une analyse électrochimique, les signaux chimiques sont directement convertis en signaux électriques à travers des électrodes en général constituées de simples pistes de métal. La fabrication de ces outils de détection met en œuvre les mêmes technologies que celles des microsystèmes et il est aisé de les adapter rapidement à différentes configurations de mesure.

Dans ce chapitre, à travers le développement d'un microsystème simplifié de détection électrochimique, consistant en une microélectrode transparente plane logée au fond d'un puits, nous montrons la convenance des microélectrodes, obtenues par les techniques habituelles de microfabrication, pour la détection de phénomènes biologiques, et plus précisément ici, pour la détection de l'exocytose sur des cellules chromaffines. Nous rappellerons dans un premier temps quelques notions d'électrochimie ainsi que quelques caractéristiques et applications usuelles des microélectrodes. Nous nous intéresserons ensuite aux techniques de détection et d'analyse usuelles de l'exocytose afin de montrer la pertinence de l'utilisation des microsystèmes pour compléter les systèmes d'analyse aujourd'hui accessibles et efficaces. Enfin, nous présenterons les résultats de l'étude de détection électrochimique de l'exocytose sur une cellule chromaffine unique à l'aide d'une microélectrode transparente dans la configuration suscitée. Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec Yann Verchier, Frédéric Lemaître et Stéphane Arbault, respectivement doctorant, maître de conférence et chargé de recherche au laboratoire d'électrochimie de Christian Amatore et ma contribution à ce travail a concerné plus particulièrement la microfabrication et la conception du montage expérimental.

## 6. Détection d'événements d'exocytose dans un micropuits

---

<b>6.1</b>	<b>Mesures électrochimiques</b>	<b>113</b>
6.1.1	Interface électrode/solution	113
6.1.2	Propriétés des microélectrodes	114
6.1.3	Microélectrodes et microsystèmes	115
<b>6.2</b>	<b>Techniques de détection de l'exocytose</b>	<b>117</b>
6.2.1	Ampérométrie : détection du relargage des molécules dans le milieu extracellulaire	117
6.2.2	Patch-clamp : détection de phénomènes membranaires	118
6.2.3	Microscopie de fluorescence à onde évanescente : détection de mouvements vésiculaires précédant l'exocytose	119
<b>6.3</b>	<b>Mesure d'événements d'exocytose par des électrodes planes et transparentes</b>	<b>120</b>
6.3.1	Microfabrication des électrodes en ITO	120
6.3.2	Mesure sur cellules uniques	121
6.3.3	Couplage avec un système de détection optique	123
<b>6.4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>124</b>

---

## 6.1 Mesures électrochimiques

La mise en place d'un système de mesures électrochimiques n'est pas, en elle-même, particulièrement compliquée et quelques conseils avisés peuvent suffire pour réaliser un montage expérimental connu. La réelle complexité réside dans l'adaptation d'un système de mesure à l'objet mesuré. Il s'agit alors de bien appréhender les techniques de mesure pour les utiliser à bon escient. Nous introduirons ici quelques notions fondamentales qui nous permettront de comprendre et d'optimiser l'intégration de mesures électrochimiques dans nos microsystèmes.

### 6.1.1 Interface électrode/solution

L'analyse électrochimique consiste à i) créer un circuit électrique fermé en plongeant dans une solution conductrice à analyser au moins deux électrodes, ii) à mesurer la variation d'un paramètre électrique, comme le potentiel, le courant, la charge ou la conductivité entre les deux électrodes, et iii) à mettre en relation ces mesures avec la variation d'un paramètre chimique, plus particulièrement la concentration de la substance à analyser. Les grandeurs physiques effectivement mesurées sont le courant électrique traversant le circuit et la différence de potentiel entre les électrodes. Contrairement à beaucoup de méthodes d'analyses chimiques qui s'effectuent dans le volume, les processus électrochimiques se passent essentiellement à l'interface entre l'électrode et la solution. Cette interface sert de jonction entre les conducteurs ioniques traversant la solution et les conducteurs électroniques traversant le circuit.

Lorsqu'une différence de potentiel est imposée entre les deux électrodes, un courant traverse la solution. Ce courant peut être divisé en deux composantes : le courant capacitif, provenant du réarrangement d'ions dans la solution pour contrer les perturbations provoquées par les électrodes, et le courant faradique, provenant du transfert de charge à travers l'interface entre la solution et les électrodes lorsqu'ont lieu des réactions d'oxydo-réduction.

Notons que dans tous les cas de figure, le passage d'un courant  $i$  dans la solution ionique s'accompagne nécessairement d'une chute de potentiel entre les deux électrodes. Cette chute de potentiel est appelée chute ohmique et est égale à  $iR_s$ , où  $R_s$  correspond à la résistance de la solution entre les deux électrodes.

#### Courant capacitif

Dans le cas où aucun événement de transfert d'électrons n'a lieu entre la solution et une électrode, le comportement de cette interface est similaire à celui d'un condensateur. Dans ces conditions, un excès de charges positives s'accumule d'un côté, et un excès de charges négatives s'accumule de l'autre. Ces charges correspondront à l'accumulation ou bien au déficit en électrons du côté de l'électrode et à l'accumulation de cations ou d'anions du côté de la solution.

La structure d'une telle interface est décrite par le modèle communément admis de la double couche électrique qui donne alors une valeur de la capacité de double couche correspondante comprise entre 10 et 40  $\mu F/cm^2$  [180]. Dans les conditions usuelles de l'électrochimie moléculaire, l'épaisseur de cette double couche est de l'ordre de la longueur de Debye.

Lorsque le potentiel varie, l'accumulation de charges de part et d'autre de l'interface entre la solution et l'électrode donne lieu à un courant transitoire. Les caractéristiques de ce courant dépendent uniquement de la surface de l'électrode, de la nature et de la concentration des ions présents dans la solution.

### Courant faradique

Lorsque la solution contient des espèces électroactives, il peut se rajouter en plus du courant capacitif un courant résultant d'une réaction d'oxydo-réduction appelé courant faradique. Cette réaction s'accompagne d'un transfert d'électrons selon le processus à  $n$  électrons suivant :



où  $O_x$  et  $R_{ed}$  sont respectivement les formes oxydées et réduites d'une espèce électroactive. Ceci implique la nécessité d'un donneur ou accepteur d'électrons tel une électrode. Cette réaction pourra se faire dans une plage de potentiel où le transfert d'électrons sera cinétiquement ou thermodynamiquement favorable. Dans un système contrôlé par les lois de la thermodynamique, le potentiel de l'électrode peut être utilisé pour établir le rapport de concentration des formes oxydée et réduite de l'espèce électroactive à sa surface selon la loi de Nernst :

$$E = E^\circ + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_{O_x}}{C_{R_{ed}}}$$

où  $E$  est le potentiel de l'électrode,  $E^\circ$  est le potentiel standard de la réaction d'oxydo-réduction,  $R$  la constante des gaz parfaits ( $8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ),  $T$  la température en degré Kelvin,  $n$  le nombre d'électrons transférés pendant la réaction,  $F$  la constante de Faraday ( $96,487 \text{ C}$ ) et  $C_{O_x}$  et  $C_{R_{ed}}$  les concentrations des formes oxydée et réduite de l'espèce électroactive à la surface de l'électrode. Ainsi, lorsque le potentiel de l'électrode est inférieur à  $E^\circ$ , la forme oxydée aura tendance à être réduite alors que lorsque le potentiel de l'électrode est supérieur à  $E^\circ$ , ce sera la forme réduite qui aura tendance à être oxydée. Le courant résultant du changement d'état d'oxydation de l'espèce électroactive est appelé le courant faradique et constitue une mesure directe de l'avancement de la réaction d'oxydo-réduction.

#### 6.1.2 Propriétés des microélectrodes

L'appellation « microélectrode » concerne les électrodes dont au moins une des dimensions est de l'ordre de quelques dizaines de microns. Elles ont des applications très diversifiées, grâce, non seulement à leurs avantages pratiques, mais aussi aux propriétés particulières de proportionnalité entre le courant mesuré et la concentration de l'espèce à analyser ou de diminution des constantes de temps [181, 182, 82]. Elles sont devenues aujourd'hui un outil essentiel, par exemple, dans l'analyse dans des configurations microscopiques, la mesure de profils de concentration locaux et l'analyse de petits volumes. Parmi les nombreuses applications des microélectrodes, citons les travaux de Troyer et Wightman présentant une cellule électrochimique miniaturisée d'environ 100 pL qui est capable de mesurer de manière non destructive le pompage de la dopamine par une cellule vivante unique grâce à des mesures de voltamétrie cyclique à vitesse de balayage rapide [183]. Par leur taille microscopique, les microélectrodes sont des candidates privilégiées comme outil de détection intégré dans les microsystèmes.

Une des propriétés fondamentales des microélectrodes réside dans la directe proportionnalité entre la concentration de l'espèce électroactive et le courant faradique (mesuré par ampérométrie) [180, 184]. Pour une microélectrode dont la surface est assimilable à un disque, le courant stationnaire s'écrit :

$$i = 4nFD.C^0r_0$$

où  $n$  est le nombre d'électrons échangés,  $F$  est la constante de Faraday,  $D$  le coefficient de diffusion de l'espèce détectée,  $r_0$  le rayon de la microélectrode et  $C^0$  la concentration de l'espèce détectée dans la solution à une distance grande devant  $r_0$ . Cette propriété a rendu possible la détection de processus dynamiques à l'échelle de la cellule unique, des processus qui sont extrêmement limités dans l'espace et dans le temps [185]. En plaçant la microélectrode à proximité directe du site de production des espèces à analyser, la dilution de ces derniers est alors réduite au minimum, rendant la détection extrêmement sensible. Du fait de leur taille micrométrique, les microélectrodes présentent une capacité de double couche  $C_{el}$  particulièrement faible. La première conséquence de cette propriété est la réduction de la constante de temps  $\tau = C_{el} \cdot R_s$  ( $R_s$  est la résistance de la solution) limitant la vitesse des variations de potentiel de l'électrode. Dans le cas des microélectrodes assimilées à des disques de rayon de  $5 \mu\text{m}$ , utilisées couramment au laboratoire, cette constante de temps est très largement inférieure à la milliseconde. La deuxième conséquence d'une faible valeur de la capacité de double couche est la diminution du bruit dans la mesure électrochimique, puisque celui-ci est proportionnel à la capacité  $C_{el}$ .

La diffusion des espèces vers la surface des électrodes devient de plus en plus sensible à l'effet de bord lorsqu'au moins une des dimensions des électrodes diminue. Le flux de diffusion devient convergent et voit le transport des espèces augmenter. En conséquence, et parce que le courant capacitif est diminué, les microélectrodes présentent des caractéristiques de signal/bruit excellentes en comparaison avec les électrodes millimétriques [186].

Enfin, une propriété non négligeable des microélectrodes est la considérable réduction de la chute ohmique due aux faibles courants traversant la solution. Ceci permet l'analyse dans des environnements qui n'étaient pas accessibles auparavant à cause de leur grande résistivité ou l'analyse d'espèces à très haut potentiel d'oxydo-réduction nécessitant des solvants particuliers.

### 6.1.3 Microélectrodes et microsystèmes

L'intégration des microélectrodes dans les microsystèmes a commencé en même temps que le développement des techniques de microfabrication, et leur utilisation en tant qu'outil de détection de routine n'a pas faibli. Avec la variété grandissante des applications des microsystèmes dans les différents domaines des sciences expérimentales, l'intégration des microélectrodes dans les microsystèmes se fait de manière plus sophistiquée, plus systématique et aboutissant à des systèmes de détection de plus en plus sensibles [187, 188, 189]. Les méthodes de fabrication sont très variées et une branche des travaux de recherche se focalise sur le développement d'électrodes de nouveaux types qui ne nécessitent plus les technologies coûteuses de microfabrication habituelle [190]. Malgré cela, nous ne nous intéresserons ici qu'à l'intégration des microélectrodes fabriquées par les techniques standard basées sur les technologies de lithographie optique et de *lift-off*<sup>1</sup> [191] car ce sont de loin les techniques de microfabrication les plus utilisées, en particulier dans notre laboratoire. Les travaux concernant ces microélectrodes peuvent être regroupées en deux grandes familles : les microélectrodes pour la mesure à l'intérieur des microcanaux et les réseaux de microélectrodes, utilisés majoritairement dans un milieu non confiné.

---

<sup>1</sup>Ce procédé consiste à recouvrir le substrat d'une couche de résine photosensible, de déprotéger une partie du substrat par photolithographie, de déposer une ou plusieurs couches de métal sur toute la surface et, enfin, d'éliminer le surplus de dépôt métallique en dissolvant la résine photosensible. Ainsi, les pistes métalliques prendront exactement la forme de la zone déprotégée par photolithographie.

### Microélectrodes pour la mesure à l'intérieur des microcanaux

Les microélectrodes pour la mesure à l'intérieur des microcanaux sont habituellement fabriquées sur un substrat de verre par un procédé simple de *lift-off*, permettant la déposition sur une surface contrôlée d'une ou plusieurs couches de métal. Ce substrat contenant les électrodes pourra être par la suite intégré au dispositif final lors de l'assemblage de ce dernier. De cette manière, seules les parties métalliques exposées aux solutions seront considérées comme parties actives de l'électrode.

Plus concrètement, une des utilisations principales des microélectrodes dans les microsystèmes est leur couplage aux techniques d'analyses miniaturisées comme l'électrophorèse capillaire ou la chromatographie en phase liquide. Dans ce genre d'utilisation, les microélectrodes sont placées en bout de chaîne de séparation afin de détecter le passage et la quantité des espèces. Les configurations d'utilisation sont nombreuses, intégrant une ou plusieurs microélectrodes dans le dispositif, voire même des ensembles de microélectrodes ou d'ultramicroélectrodes (microélectrodes de dimension inférieure à 5  $\mu\text{m}$ ) interdigitées [192, 193], et utilisant des modifications de surfaces actives, en les gravant ou en y faisant adsorber des molécules intermédiaires, pour rendre les mesures plus sensibles ou plus spécifiques [194, 195, 196]. Les techniques utilisées sont habituellement l'ampérométrie ou la conductimétrie, et les limites de détection, pour certaines molécules, se rapprochent de plus en plus de celles obtenues pour les mesures de fluorescence induites par laser, utilisées pour les systèmes macroscopiques de routine [197].

### Réseaux de microélectrodes

Une autre famille d'applications des microélectrodes dans les microsystèmes rassemble les microélectrodes de surface réduite, souvent circulaires, dédiées aux mesures de processus dynamiques tels les événements de sécrétion cellulaire ou le déclenchement de potentiels d'actions sur les neurones. L'investigation de ce domaine a commencé avec la microfabrication d'électrodes planes à surface active extrêmement réduites en déposant une couche d'isolant sertie de quelques ouvertures par-dessus un substrat contenant des pistes métalliques [198]. La taille de ces ouvertures détermine la surface active de chaque microélectrode. La multiplication de ces électrodes a fait apparaître les réseaux de microélectrodes, une version miniaturisée de MEA - *multi-electrode array*. Le couplage des microsystèmes à ce type de réseau de microélectrodes a fait naître des travaux très intéressants sur la réactivité de neurones ou de mastocytes sur des surfaces structurées par des motifs moléculaires [196, 199, 200] ou dans des compartiments confinant les connexions interneuronales [201, 202, 203]. D'autres travaux ont réuni plusieurs microélectrodes dans un même puits de mesure sur cellule unique pour déterminer les paramètres spatio-temporels d'événements d'exocytose [204, 205]. Aucun de ces travaux n'a été effectué dans des microcanaux. Pearce *et al.* ont utilisé des réseaux de microélectrodes commerciales sur lesquels est assemblé un canal microfluidique. Ce dispositif leur a permis de créer un gradient de température au-dessus des microélectrodes et de montrer une dépendance de la fréquence de potentiels d'action de neurones prélevés de la moelle épinière adulte à la température environnante [206]. Un des grands inconvénients dans l'assemblage de canaux microfluidiques sur de tels substrats est qu'il n'est pas commode de les désassembler après les expériences pour nettoyer et réutiliser le réseau de microélectrodes.

Notons que l'intégration, dans un microsystème, d'éléments électroniques ne se restreint pas à l'intégration d'électrodes. Un axe intéressant de recherche concerne l'intégration d'éléments

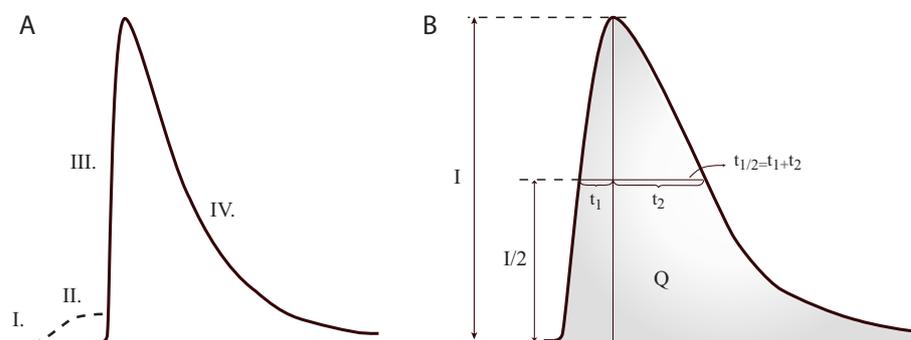


FIG. 6.1 – Allure typique d'un signal ampérométrique mesuré lors d'un événement d'exocytose, adapté de [21]. A. Etapes prises en compte par le modèle physico-chimique avec la libération des espèces électroactives dans la solution (III) et leur déplétion par oxydation (IV). Certains signaux possèdent des « pieds » (I et II) qui correspondent à la formation d'un pore par lequel les molécules actives diffusent. B. Définition graphique des différents paramètres d'un pic ampérométrique.

actifs de circuits électroniques directement dans les microsystèmes pour exécuter des fonctions complexes comme l'amplification des signaux au plus proche de la mesure [207]. Ce serait une voie d'amélioration possible de la détection des signaux, ainsi que de la multiplication des détecteurs, directement sur le dispositif, au lieu d'utiliser du matériel électronique supplémentaire, souvent volumineux.

## 6.2 Techniques de détection de l'exocytose

L'intégration de microélectrodes planes obtenues par les techniques traditionnelles de microfabrication a effectivement de nombreuses applications et permet de concevoir des configurations de mesures nouvelles. Nous nous intéressons ici à la détection d'événements d'exocytose vésiculaire, bien maîtrisée au laboratoire par des techniques ampérométriques de synapse artificielle<sup>2</sup>, et à l'intérêt que peuvent apporter de telles microélectrodes pour la détection ce processus biologique.

### 6.2.1 Ampérométrie : détection du relargage des molécules dans le milieu extracellulaire

Les mesures ampérométriques pour l'étude de l'exocytose sont conduites en configuration de synapse artificielle établie par Wightman et Amatore à partir de 1992 [208, 209]. L'ampérométrie

<sup>2</sup>La technique de synapse artificielle consiste à placer l'électrode de mesure, une ultramicroélectrode, à une très faible distance au-dessus de la membrane cellulaire, typiquement inférieure au micron, à l'aide d'un micro-manipulateur, et à mesurer par ampérométrie les sécrétions de la cellule. Toute espèce électroactive libérée par la cellule pourra diffuser jusqu'à la surface de l'électrode et, dans des conditions favorables de potentiel, s'y oxyder. Le confinement des molécules libérées contraint par l'emplacement de l'électrode impose alors une concentration des espèces électroactives particulièrement élevée, résultant alors en la possibilité de détection de signaux correspondant à un nombre très faible de molécules, indétectables par d'autres techniques. Le nom de cette technique provient de l'homologie de la configuration de cette mesure avec celle de la synapse entre deux neurones, lieu de transmission du message nerveux.

permet la mesure directe des produits de sécrétion libérés lors de l'exocytose. L'électrode n'apporte ni perturbation électrique puisque celle-ci est restreinte à sa double couche électrique de l'ordre du nanomètre d'épaisseur dans les milieux biologiques, ni perturbation mécanique puisqu'elle ne touche pas la cellule. La surface de l'électrode est placée dans l'aire de diffusion des molécules d'intérêt, au plus proche de la membrane cellulaire, afin de limiter au maximum le volume analysé, donc d'augmenter la concentration des espèces et par conséquent d'augmenter le signal mesuré, puisque pour une microélectrode dont la surface est un disque, le courant résultant de l'oxydation d'une espèce est proportionnel à sa concentration. Un pic ampérométrique peut avoir des caractéristiques très variables, surtout au niveau de son intensité (figure 6.1), mais sa forme reste stable. Le modèle, ainsi que le programme d'analyse des pics, développés au laboratoire par Bouret *et al.* [20] permettent d'accéder facilement aux caractéristiques cinétiques et quantitatives de ces pics.

Cette technique permet la détection de flux minimums de l'ordre de 1000 molécules par millisecondes, avec une résolution temporelle de quelques dizaines de microsecondes [21]. Notons que seule la surface de la cellule qui est en regard de l'électrode contribue par ses événements d'exocytose au signal mesuré, ce qui permet de restreindre la surface cellulaire analysée et d'augmenter la résolution spatiale de la mesure. Enfin, des informations sur la nature des espèces sécrétées peuvent être obtenues en faisant varier le potentiel de mesure en fonction du potentiel d'oxydation des différentes espèces. En résumé, l'ampérométrie permet la détection de la quantité et la nature des molécules sécrétées lors de l'exocytose.

## 6.2.2 Patch-clamp : détection de phénomènes membranaires

*Patch-clamp* est un terme anglais désignant une technique électrophysiologique initialement dédiée à l'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires. Cette technique consiste à sceller la pointe d'une micro-pipette en verre sur la membrane plasmique d'une cellule (figure 6.2) et à mesurer la variation du courant ou du potentiel à travers la membrane plasmique scellée. L'amélioration et l'utilisation du *patch-clamp*, pour la mesure de l'activité d'une seule molécule du canal récepteur à l'acétylcholine, a valu à Erwin Neher et Bert Sackmann le prix Nobel de physiologie et médecine en 1991.

Pour l'étude de l'exocytose, c'est l'admittance membranaire qui sera mesurée, donnant accès à la capacitance et la conductance du morceau de membrane scellé. La capacitance est directement liée à la surface membranaire, qui fluctue lors d'événements d'exocytose par apport de lipides, lorsque la vésicule fusionne avec la membrane plasmique, et d'endocytose (phénomène inverse de l'exocytose, la membrane cellulaire s'invagine pour former une vésicule) par retrait de lipides. La conductance varie avec l'apparition de pores de fusion, structures intermédiaires qui relient le milieu extracellulaire au contenu vésiculaire avant l'événement d'expulsion de ce dernier. Le *patch-clamp* donne accès au nombre d'événements de fusion, à leur cinétique ainsi qu'au diamètre et à la fluctuation des pores de fusion [211, 212].

Le couplage de cette technique avec une mesure ampérométrique en insérant une microélectrode de carbone dans la micro-pipette en verre a été mise en œuvre par Mosharov *et al.* Cette technique est particulièrement intéressante car elle donne accès à des informations sur la nature chimique du transfert transmembranaire grâce aux mesures de courant, corrélées aux informations sur les événements de fusion [213]. Ce couplage fait l'objet de nombreuses études aujourd'hui afin de réaliser une configuration de synapse artificielle couplée avec le *patch-clamp*.

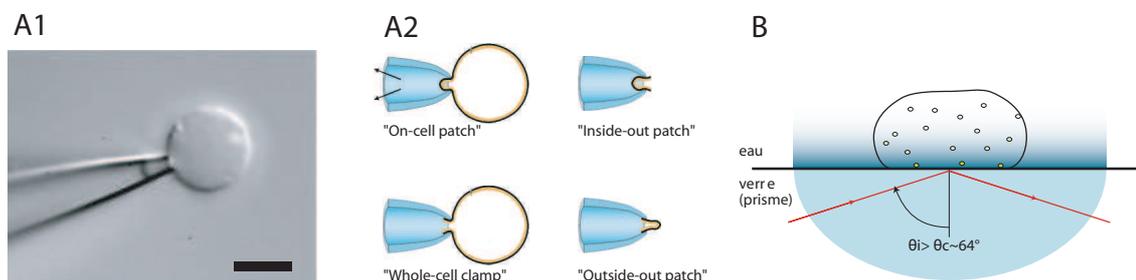


FIG. 6.2 – Techniques complémentaires à l'ampérométrie pour l'étude de l'exocytose. A. Patch clamp : A1. Exemple de scellement « on-cell » sur une micro-pipette en verre, ici, un sphéroplaste géant, préparé à partir d'*E. coli* privé de sa paroi bactérienne, la barre d'échelle est de  $5 \mu\text{m}$ , la figure est adaptée de [210] ; A2. différentes configurations de scellement de la membrane cellulaire sur une micropipette en verre (« on-cell », « whole-cell », « inside-out » et « outside-out » sont les termes anglais usuels utilisés pour désigner les différentes configurations). B. Principe de la microscopie à onde évanescente. Les vésicules chargées en fluorophores ne seront visibles qu'en-deçà d'une certaine distance de l'interface eau-verre, correspondant à la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, de l'ordre de la centaine de nanomètres.

### 6.2.3 Microscopie de fluorescence à onde évanescente : détection de mouvements vésiculaires précédant l'exocytose

Parmi les nombreuses techniques microscopiques utilisées pour étudier l'exocytose, la microscopie de fluorescence à onde évanescente se démarque par la résolution verticale de l'ordre de  $10 \text{ nm}$  qu'elle apporte sur la position et le mouvement des objets observés. Elle permet d'obtenir des informations en amont du processus de fusion, c'est-à-dire sur le passé proche des vésicules avant leur fusion à la membrane cellulaire. Ces informations sont complémentaires à celles obtenues par les autres techniques qui traitent plutôt de ce qui se passe pendant la fusion des vésicules et l'expulsion de leur contenu.

Le principe de cette technique se base sur la possibilité de l'apparition d'une onde évanescente au niveau de l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents. Pour cela, les cellules à analyser sont placées sur une lamelle de verre, baignant dans un tampon. Un faisceau de laser envoie une lumière incidente à l'interface verre/eau à l'emplacement d'une cellule, où elle pourra subir une réfraction selon la loi de Descartes. Dans le milieu incident, le verre, étant le plus réfringent, il existe un angle limite au-dessus duquel le phénomène de réfraction disparaît. Dans ce cas, une onde évanescente est créée dans le milieu le moins réfringent, l'eau ou le tampon de culture, et son intensité décroît le long de la normale à l'interface (figure 6.2). La profondeur de pénétration de l'onde varie en fonction de l'angle d'incidence. Cela permet d'exciter l'échantillon sur une profondeur de  $100$  à  $200 \text{ nm}$  seulement, éliminant toute fluorescence pouvant provenir du reste de l'échantillon, et obtenant ainsi un rapport signal-sur-bruit supérieur à celui obtenu en microscopie de fluorescence classique. L'intensité de fluorescence d'un objet varie avec l'intensité de l'onde qui elle-même est fonction de la position sur l'axe normal à l'interface. Il est alors possible de suivre la trajectoire des vésicules marquées dans les trois dimensions, lorsqu'elles sont à proximité de la membrane cellulaire du pôle basal, correspondant à la partie de la cellule au contact avec son substrat [214]. Cependant, la résolution cinétique de cette technique est de l'ordre de  $10$  millisecondes, ce qui est trop important par rapport aux événements de fusion

vésiculaire et d'exocytose.

Cette technique sonde plus particulièrement la partie membranaire de la cellule qui est au contact avec le substrat, elle correspond au pôle basal de la cellule, contrairement aux deux techniques qui sondent les autres parties membranaires correspondant au pôle apical de la cellule. Du fait de cette distinction dans les conditions de mesure, il n'existe aujourd'hui aucun travail couplant la technique de microscopie à onde évanescente avec l'ampérométrie ou le *patch-clamp* dans des configurations permettant la mesure des mêmes événements d'exocytose.

### 6.3 Mesure d'événements d'exocytose par des électrodes planes et transparentes

Nous nous proposons, en utilisant des microélectrodes planes et transparentes, de réaliser un couplage de techniques d'analyses électrochimiques et optiques. Un tel couplage permettrait de relier les analyses des phénomènes vésiculaires dans les premières phases de l'exocytose, accessibles par exemple par analyse optique en onde évanescente, à celles concernant les dernières phases de l'exocytose, de libération du contenu des vésicules, accessibles par analyse ampérométrique. La seule manière d'accéder aux événements d'exocytose détectés par la technique de microscopie à onde évanescente est de rendre le substrat sur lequel de telles détections sont effectuées conducteur, pour permettre des mesures ampérométriques sur les espèces sécrétées lors de l'exocytose, tout en conservant les caractéristiques de transparence pour permettre la détection optique.

Nous exposerons les caractéristiques et les méthodes de fabrication d'une microélectrode transparente grâce à l'utilisation de lames de microscope recouvertes d'un film conducteur en ITO - *indium tin oxyde*, avant de montrer la compatibilité de ces électrodes avec des mesures ampérométriques et des mesures optiques.

#### 6.3.1 Microfabrication des électrodes en ITO

Des lames de microscopie commerciales recouvertes d'un film d'oxyde d'indium-étain, ITO - *indium tin oxyde*, de 500 nm d'épaisseur ont été utilisées comme matériau pour l'électrode plane. Le film d'ITO a une faible résistance électrique de couche ( $20 \Omega/\square^3$ ) et un indice de réfraction faible de 1,52. Le film conducteur en ITO a été recouvert d'une couche isolante de résine photosensible structurée par photolithographie pour laisser des ouvertures de forme circulaire, de différents diamètres, allant de 40 à 300  $\mu\text{m}$ . Ces ouvertures limitent donc la surface active de l'électrode de manière à obtenir une microélectrode en ITO (figure 6.3 A). Pour recouvrir l'électrode du tampon de mesure, un puits a été formé à l'emplacement voulu grâce à un film de PDMS de cinq millimètres d'épaisseur troué par un emporte-pièce de 1 cm de diamètre. Le film d'élastomère hydrophobe permet l'utilisation d'un volume suffisant de tampon pour éviter sa rapide évaporation, tout en s'assurant du confinement du liquide. Ceci facilite le rassemblement au sein de la même solution d'une micro-pipette d'injection et d'une électrode de référence sans

---

<sup>3</sup> $\Omega/\square$ , « ohms par carré », est une unité de mesure usuelle de la résistance de couches fines de conducteurs d'épaisseur uniforme. Cette résistance  $R_c$  provient de l'expression de la résistivité  $\rho$  selon la formule suivante :  $R = \rho \cdot \frac{L}{e \cdot l} = \frac{\rho}{e} \cdot \frac{L}{l} = R_c \cdot \frac{L}{l}$ , avec  $L$ ,  $l$  et  $e$  respectivement la longueur, la largeur et l'épaisseur de la couche conductrice. Remarquons que dans le cas d'une surface conductrice carrée, la résistance est invariante et égale à  $R_c$ .

### 6.3. Mesure d'événements d'exocytose par des électrodes planes et transparentes 121

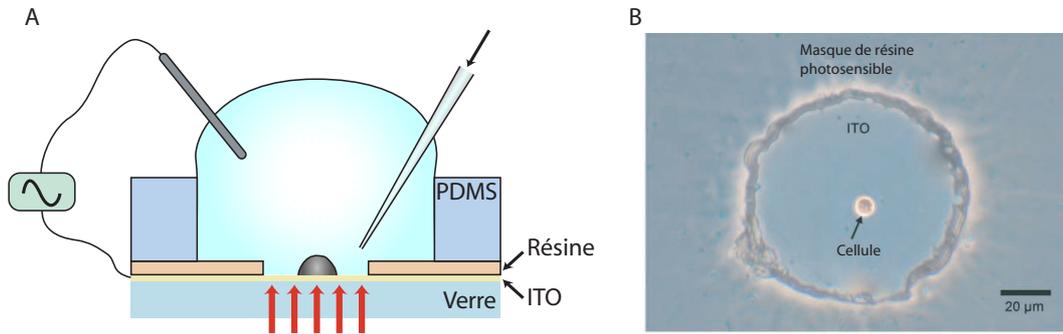


FIG. 6.3 – A. Principe des mesures électrochimiques et optiques sur lame de verre recouverte d'ITO. La stimulation de la cellule se fait avec une micropipette en verre par injection d'activateur chimique au voisinage de la cellule. B. Microphotographie d'une cellule chromaffine déposée dans un puits.

avoir à usiner des réservoirs spécialisés. L'adhésion réversible naturelle du PDMS sur une surface plane facilite également l'assemblage et le désassemblage du montage expérimental ainsi que le nettoyage des électrodes.

Des mesures voltamétriques d'adrénaline, neurohormone principale de type catécholamine sécrétée par les cellules chromaffines, ont été effectuées sur ces électrodes (figure 6.4 A). Une telle vague d'oxydation de forme bien définie montre que l'ITO offre une surface active excellente pour la détection des catécholamines sécrétées. De plus, dans les conditions expérimentales similaires à celles établies pour la configuration de synapse artificielle, plus précisément dans une cage de Faraday et dans une salle thermostatée à  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , le bruit quadratique moyen pour toutes ces électrodes est de l'ordre de 0,5 pA. Il atteint 0,3 pA pour les surfaces actives les plus restreintes. Un niveau aussi bas de bruit permettra une excellente détection par ampérométrie de la sécrétion des neurohormones, tout à fait comparable à celles effectuées avec les microélectrodes de carbone utilisées habituellement pour ce genre de mesures, avec un niveau de bruit de l'ordre de 0,1 pA.

#### 6.3.2 Mesure sur cellules uniques

##### Mise en place expérimentale

Dans la même configuration que les mesures précédentes, un petit volume de milieu de culture contenant des cellules chromaffines, préalablement colorées à l'acridine orange, marquage de compartiments acides comme les vésicules d'exocytose, est placé dans le puits d'élastomère, de telle sorte qu'après la sédimentation des cellules, seules une ou deux se positionnent sur la surface active (figure 6.3 B). Les cellules sont ensuite laissées au repos afin qu'elles adhèrent au substrat pendant 20 minutes. Une cellule d'intérêt est ensuite stimulée par la microinjection d'une solution d'ions baryum  $\text{Ba}^{2+}$  à 2 mM, connus pour interagir avec les canaux calciques dans les cellules et déclencher la sécrétion dépendante du calcium [215]. L'injection ne se fait pas directement sur la cellule afin de ne pas rajouter un stimulus mécanique. Les sécrétions qui en résultent sont détectées en fixant le potentiel de l'électrode d'ITO à 650 mV *vs.* une électrode de référence Ag/AgCl. Notons que les événements d'exocytose qui contribuent au signal mesuré proviennent exclusivement du pôle basal de la cellule, c'est-à-dire la partie membranaire qui est au contact avec le substrat. Ce sont donc *a priori* les mêmes événements d'exocytose que ceux

analysés par les techniques microscopiques, alors que dans la configuration de synapse artificielle, les événements analysés proviennent du pôle apical, correspondant au sommet de la cellule et à la partie membranaire complémentaire du pôle basal.

### Mesures ampérométriques

Après 5 à 10 minutes de stabilisation de la ligne de base suivant la polarisation de la microélectrode, une solution d'ions baryum  $Ba^{2+}$  est microinjectée dans le voisinage de la cellule. Nous observons alors immédiatement après l'injection une perturbation de la ligne de base, présentant une série discontinue de pics d'un vingtaine de picoampères d'amplitude, comme nous le montre la figure 6.4 B). Ce signal est enregistré pendant une minute avant que le substrat soit nettoyé et que l'expérience puisse être renouvelée, 5 fois. Il est inutile de prolonger la durée de la mesure car la stimulation déclenche une réaction cellulaire telle que la cellule n'est plus considérée viable après quelques minutes d'exocytose forcée.

La fréquence des événements d'exocytose mesurés est en moyenne de 3 Hz, ce qui permet la détection de nombreux pics sur la durée de la mesure. Notons que la surface sondée étant grande, la probabilité de mesurer plusieurs événements d'exocytose au même moment est élevée. De tels signaux ne seront pas analysés car leur forme ne correspond pas à celle du pic modèle utilisé pour extraire les paramètres quantitatifs des signaux. Ainsi, chaque pic isolé, comme celui représenté par la figure 6.4 C, est analysé grâce à un programme mis au point au laboratoire [20], de la même manière que les analyses effectuées dans la configuration de synapse artificielle. Dans ces conditions, nous avons alors extrait 245 pics isolés sur l'ensemble des signaux mesurés sur cinq cellules uniques. Les paramètres quantitatifs et cinétiques principaux extraits de l'analyse de ces événements individuels sont résumés dans le tableau 6.1<sup>4</sup>.

	Q [fC]	$I_{max}$ [pA]	$t_{20-90}$ [ms]	$t_{1/2}$ [ms]
Mesure sur électrode plane (pôle basal)	$1745 \pm 106$	$19,8 \pm 1,2$	$19,3 \pm 0,9$	$72,6 \pm 2,5$
Mesure en synapse artificielle (pôle apical)	$800 \pm 55$	$11,1 \pm 0,8$	$15,6 \pm 0,6$	$60,1 \pm 1,6$

TAB. 6.1 – Comparaison des paramètres quantitatifs et cinétiques moyens entre les configurations de mesure sur électrode plane et de mesure en synapse artificielle.

Suite à ces analyses, nous pouvons en déduire :

- Les valeurs des paramètres quantitatifs, de charge totale Q et de courant maximal  $I_{max}$ , ainsi que les taux d'erreur, sont en concordance avec ceux mesurés dans les analyses équivalentes sur les microélectrodes de carbone, effectuées sur le pôle apical des cellules chromaffines.
- Les paramètres cinétiques sont plus grands, dénotant une cinétique de la fusion des vésicules plus lente.

Une hypothèse possible causant un tel changement de comportement cellulaire pourrait être tout simplement l'adhérence de la cellule chromaffine sur la couche d'ITO qui n'est ni un substrat naturel, ni un substrat habituel pour les études de réactivité cellulaires. Nous avons donc effectué

<sup>4</sup>Les valeurs de mesure en synapse artificielle utilisées ici pour la comparaison ont été obtenues par Yann Verchier dans une étude comparative plus systématique [216].

### 6.3. Mesure d'événements d'exocytose par des électrodes planes et transparentes 123

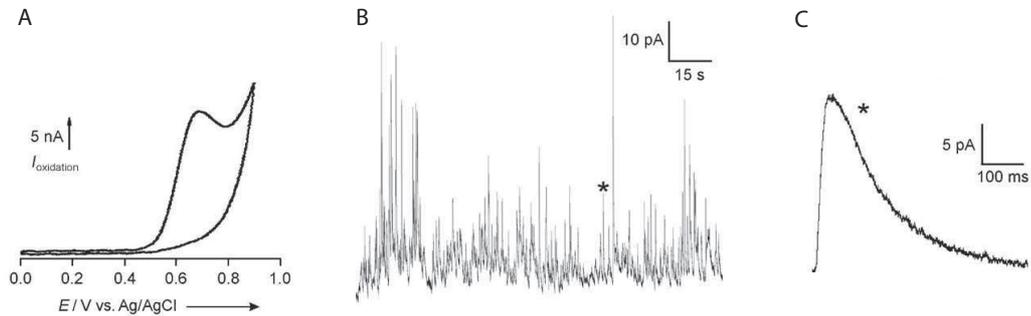


FIG. 6.4 – A. Analyse par voltamétrie cyclique de l'oxydation de l'adrénaline ( $50 \mu\text{M}$ ) dans un tampon physiologique isotonique sur une surface micrométrique d'ITO. La vague d'oxydation de l'adrénaline est très nette et détachée du mur du solvant, indiquant la pertinence d'utiliser l'ITO comme matériau de détection. B. Signal ampérométrique ( $E=650 \text{ mV VS Ag/AgCl}$ ) sur ITO d'exocytose d'une cellule chromaffine unique suivant une stimulation par injection d'une solution de chlorure de baryum ( $2 \text{ mM}$ ), mesuré pendant 90 secondes. Chaque pic correspond à un événement d'exocytose, qui se fait, en moyenne, à une fréquence de 3 Hz. C. Pic représentatif d'un événement d'exocytose, correspondant au pic marqué par un astérisque dans la figure B. Cette forme est caractéristique de l'exocytose et pourra être analysée numériquement grâce à un programme développé au laboratoire pour dégager des paramètres quantitatifs intéressants.

des mesures supplémentaires d'exocytose en configuration de synapse artificielle dans ce même montage expérimental, c'est-à-dire en utilisant des ultramicroélectrodes de carbone pour effectuer des mesures au-dessus de cellules adhérentes sur substrat d'ITO. Elles n'ont montré aucune différence significative avec les mesures effectuées habituellement dans de simples boîtes de Petri. Nous pouvons alors affirmer que le substrat en ITO n'ajoute pas de stimulus supplémentaire à la cellule. Les différences dans la cinétique proviendraient alors de la différence dans les conditions biologiques et physico-chimiques des sites d'exocytose analysés [14]. La cinétique de fusion des vésicules ne serait donc pas la même au pôle apical et au pôle basal d'une même cellule. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'une interaction différente entre la cellule et le substrat en ITO puisse avoir lieu seulement sur le pôle apical, entraînant alors une modification de la cinétique des événements. Pour résoudre cette question, il serait nécessaire de comparer des analyses d'exocytose sur le pôle basal de la cellule sur un substrat de verre habituel et sur un film d'ITO.

#### 6.3.3 Couplage avec un système de détection optique

Nous avons vu que les électrodes en ITO procuraient un système de détection électrochimique de la même qualité que les électrodes de carbone traditionnelles. Montrons maintenant qu'il est possible de coupler ce système de détection avec un système optique.

La figure 6.5 B correspond à une microphotographie, en contraste de phase et en fluorescence, d'une cellule chromaffine, préalablement marquée à la sonde fluorescente acridine orange, déposée sur une microélectrode en ITO. Ces images montrent que la qualité optique de l'ITO est convenable pour une analyse en épifluorescence en présence de la sonde fluorescente acridine orange. Il a été démontré que cette sonde fluorescente classique s'accumule dans les compartiments acides telles que les granules de sécrétion [217]. Des nuances d'orange et de vert observées

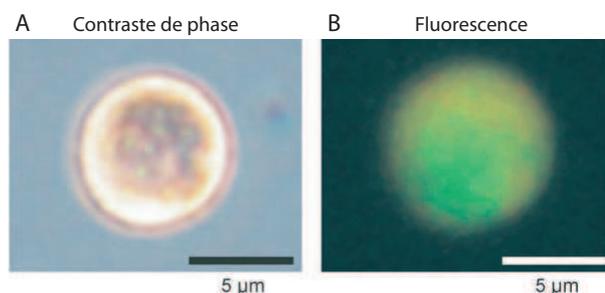


FIG. 6.5 – Microphotographies d'une cellule chromaffine sur une lamelle d'ITO, en contraste de phase (A) et en fluorescence (B)

indiquent que le spectre optique de l'ITO est compatible avec les longueurs d'ondes d'émission de ces sondes fluorescentes.

Dans cette étude, nous avons soulevé d'une part l'hypothèse qu'une différence, entre le pôle basal et le pôle apical d'une cellule, dans les conditions biologiques ou physico-chimiques au niveau des sites d'exocytose, ralentirait la cinétique de la fusion des vésicules sur la membrane plasmique. D'autre part, des détections ampérométriques d'événement de sécrétion sur le pôle basal des cellules, grâce à des électrodes planes, ont été réalisées. Il est important de prendre en considération l'éventualité d'interactions non contrôlées, dans le cas où les cellules seraient en contact direct avec la surface de l'électrode.

D'autre part, nous avons mis en place un montage expérimental qui doit pouvoir coupler analyses électrochimiques et analyses par épifluorescence, à condition de prendre certaines précautions sur le bruit généré par la source de lumière pour l'excitation des fluorophores. L'ITO est un matériau pertinent pour la détection électrochimique d'événements d'exocytose sur le pôle basal des cellules, et par son faible indice de réfraction,  $n=1,52$ , il devrait être également un matériau pertinent pour la détection par fluorescence en onde évanescente, s'il est possible de déposer un film d'ITO sur les substrats habituels pour cette technique. A travers le couplage de ces techniques de détection puissantes, il deviendrait alors possible de retracer l'« histoire » d'une vésicule avant et après sa fusion avec la membrane plasmique.

## 6.4 Conclusion

Nous avons montré, à travers une première application, la possibilité de réaliser des mesures ampérométriques avec des microélectrodes planes, obtenues par les techniques habituelles de microfabrication. Cette première étude a été particulièrement importante car elle nous a permis d'effectuer une comparaison entre cette nouvelle configuration de détection électrochimique et celle de la synapse artificielle exploitée depuis plusieurs années au laboratoire. Nous avons ainsi placé ce nouveau système dans un contexte bien connu afin de toujours garder un élément de comparaison pour vérifier la pertinence des analyses. De telles microélectrodes seront facilement intégrables dans un dispositif microfluidiques.

De plus, cette première configuration de détection électrochimique de l'exocytose dans un puits serti d'une microélectrode plane et transparente a donné accès à des mesures ampérométriques d'événements d'exocytose inaccessibles jusqu'à présent. Une telle configuration de

détection rend possible la mesure simultanée d'événements d'exocytose par ampérométrie et microscopie à onde évanescente. Une étape de développement technique pour déposer un film d'ITO sur les prismes utilisés pour le montage de microscopie à onde évanescente est encore nécessaire pour réaliser le couplage de ces deux techniques. Ce travail est poursuivi en ce moment dans le laboratoire d'électrochimie.

Nous poursuivons le développement d'un système de détection électrochimique dans un milieu confiné par l'intégration dans un dispositif microfluidique de cette configuration de mesure dans un micropuits. Cela rajoutera un contrôle du micro-environnement de la mesure électrochimique. Cependant, la nécessité de prélèvement et de dissection de glandes surrénales bovines avant chaque utilisation pour obtenir des cellules chromaffines « fraîches » s'est avérée peu compatibles avec les développements techniques de dispositifs microfluidiques. Pour la suite de nos travaux, nous changerons donc de modèle cellulaire et de processus biologique étudiés.



## Chapitre 7

# Mesures électrochimiques dans une chambre microfluidique

Nous avons choisi de poursuivre l'élaboration d'un système de mesure intégré dans un dispositif microfluidique en adoptant, pour des raisons pratiques d'organisation expérimentale, un modèle cellulaire différent de celui du chapitre précédent : les macrophages de souris RAW 264.7. Outre la construction d'un microsystème de mesure permettant d'isoler les cellules, de les activer chimiquement et de mesurer leur réactivité cellulaire, il est nécessaire de bien définir ce qui sera analysé ainsi que les conditions d'analyse, pour effectivement prendre en compte les spécificités du modèle cellulaire choisi et les processus biologiques associés. De plus, pour obtenir un système d'analyse pertinent, il est important de prendre en compte des facteurs tels que la sensibilité du détecteur, son temps de réponse, sa limite de détection et la nature des informations pouvant être acquises. Ce chapitre sera consacré à la réalisation de mesures électrochimiques de stress oxydant sur des macrophages de souris dans une chambre microfluidique.

Nous établirons dans un premier temps les conditions d'analyse électrochimique du stress oxydant sur les macrophages de souris dans un système microfluidique simple consistant en une chambre de culture sertie de microélectrodes, permettant le confinement d'une population de macrophages et la mesure électrochimique de leur réactivité cellulaire. Nous poursuivrons ensuite par la réalisation de microélectrodes, adaptées au microsystème de positionnement et d'activation cellulaire décrit dans les parties précédentes, permettant d'effectuer des mesures électrochimiques sur cellules uniques. Enfin, nous détaillerons le fonctionnement du dispositif intégré que nous avons développé avant de réaliser les premières mesures électrochimiques sur cellules vivantes dans un micro-environnement ainsi contrôlé.

---

**7. Mesures électrochimiques dans une chambre microfluidique**

---

<b>7.1</b>	<b>Analyse du stress oxydant sur une population de cellules . . . . .</b>	<b>129</b>
7.1.1	Intégration de microélectrodes dans une chambre de culture . . . . .	129
7.1.2	Mesure du stress oxydant dans une chambre de culture . . . . .	131
<b>7.2</b>	<b>L'intégration d'un réseau de microélectrodes . . . . .</b>	<b>134</b>
7.2.1	Description des électrodes choisies . . . . .	134
7.2.2	Caractérisation des microélectrodes . . . . .	138
7.2.3	Choix de l'électrode de référence et de son emplacement . . . . .	140
<b>7.3</b>	<b>Développement d'un système intégré . . . . .</b>	<b>143</b>
7.3.1	Conception du dispositif intégré . . . . .	143
7.3.2	Mesures électrochimiques sur cellules piégées . . . . .	147
<b>7.4</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>150</b>

---

## 7.1 Analyse du stress oxydant sur une population de cellules

Commençons donc notre étude par la reproduction d'une cellule électrochimique standard dans un dispositif microfluidique. Il s'agit maintenant d'établir un protocole simple de mesure afin de poursuivre vers le développement d'une plate-forme microfluidique plus sophistiquée d'analyse de cellules uniques. Le système de mesure étant dans un microsystème clos alimenté par connexions fluidiques, il est important de travailler sur des cellules vivantes « robustes », nécessitant un maintien minimal, et d'éliminer tout élément mécanique du protocole, tels que l'injection des activateurs avec un micro-injecteur ou l'activation mécanique des réponses cellulaires. C'est pour ces raisons que nous avons choisi de travailler avec les macrophages de souris RAW 264.7 et de réaliser des mesures du stress oxydant sur ces cellules.

Nous avons ainsi envisagé des expériences de chronoampérométrie dans une grande chambre microfluidique contenant les électrodes sous forme de bande pour analyser le stress oxydant en travaillant sur un modèle cellulaire robuste, les macrophages de souris. Ce travail a été mené en étroite collaboration avec Issa Tapsoba et Stéphane Arbault, respectivement post-doctorant et chargé de recherche au laboratoire d'électrochimie.

### 7.1.1 Intégration de microélectrodes dans une chambre de culture

#### Description

Le dispositif microfluidique utilisé pour cette étude est constitué d'une cavité en relief dans un bloc de PDMS, reliée aux connexions fluidiques par deux canaux et assemblée sur une lame d'histologie en verre contenant trois électrodes en bande (figure 7.1 A). La cavité est un parallépipède rectangle de 0,5 cm de large, 1 cm de long et 100  $\mu\text{m}$  de hauteur. Ce volume est choisi relativement grand pour une chambre microfluidique afin d'assurer une distribution homogène des cellules et d'éloigner des électrodes les bulles d'air éventuelles, ces dernières s'accumulant préférentiellement dans les coins des dispositifs.

Nous travaillerons alors dans une configuration « trois électrodes », avec une grande bande d'argent de 500  $\mu\text{m}$  de large pour l'électrode de référence, suivie d'une bande de platine de 20  $\mu\text{m}$  de large pour l'électrode de travail et d'une grande bande de platine de 500  $\mu\text{m}$  de large pour la contre-électrode (figure 7.1 A). Du chlorure d'argent a été électrodéposé sur l'électrode d'argent pour lui permettre de fonctionner comme électrode de référence de type Ag/AgCl. Un dépôt dendritique de platine<sup>1</sup>, appelé noir de platine, a été électrodéposé sur la fine électrode de platine servant d'électrode de travail afin d'augmenter la sensibilité et la sélectivité électrochimique de cette dernière vis à vis des espèces dérivées de l'oxygène et de l'azote relarguées par les cellules [218, 25]. Enfin, aucune modification n'a été effectuée pour la contre-électrode. Les détails sur la méthode standard de fabrication de ces électrodes sont explicités en annexe D.

---

<sup>1</sup>L'électrodéposition du platine dendritique, ou noir de platine, se fait par la réduction sur la surface de l'électrode, dans un tampon phosphate, de l'acide hexachloroplatinique,  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ , en présence de l'acétate de plomb,  $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , selon une réaction à quatre électrons :  $\text{Pt}_{IV}\text{Cl}_6^{2-} + 2e^- \longrightarrow \text{Pt}_{II}\text{Cl}_4^{2-} + 2\text{Cl}^-$  puis  $\text{Pt}_{II}\text{Cl}_4^{2-} + 2e^- \longrightarrow \text{Pt}^0 + 2\text{Cl}^-$ .

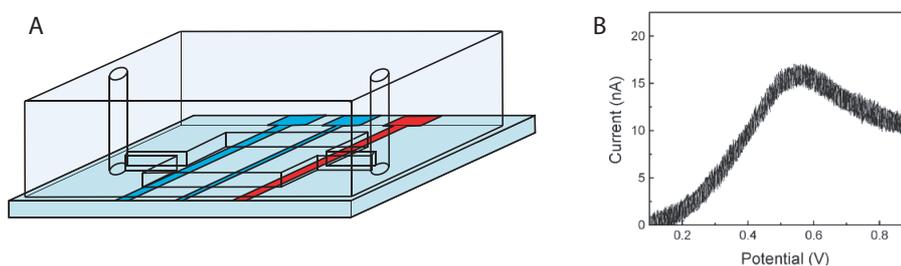


FIG. 7.1 – A. Schéma du dispositif microfluidique utilisé pour les mesures électrochimiques en milieu confiné. Les électrodes bleues sont en bande de platine (500 et 20  $\mu\text{m}$  de large), les électrodes rouge sont en argent (500  $\mu\text{m}$  de large). La chambre de mesure a pour dimensions : 0,5cm\*1cm\*100 $\mu\text{m}$ . B. Analyse par voltamétrie cyclique de l'oxydation de l'acide ascorbique ( $10^{-4}$  M) dans un tampon phosphate (PBS) sur une électrode en bande de 20  $\mu\text{m}$  de large dans le dispositif microfluidique de gauche. Le bruit observé ici est inhérent au potentiostat utilisé pour l'expérience. Figures adaptées de [219].

## Calibration

### *Électrode platinée*

Il a été montré dans les travaux précédents [218] qu'un dépôt de noir de platine sur la surface active d'électrodes constituées de fibre de carbone augmente la sensibilité et la sélectivité électrochimique de ces dernières, vis-à-vis des espèces libérées par les cellules dans cette étude. En effet, le noir de platine est en réalité un dépôt de platine dendritique qui modifie les propriétés électrochimiques intrinsèques de l'électrode ainsi que ses propriétés de surface. Les potentiels d'oxydation des espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote sur le platine sont décalés par rapport au carbone, ramenant ainsi la fenêtre des potentiels d'utilisation loin des potentiels limites où le solvant est oxydé (mur du solvant). De ce fait, il est plus aisé de distinguer les différentes vagues d'oxydation, rendant les mesures plus sélectives. De plus, la surface de platine dendritique est stable et poreuse. Il en résulte une augmentation la surface active de l'électrode, traduite expérimentalement par une augmentation du signal, tout en empêchant l'adsorption des protéines en surface, vérifié expérimentalement lors de la réalisation de voltamétries cycliques successives.

Ce même traitement a été utilisé sur les électrodes de platine en bande pour éviter l'adsorption des protéines sur leur surface, source habituelle des pollutions des électrodes de platine à nu, et pour augmenter le signal récolté à la surface de l'électrode. Afin de nous assurer du bon fonctionnement de telles électrodes, nous avons effectué une mesure électrochimique d'une solution d'acide ascorbique, molécule standard de calibration pour les analyses biochimiques. La figure 7.1 B illustre la vague d'oxydation de l'acide ascorbique sur l'électrode de platine platinée. La répétition du cycle de voltamétrie nous montre que l'absence de phénomènes d'adsorption sur la surface de l'électrode.

Toutes les opérations habituelles d'électrochimie comme l'électrodéposition, l'électrolyse pour décaper et nettoyer la surface de l'électrode de travail et les mesures standards de voltamétrie, d'ampérométrie ou de potentiométrie ont été exécutées avec grande facilité dans le même dispositif.

### *Confinement et culture des cellules*

La stérilisation du dispositif a été assurée dans un premier temps par un nettoyage à l'éthanol à 75%, suivi d'un traitement aux UV pendant quinze minutes avant chaque utilisation.

Pour tester la compatibilité biologique des dispositifs, des macrophages y ont été cultivés pendant plusieurs jours. Après l'introduction des cellules dans la chambre, le dispositif a été placé en repos pendant trois heures dans l'incubateur pour permettre aux cellules d'adhérer aux surfaces. Du milieu de culture frais a ensuite été perfusé dans la chambre avec un débit de 0,1  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant plusieurs jours. Une culture en boîte de Petri contrôle a été effectuée en parallèle. A densité d'ensemencement des cellules similaire, nous observons un taux de prolifération cellulaire comparable, avec une arrivée à confluence, où 90% de la surface de culture a été recouverte de cellules, au bout d'environ trois jours pour les deux conditions.

Cette expérience préliminaire montre que l'environnement du dispositif utilisé convient à la préparation des cellules pour la mesure et n'apporte pas de modification notable de leur cycle de division et de multiplication. Pour les expériences ultérieures de mesure électrochimique dans ce dispositif, les cellules seront donc préalablement introduites dans les chambres et laissées au repos afin qu'elles adhèrent convenablement aux surfaces et qu'elles retrouvent un métabolisme normal, comparable à celui des cellules cultivées dans des boîtes de Petri.

#### **7.1.2 Mesure du stress oxydant dans une chambre de culture**

L'activation chimique du stress oxydant des macrophages par un ionophore calcique, activateur du système enzymatique responsable de la libération des ROS et des RNS, a été choisie pour faire l'objet d'une étude de faisabilité dans un dispositif microfluidique. La présence de l'ionophore calcique (A23187) dans le milieu entourant les cellules provoque des modifications de la membrane cellulaire : elle devient perméable au calcium, espèce nécessaire dans la plupart des processus cellulaires en tant que messager secondaire [220]. La variation de calcium à travers la membrane cellulaire peut activer certaines enzymes, en particulier des NADPH oxydases et des NO synthases, entraînant alors la production enzymatique de ROS et de RNS. Nous allons montrer qu'une telle production peut être analysée de manière fiable par des mesures électrochimiques sur une petite population de cellules dans un dispositif microfluidique.

#### **Mesures contrôles sur cellules uniques**

Afin d'obtenir des éléments de comparaison dans un contexte bien connu, nous avons dans un premier temps effectué des mesures de la génération des ROS et des RNS par des cellules uniques dans la configuration de synapse artificielle, c'est-à-dire à l'aide d'une ultramicroélectrode de carbone platinée placée au contact de la cellule. Ce type de mesures, avec d'autres activateurs comme le LPS ou le PMA, est très bien maîtrisé dans le laboratoire [221, 26] et les paramètres expérimentaux de mesures électrochimiques établis dans ces conditions pourront être transposés aux analyses dans les dispositifs microfluidiques.

Ainsi, avec l'aide de micromanipulateurs et d'un contrôle visuel par microscopie inversée, une électrode à fibre de carbone platinée (après électrodéposition de noir de platine de 30  $\mu\text{C}$ ), servant d'électrode de travail, et une micropipette ont été placées à proximité de la membrane d'une cellule isolée. La stimulation de la cellule est effectuée en injectant avec la micropipette, dans le milieu environnant de la cellule, une solution de ionophore calcique (A23187) à 2  $\mu\text{M}$ . La réponse de la cellule à la stimulation chimique a été détectée par ampérométrie avec l'électrode

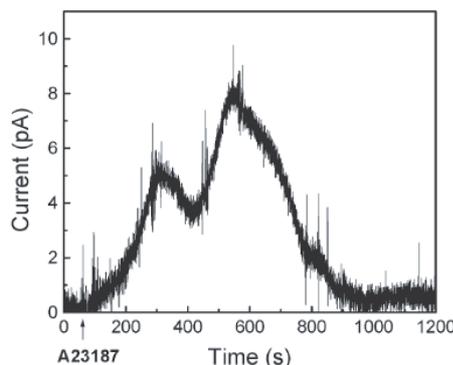


FIG. 7.2 – Mesure de la réponse ampérométrique d’une cellule unique à l’injection de ionophore calcique ( $2 \mu\text{M}$ ) dans la configuration de synapse artificielle. Une électrode de carbone platinée de  $10 \mu\text{m}$  de diamètre a été utilisée ( $E=850 \text{ mV VS ECSS}$  dans un tampon KRB).

de travail, à un potentiel fixé à  $850 \text{ mV}$  contre une électrode de référence de calomel saturée (ECSS). Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon KRB (Krebs’s Ringer Buffer).

La réponse typique d’une cellule unique à la stimulation chimique par l’ionophore calcique est illustrée par la figure 7.2. La génération d’espèces réactives commence quelques minutes après la stimulation et dure environ vingt minutes. Le signal se présente sous forme d’une vague augmentant lentement les premières minutes, atteignant ensuite une phase de réponse maximale pendant environ dix minutes, avec deux pics, et diminuant lentement jusqu’au retour à la ligne de base. En absence de stimulation, en injectant simplement du tampon, aucun signal n’a été détecté. Une telle réponse a été identifiée à ce qui est communément appelé flambée oxydative, phénomène de libération par les macrophages d’espèces réactives dérivées de l’anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . La charge totale a été calculée en intégrant le signal obtenu sur le temps de réponse. Elle permet d’accéder à la quantité d’espèces réactives libérées suite à la stimulation par le ionophore calcique. Une cellule génère dans ces conditions une charge coulométrique moyenne détectée d’environ  $2,6 \text{ nC}$  (sur 3 mesures), correspondant à la libération d’environ 10 femtomoles d’espèces électroactives. La variabilité des réponses au niveau de la cellule unique observée, même sur un échantillon de trois cellules, est caractéristique des analyses sur cellules uniques [26]. Les cellules diffèrent naturellement entre elles par leur taille et par leur métabolisme.

Nous utiliserons, pour les mesures suivantes en microsystèmes, ces paramètres de stimulation chimique ( $C_{A23187} = 2 \mu\text{M}$ ) ainsi que ces paramètres de mesure électrochimique (potentiel fixé à  $890 \text{ mV vs.}$  une électrode de référence  $\text{Ag/AgCl}^2$ ).

### Mesures dans le dispositif microfluidique

Après ces manipulations préliminaires permettant d’établir les paramètres de stimulation chimique et de mesure électrochimique de l’activation de la flambée oxydative sur des macrophages, par un ionophore calcique, nous avons poursuivi l’analyse dans les dispositifs microfluidiques.

<sup>2</sup>Le potentiel standard d’une électrode de référence de calomel saturée (ECSS) est de  $241 \text{ mV}$ , alors que celui d’une électrode de référence  $\text{Ag/AgCl}$  est de  $199 \text{ mV}$ . Le passage de l’utilisation d’une référence à une autre impose un déplacement du potentiel à appliquer de  $42 \text{ mV}$ . Nous avons utilisé une référence de calomel saturée pour cette expérience contrôle afin de nous assurer de la stabilité du potentiel

Pour chaque expérimentation, les électrodes ont été fraîchement préparées par un dépôt électrolytique de noir de platine de  $30 \mu\text{C}$  sur l'électrode de travail et de chlorure d'argent sur l'électrode de référence. Le dispositif a ensuite été soigneusement nettoyé par de l'alcool à 75% puis par de l'eau déionisée pour enfin être stérilisé par exposition aux UV pendant 15 minutes. Après un dernier rinçage avec le tampon de mesure, les cellules ont été introduites dans le dispositif puis laissées au repos dans l'incubateur pendant trois heures pour adhérer aux surfaces et retrouver un métabolisme normal. Le dispositif est ensuite monté sur un microscope inversé, le tout placé dans une cage de Faraday pour éliminer tout bruit électrique ou électromagnétique. Les mesures ampérométriques sont effectuées dans une salle thermostatée à  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , à un potentiel fixé à 890 mV contre l'électrode de référence Ag/AgCl. La stimulation est assurée par le remplacement du liquide dans la chambre par une solution de  $2 \mu\text{M}$  de l'ionophore calcique à travers les microcanaux en entrée.

#### *Variation du nombre d'individus analysés simultanément*

La flambée oxydative provoquée par l'ionophore calcique a été effectivement détectée dans le dispositif microfluidique pendant 15 minutes. La réponse d'un groupe de 20 cellules dure en moyenne dix minutes et prend une forme plus lissée que la réponse d'une cellule unique (figure 7.3 A). Le signal dépasse rapidement les 100 pA et reste stable pendant quelques minutes, avant de retomber lentement à la ligne de base. Le double pic, observé lors de la mesure contrôle sur cellule unique, n'apparaît plus puisque le signal a été intégré sur un petit groupe d'individus placés à des distances différentes de l'électrode et qui par nature ne répondent pas de manière totalement synchrone.

L'intégration du signal sur le temps de réponse donne une charge moyenne de libération d'espèces électroactives de 1,1 nC par cellule pour une population de 20 cellules. Cette charge moyenne est du même ordre de grandeur que celle de 2,6 nC obtenue lors de mesures en configuration de synapse artificielle. Une explication de la différence de charges collectées réside dans la configuration des mesures. En effet, dans le cas de la synapse artificielle, l'électrode de travail est placée au-dessus de la cellule, quasi au contact de sa membrane, alors que pour notre dispositif microfluidique, l'électrode est placée sur le support d'adhésion à côté des cellules. Les espèces électroactives ont alors le temps et l'espace de diffuser dans la chambre, augmentant la perte de signal par diffusion. Ces pertes sont minimisées dans la configuration de synapse artificielle. L'augmentation du nombre d'individus à 40 cellules accroît logiquement l'intensité du signal, mais sa forme et son temps de réponse restent les mêmes, avec une charge moyenne de libération d'espèces électroactives relativement constante à 1 nC par cellule.

#### *Stimulations successives*

La stimulation chimique par l'ionophore calcique a été répétée plusieurs fois sur une même population de cellules, à 450 secondes d'intervalle, permettant un retour du signal à la ligne de base entre chaque stimulation. Les stimulations successives d'une population provoquent des réponses très semblables (figure 7.3 B), mais diminuant en intensité après la cinquième stimulation. Cette diminution des signaux peut être causée par la diminution progressive de la production globale des ROS et RNS, correspondant à une limitation métabolique, ou par une pollution lente de la surface de l'électrode de travail. Cependant, le fait que deux stimulations successives génèrent des réponses similaires confirme que l'ionophore calcique n'agit que sur le transport des ions calcium et n'induit pas de réactions destructrices pour les macrophages.

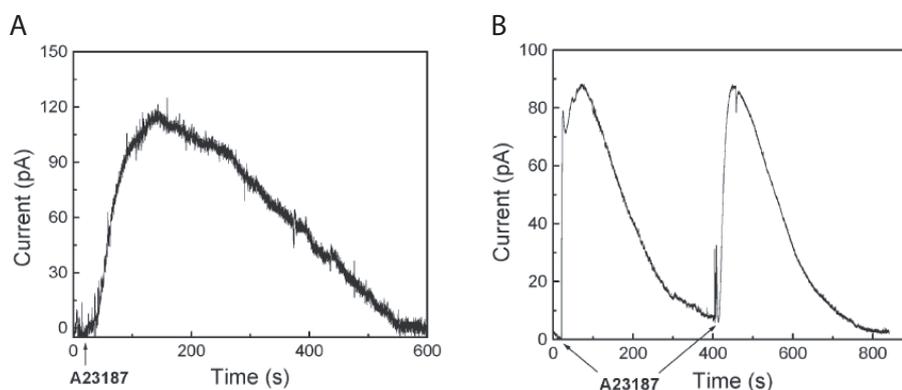


FIG. 7.3 – Réponses ampérométriques d’une population de cellules stimulées par l’injection de  $20 \mu\text{L}$  de ionophore calcique dans un dispositif microfluidique. Le potentiel de détection :  $E=890 \text{ mV VS Ag/AgCl}$ . A. Réponse de 20 macrophages à une stimulation. B. Réponse à plusieurs stimulations successives, à 450 s d’intervalle.

## 7.2 L’intégration d’un réseau de microélectrodes

L’intégration d’un réseau de microélectrodes dans les microsystèmes est une étape importante dans le développement d’une plate-forme microfluidique d’analyses électrochimiques. Outre les considérations essentielles liées aux caractéristiques mêmes des microélectrodes à fabriquer, afin qu’elles puissent répondre aux exigences des utilisations prévues, il était nécessaire de prendre en compte des considérations d’ordre pratique : la relative facilité de fabrication, l’éventuelle polyvalence de la configuration du réseau, ainsi que les manipulations macroscopiques reliant les microsystèmes aux matériels de mesure.

Grâce à l’adaptation des mesures électrochimiques connues dans des microsystèmes simples, détaillés dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence quelques déductions qui nous ont orientés dans la conception de nos réseaux de microélectrodes. Nous décrirons dans un premier temps les différentes caractéristiques des réseaux de microélectrodes que nous avons fabriqués, puis nous détaillerons les travaux de caractérisation de ces microélectrodes et enfin nous évoquerons une problématique rencontrée concernant les électrodes de référence.

La microfabrication de ces réseaux de microélectrodes a été possible grâce à une collaboration avec Guilhem Velve Casquillas, doctorant du Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, qui s’est intéressé au développement technique concernant les dépôts métalliques et le dépôt des couches isolantes.

### 7.2.1 Description des électrodes choisies

Réaliser dans un microsystème une analyse électrochimique sur cellules ne constitue pas seulement une recherche d’efficacité. En effet, les expériences d’électrochimie sur cellules uniques demandent une compétence spécialisée et un temps d’exécution particulièrement long. Une population de cellules présentant une grande variabilité au niveau des individus, il est nécessaire d’effectuer des analyses sur un grand nombre d’individus. Ce type d’analyse s’étale sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines, et les variations des facteurs externes, s’ajoutant à la variabilité intrinsèque des mesures, sont nombreuses : la température, la pression atmosphérique, le taux

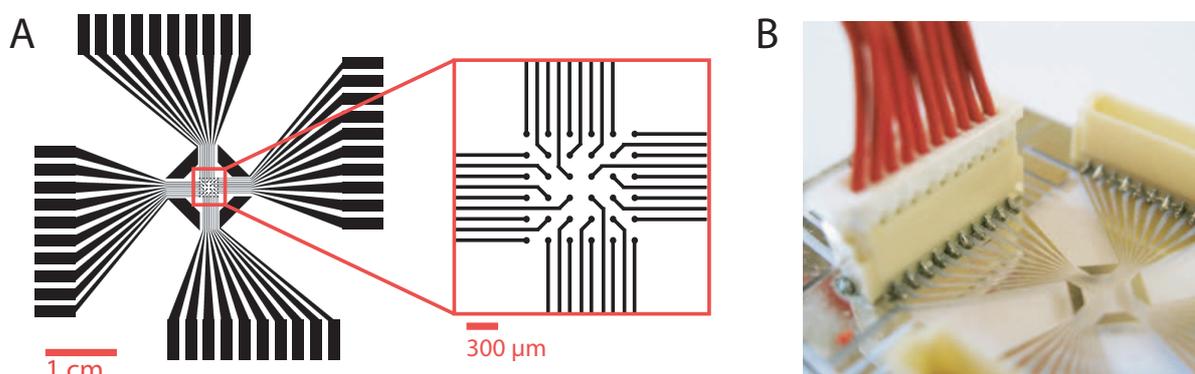


FIG. 7.4 – A. Schéma explicatif du réseau de microélectrodes. Les pistes sont larges de  $10 \mu\text{m}$  et les emplacements des surfaces actives sont représentés, dans le cadre agrandi, par des disques. B. Détail des connecteurs électriques collés sur la plaque de microélectrode grâce à une pâte à braser CSM.

d'humidité de l'air... Le fait de pouvoir réaliser en parallèle des analyses électrochimiques réduit indéniablement l'influence des facteurs externes et le temps de mesure sur plusieurs cellules. Par ailleurs, nous souhaiterions accéder à des mesures sur cellules en interaction pour observer des phénomènes de communication ou de corrélation des réponses au sein d'un petit groupe de cellules.

Néanmoins, les raisons premières de l'intégration de telles analyses dans les microsystèmes résident dans le contrôle simultané de plusieurs paramètres qui ne peuvent être contrôlés qu'individuellement dans les montages expérimentaux traditionnels. Conjuguer le positionnement relatif des cellules, la gestion du milieu dans lequel elles baignent dans le temps et dans l'espace, et l'analyse concertée des différents individus est ce que nous souhaitons réaliser avec une plate-forme d'analyse électrochimique.

### Conception du réseau de microélectrodes

Les développements préliminaires de microsystèmes simples nous ont permis de déterminer le type d'analyse électrochimique à intégrer dans un dispositif de mesures en parallèle. Nous avons choisi la mesure du stress oxydant sur les macrophages de souris pour la commodité de la culture des cellules, la simplicité d'activation de la flambée oxydative par l'ionophore calcique et la possibilité de détecter la libération des espèces électroactives par des microélectrodes planes. Nous utiliserons des microélectrodes planes dont la surface active a été réduite en un disque de taille comparable à une cellule afin d'effectuer des mesures sur cellules uniques.

Le réseau d'électrodes que nous avons conçu est un réseau de 36 électrodes de mesures, séparées de  $200 \mu\text{m}$ . Cette distance est choisie de telle sorte que les emplacements de mesure soient assez proches pour garder les électrodes regroupées sur une surface réduite, de  $1,2 \times 1,2 \text{ mm}^2$ , tout en les maintenant assez éloignées afin d'envisager différents types de canaux microfluidiques irriguant chaque chambre de mesure. De larges bandes planes trapézoïdales ont été placées autour du réseau de microélectrodes (figure 7.4 A). Ces bandes pourront être connectées à la masse afin de réduire les bruits éventuels.

Enfin, chacune des microélectrodes et des bandes entourant ces dernières est reliée à des

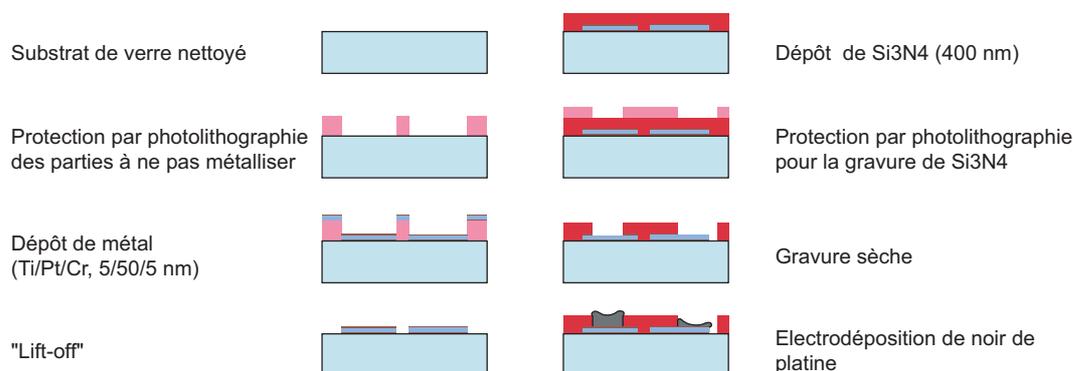


FIG. 7.5 – Etapes de fabrication du réseau de microélectrodes.

plages de soudure placées tout autour. L'ensemble des pistes métalliques recouvre une surface de  $24 \times 24 \text{ mm}^2$ , équivalente à celle d'une demi lame de microscopie standard. Cependant, le nombre de microélectrodes ne permettant pas d'effectuer manuellement chaque soudure, il a été nécessaire d'utiliser les techniques de gestion des contacts habituelles en électronique. Il existe une technique couramment utilisée de microcâblage appelée *wire bonding* qui permet des soudures électriques microscopique sur des surfaces aussi réduites que quelques centaines de microns carrés. Cependant, cette technique nécessite du matériel spécifique de placement des contacts et d'activation des soudures par chauffage à  $300^\circ\text{C}$  ou par ultrasons. Elle produit par ailleurs des soudures fragiles incompatibles avec les manipulations en laboratoire. Pour une raison de commodité, nous avons opté pour une technique macroscopique plus simple de soudure consistant à coller des connecteurs CMS de taille millimétrique par pâte à braser<sup>3</sup> (figure 7.4 B). Par simple chauffage, cette pâte mouille le métal et permet une soudure nette. Les plages de soudure placées en bordure ont été fixée à 1 mm de large sur 5 mm le long, permettant de réaliser sans difficultés les contacts.

### Microfabrication des électrodes

La microfabrication des réseaux de microélectrodes, basée sur les technologies de lithographie optique et de *lift off*, est décrite en détail dans l'annexe D. Le substrat utilisé consiste en une demi lame de verre de microscopie préalablement nettoyée dans un mélange d'acide sulfurique et d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$  70 : 30) afin d'éliminer tout résidu organique. Une couche de résine photosensible a ensuite été déposée sur le substrat et structurée par lithographie optique afin de protéger les parties du substrat ne correspondant pas aux pistes métalliques. Une fine couche de platine de 50 nm a été déposée sur toute la surface du substrat, avec une couche de titane de 5 nm déposée au préalable en tant que couche adhésive. Pour terminer, la résine protectrice est dissoute dans un bain d'acétone sous ultrason, éliminant par là le métal superflu qui n'était pas au contact avec le substrat (figure 7.5). Après un dernier nettoyage au plasma, nous obtenons alors des électrodes en bande sur un substrat en verre. Plusieurs métaux peuvent

<sup>3</sup>La pâte à braser est utilisée pour la soudure en surface des composants à technologie C.M.S. (Composants Montés en Surface). Elle est constituée d'un alliage en poudre très fine,  $\text{Sn}_62\text{PbAg}_2$ , en suspension dans un flux résineux contenant des activateurs chimiques, assurant une parfaite coalescence et brasabilité des surfaces métalliques après une étape de chauffage à  $200^\circ\text{C}$ .

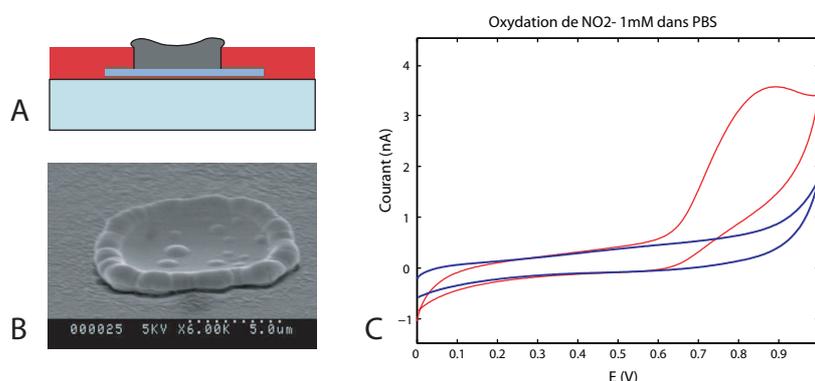


FIG. 7.6 – A. Schéma d'une électrode plane platinée. B. Image en microscopie électronique à balayage d'une microélectrode en disque platinée, 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, 10  $\mu\text{C}$  de dépôt de noir de platine. C. Analyse par voltamétrie cyclique de l'oxydation du nitrite à 1 mM, la vitesse de balayage est de 50 mV/s.

être utilisés en guise d'électrodes. Parmi les choix les plus courants pour les électrodes planes servant aux mesures électrochimiques sur cellules, le platine, l'or et l'ITO -oxyde d'indium dopé à l'étain - sont les plus fréquemment utilisés. Nous avons choisi le platine pour les raisons pratiques suivantes : il est compatible avec la technique de soudure choisie et les dépôts de noir de platine, permettant d'augmenter la sensibilité de la réponse au stress oxydant, sont les plus stables sur ce métal [222]. L'épaisseur de 50 nm permet une bonne stabilité de l'électrode dans le temps.

Pour délimiter la surface active des microélectrodes, une couche de nitrure de silicium  $\text{Si}_3\text{N}_4$  de 400 nm a été déposée sur toute la surface du substrat et a été ensuite gravée à des endroits spécifiques pour découvrir le métal, aussi bien au niveau des surfaces actives qu'au niveau des contacts. Le nitrure de silicium a été choisi pour sa stabilité dans le temps, sa porosité réduite et sa biocompatibilité [223, 224]. Ce dépôt isolant adhérent mal au platine, il a été nécessaire d'ajouter une couche d'adhésion en chrome de 5 nm entre le platine et le nitrure de silicium (figure 7.5). Cette couche adhésion, différente de la première en titane, évite également le décollement des électrodes lors des étapes de gravure humide nécessaire pour rendre accessible la surface active des microélectrodes. De cette manière, nous avons obtenu un substrat biocompatible et stable contenant un réseau de microélectrodes en disque de platine de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, des plages métalliques de réduction de bruit et des plages de soudure en périphérie.

### Modification des surfaces actives

Du noir de platine a été électrodéposé sur les microdisques de platine servant d'électrode de travail afin d'augmenter la sensibilité et la sélectivité électrochimique de cette dernière vis-à-vis des espèces dérivées de l'oxygène et de l'azote libérées par les cellules [218, 225].

Deux techniques sont couramment utilisées pour réaliser un dépôt dendritique<sup>4</sup> de platine sur les électrodes planes : la galvanométrie et l'ampérométrie. Il a été montré que la manière dont le noir de platine est déposé influe sur la forme et la densité du dépôt [226, 198] (figure 7.6). La technique que nous avons choisie pour l'électrodéposition est l'ampérométrie, la structure

<sup>4</sup>Croissance dendritique : Croissance cristalline au cours de laquelle les sommets d'un cristal croissent plus vite que les faces qui apparaissent alors en creux.

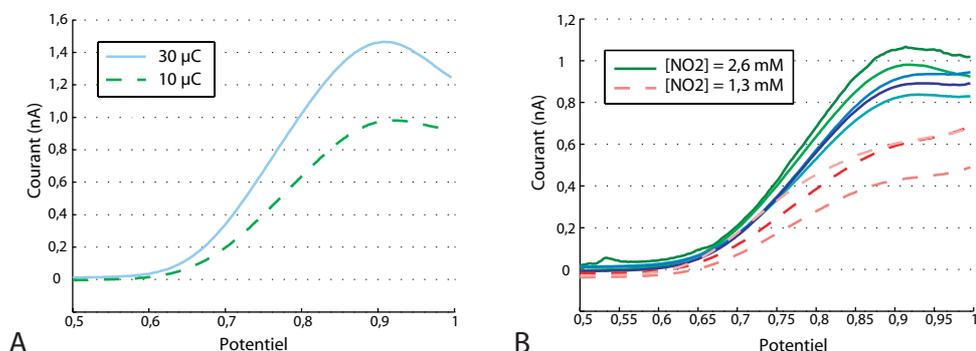


FIG. 7.7 – Voltamétries cycliques de l'oxydation du nitrite sur deux microélectrodes en disque platinées à 10 et 30  $\mu\text{C}$ . Les mesures sont effectuées dans un tampon PBS contre une électrode de référence Ag/AgCl. La vitesse de balayage est de 50mV/s. A. Oxydation de 2,6 mM de nitrite sur deux électrodes en disque platinées. B. Répétition de cycles voltamétriques sur l'électrode de 10  $\mu\text{C}$  à deux concentrations différentes de nitrite : ces mesures non reproductibles dans la configuration de mesure montre néanmoins la sensibilité de l'électrode à la différence de concentration de nitrite..

des dépôts résultants étant la plus convenable pour cette application. La déposition de platine dendritique sur la surface active d'une microélectrode est réalisée par réduction de l'acide hexachloroplatinique  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ , et est suivie par la mesure du courant d'électrodéposition du platine  $\text{Pt}_{IV}$  en  $\text{Pt}^0$ . La quantité de noir de platine déposé est déterminée en intégrant le courant d'électrodéposition au cours du temps. Cette méthode produit un dépôt de platine dense et de forme lissée (figure 7.6) qui perturbe au minimum le volume de la chambre de mesure.

Notons que la vitesse d'électrodéposition varie d'une microélectrode à l'autre et cela se traduit alors par des électrodes plus ou moins bruitées. Certaines microélectrodes ne sont pas utilisables. Les variations des vitesses de réaction sont dues à la présence de particules sur la surface du métal. Malgré une étape d'électrolyse destinée à nettoyer la surface de platine avant l'électrodéposition, les variations persistent. Une étude poussée sur la préparation de la surface du métal, de l'électrodéposition et du comportement électrochimique des dépôts de noir de platine sera nécessaire pour obtenir un réseau de microélectrodes comparables les unes aux autres.

## 7.2.2 Caractérisation des microélectrodes

### Stabilité du signal

Des analyses par voltamétrie cyclique ont été effectuées afin de déterminer le comportement de ces microélectrodes platinées vis-à-vis d'espèces électroactives libérées par les cellules au cours du stress oxydatif. Le nitrite  $\text{NO}_2^-$  est une espèce dérivée de l'oxydation de plusieurs RNS (espèce électroactives dérivées de l'azote) et est stable dans le temps. Nous l'avons utilisé pour caractériser nos électrodes. Les mesures ont été effectuées dans une petite goutte de solution recouvrant les microélectrodes, dans laquelle est plongée une électrode de référence de fil d'argent recouverte d'un dépôt de chlorure d'argent. Aucune contre-électrode n'a été utilisée pour nos mesures.

Les figures 7.7 A et B montrent que le nitrite est effectivement détecté à la surface des microélectrodes. Cependant, pour chaque électrode, l'intensité de la vague d'oxydation n'est pas stable, variant aléatoirement sans passivation apparente. De plus, la forme de la vague semble varier avec chaque électrode, ce qui révèle une variation de la sensibilité d'électrode en électrode.

La différence de comportement de chaque microélectrode peut être expliquée par une surface active différente. Nous avons vu que la surface même du platine ainsi que la variation du courant lors de l'électrodéposition a une certaine influence sur la structure du dépôt de noir de platine. Cette variation de la surface dendritique du dépôt pourrait être à l'origine de la différence en sensibilité de chaque microélectrode. Notons néanmoins que ces mesures effectuées relativement tôt dans l'étude n'ont pas bénéficié de l'optimisation du montage expérimental permettant des signaux plus reproductibles. Ainsi, les variabilités d'électrodéposition et de courant d'oxydation des nitrites observés ici pourraient également être influencées par le montage expérimental, tout particulièrement par la variation en chaque mesure de la surface de l'électrode de référence plongée dans la solution (voir le paragraphe 7.2.3, page 140). Cependant, comme le montre la figure 7.7 B, les microélectrodes répondent à la variation de concentration des espèces actives. Nous avons donc poursuivi cette étude par la calibration des mesures dans le dispositif microfluidique.

Il sera néanmoins nécessaire de pousser l'étude de la microélectrode et du dépôt du noir de platine plus loin, comme évoqué dans le paragraphe précédent, afin de comprendre et de contrôler le processus d'électrodéposition sur ces microélectrodes ainsi que le comportement des surfaces actives qui en résulte. En effet, il est primordial de s'assurer que le réseau de microélectrodes donne des signaux reproductibles.

### Calibration des microélectrodes

La calibration des microélectrodes a été effectuée dans un milieu confiné. Des canaux microfluidiques ont été placés au-dessus des électrodes et des solutions de nitrites de différentes concentrations diluées dans un tampon phosphate, ont été injectées dans les canaux. Aucune précaution particulière n'a été prise lors de ces mesures, elles ont été effectuées en dehors de la cage de Faraday, dans un environnement isolé du reste du laboratoire. Le signal a néanmoins été filtré à 10 Hz. Notons que chaque injection apporte un bruit inhérent à la manipulation (figure 7.8 A). En dehors de ces manipulations, le bruit quadratique moyen observé pour les meilleures surfaces actives est de 0,5 pA, ce qui est comparable aux mesures effectuées avec des microélectrodes de carbone platinées utilisées dans un environnement protégé du bruit ambiant (cage de Faraday). Notons qu'il n'existe aucune corrélation entre l'intensité du bruit relevé à chaque microélectrode et la taille de son dépôt de noir de platine.

Les électrodes utilisées pour les mesures de calibration possèdent un dépôt de noir de platine correspondant à 3  $\mu\text{C}$  et 15  $\mu\text{C}$  de charge d'électrodéposition. Les courbes de calibration présentées par la figure 7.8 B montrent une relation quasi-linéaire entre l'intensité du courant mesuré et la concentration de la solution en  $\text{NO}_2^-$  pour chaque électrode. Cependant, le faible nombre de mesures pour chaque microélectrode ne nous permet pas de conclure, pour le moment, sur des valeurs caractéristiques quantitatives. Une grande différence de sensibilité est néanmoins relevée, due à la différence du dépôt de noir de platine. Il a été montré qu'une augmentation de la charge de platine déposée permet d'augmenter la sensibilité de la mesure [21]. En effet, en passant d'une charge de 3  $\mu\text{C}$  à une charge de 15  $\mu\text{C}$  en dépôt de noir de platine, la limite de concentration mesurée a été diminuée par 5, passant de 200  $\mu\text{M}$  à 40  $\mu\text{M}$ . Ceci est dû à une

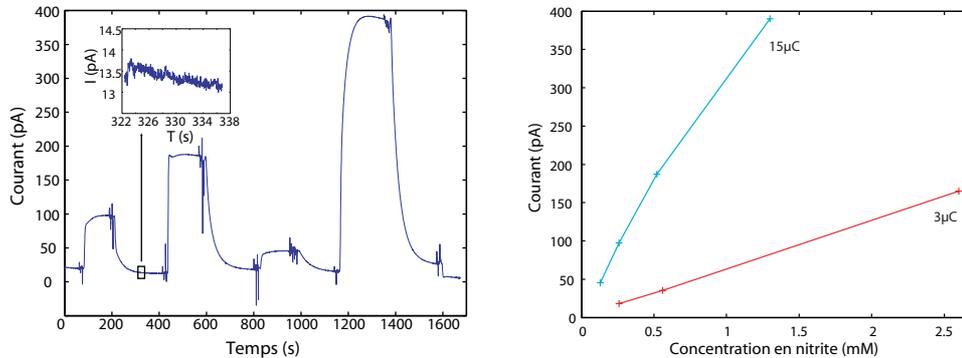


FIG. 7.8 – Calibration de deux microélectrodes platinées à  $3 \mu\text{C}$  et  $15 \mu\text{C}$  par rapport à la concentration en  $\text{NO}_2^-$ . Les mesures sont effectuées dans un tampon PBS au potentiel fixé à 850 mV contre une électrode de référence Ag/AgCl.

augmentation de la surface active de l'électrode.

Il nous a été impossible de tester les temps de réponse des microélectrodes car l'injection des liquides dans ce système n'est pas instantanée. Nous introduisons les liquides dans les chambres microfluidiques par un système de réservoirs, et c'est la différence de pression hydrostatique entre ces deux réservoirs qui entraîne le liquide dans un sens ou dans l'autre pour un canal. De ce fait, pour remplacer une solution dans les canaux microfluidiques, nous devons d'abord vider un réservoir d'une première solution pour la remplacer par une deuxième. Pour empêcher l'entrée de bulles dans les canaux qui interromprait l'expérience, il nous est nécessaire de laisser une petite goutte à l'entrée même du canal lors du changement de solution. Cette petite goutte, qui par conséquent contient une concentration intermédiaire, traversera l'intégrité du canal microfluidique en quelques secondes. Ce temps est nécessairement grand puisque le rapport de volume entre un canal microfluidique et une goutte de  $1 \mu\text{L}$  est de l'ordre de 1000. Le temps que la concentration dans les canaux se stabilise est alors supérieur aux temps de réponse des microélectrodes qui est habituellement inférieur à la dixième de seconde, même pour les microélectrodes les plus lentes. A titre indicatif, notons que le temps de réponse des ultramicroélectrodes de carbone platinées, de  $3 \mu\text{m}$  de diamètre, contre  $10 \mu\text{m}$  pour nos microélectrodes, est de 4 ms [227]. Pour tester le temps de réponse des microélectrodes, il sera nécessaire d'envisager un système d'injection microfluidique en ajoutant des vannes dans le dispositif, permettant d'effectuer le changement des fluides à l'échelle de la milliseconde.

### 7.2.3 Choix de l'électrode de référence et de son emplacement

#### Configuration actuelle

Nous avons choisi, dans un premier temps, de garder une électrode de référence macroscopique pour des raisons de commodité. En effet, intégrer des électrodes de référence dans le dispositif nécessite une étape supplémentaire de photolithographie et de déposition métallique qui rallongerait considérablement le temps de fabrication des réseaux de microélectrodes. De plus, le positionnement des électrodes de références vis-à-vis des microélectrodes constitue une problématique en tant que telle. Il n'était pas avantageux d'accumuler ici les difficultés.

L'électrode de référence que nous utilisons est une pseudo électrode de référence constituée

d'un fil d'argent recouvert d'un dépôt de chlorure d'argent, solide cristallin très peu soluble en solution aqueuse. Cette électrode plonge soit dans une goutte de solution ionique qui recouvre la surface occupée par les microélectrodes, soit dans une goutte reliée aux microélectrodes via des canaux microfluidiques. La présence simultanée de l'argent insoluble sous ses deux degrés d'oxydation  $\text{Ag}$  et  $\text{Ag}^+$  permet le maintien du potentiel de cette électrode dans la solution. Ceci n'est vrai que lorsque le courant traversant cette électrode reste faible. Dans le cas contraire, des réactions d'oxydo-réduction peuvent avoir lieu à sa surface, ce qui pourrait faire varier son potentiel et qui nécessiterait l'emploi d'une contre-électrode. Par ailleurs, le potentiel imposé par le couple  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  est sensible à la variation de la concentration en ions  $\text{Cl}^-$  dans la solution. Malgré la forte concentration en ions  $\text{Cl}^-$  des solutions tampons utilisées<sup>5</sup>, des réactions chimiques dans un volume aussi faible que celui des microcanaux, de l'ordre de la dizaine de picolitres, peuvent faire varier fortement les concentrations. Ainsi, l'emplacement de l'électrode de référence doit être obligatoirement dans un gros volume ou dans un flux apportant constamment du milieu frais pour maintenir les concentrations constantes et par conséquent maintenir le potentiel de l'électrode constant.

Habituellement, ce type d'électrode de référence est tout simplement plongé dans la solution de mesure, de 5 mL dans une boîte de Pétri, sans précaution particulière sur la variation de sa surface totale immergée. Cependant, des précautions sont nécessaires dans le cas des petits volumes utilisés avec les réseaux de microélectrodes. En effet, la goutte de solution dans laquelle est plongée l'électrode de référence fait au plus 500  $\mu\text{L}$  en volume et est fortement sujette à un changement de volume, soit par l'évaporation, soit par addition du volume provenant d'un autre réservoir. Ces variations, induisant une variation de la surface de l'électrode de référence en immersion dans la solution, se traduisent dans la pratique par une fluctuation de la ligne de base<sup>6</sup> dans les mesures ampérométriques. Rappelons que la mesure d'un potentiel est toujours connue à une chute ohmique près correspondant à la chute de tension lorsqu'un courant traverse un milieu résistif. La résistance de la solution dépend directement du chemin fluide séparant l'électrode de travail et l'électrode de référence. Il convient de garder cette chute ohmique stable sur la durée de la mesure. Pour remédier à ces fluctuations, nous avons fixé la surface de l'électrode de référence qui sera submergée en insérant latéralement cette dernière dans un puits (figure 7.9). Ainsi, la partie de l'électrode dépassant de la paroi du puits sera continuellement submergée indépendamment du niveau du liquide. Un tel puits a été facilement fabriqué avec un morceau de PDMS troué par un emporte-pièce, et l'adhésion naturelle du PDMS sur les surfaces plane a permis de placer ce puits au-dessus des microélectrodes en limitant au maximum les risques de fuite. Cette manoeuvre a effectivement permis une meilleure stabilité de la ligne de base lors des mesures ampérométriques.

### Configuration multi-électrodes

Dans le cas d'analyses prenant en compte plusieurs électrodes de travail au même moment, la question qu'il convient de se poser concerne l'électrode de référence. Une cellule électrochimique est constituée habituellement d'une solution ionique et de deux électrodes, une électrode de

---

<sup>5</sup>Les solutions tampons utilisées lors des mesures électrochimiques sont le tampon phosphate PBS et le tampon KRB.

<sup>6</sup>La ligne de base correspond à la mesure effectuée en l'absence de réaction chimique particulière. Pour les mesures en ampérométrie, la ligne de base correspond à la mesure du courant traversant la solution, une fois la polarisation stabilisée.

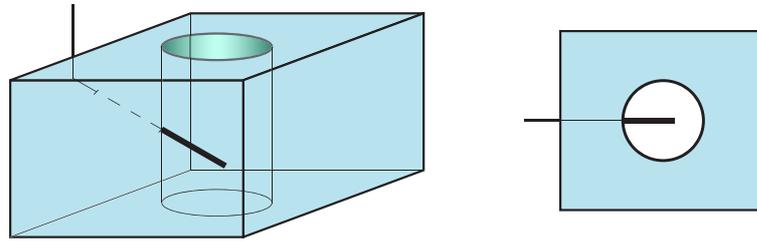


FIG. 7.9 – Principe d’insertion d’une électrode de référence dans un puit dans le but de minimiser la fluctuation sur signal ampérométrique.

travail et une électrode de référence, voire trois, en rajoutant une contre-électrode dans le cas où un fort courant faradique traverse la solution. Plusieurs travaux ont utilisé des réseaux de microélectrodes contre une seule électrode de référence ou pseudo-référence, lorsque son potentiel n’est pas fixé, soit en potentiométrie, pour la mesure des potentiels d’action traversant un réseau neuronal [222, 206, 203], soit en ampérométrie, mais dans le cas précis où le potentiel à chaque électrode de travail est le même [205, 142].

Dans les configurations habituelles de mesures ampérométriques, il est intéressant de noter que peu d’électrodes de travail sont utilisées simultanément. Hafez *et al.* ont utilisé quatre microélectrodes rassemblées dans un puit carré de  $10\ \mu\text{m}$  de côté pour effectuer quatre mesures simultanées d’événements d’exocytose d’une cellule chromaffine [205]. La corrélation de ces mesures simultanées leur a permis de déterminer la position de la libération cellulaire d’espèces électroactives avec une précision de quelques centaines de nanomètres. Dans ce cas précis, les quatre électrodes étaient fixées à un même potentiel contre une électrode de référence commune plongée dans la solution. Les courants étaient directement comparables car les électrodes de travail se trouvaient à quelques microns d’écart, et les chemins fluidiques séparant l’électrode de référence et chaque électrode de travail étaient assimilables. Pour notre réseau de microélectrodes, la distance minimale séparant deux électrodes de travail est de  $200\ \mu\text{m}$ , et elle peut aller jusqu’à  $2\ \text{mm}$ . En travaillant avec une seule électrode de référence, il pourra être nécessaire de considérer les variations de distance pour la comparaison des signaux mesurés. Dans la pratique, les milieux biologiques sont suffisamment conducteurs pour que les différences de distance entre chaque microélectrode de travail à l’électrode de référence ne se ressentent pas dans la mesure. Cependant, et en règle générale, il est toujours plus favorable de travailler dans des conditions où l’électrode de référence est le plus proche possible de l’électrode de travail. De plus, en multipliant les mesures électrochimiques, le courant total traversant le circuit sera inévitablement démultiplié, le rendant assez élevé pour déclencher des réactions électrochimiques qui pourraient altérer la nature de l’électrode de référence. Ceci nous mène alors à considérer également l’intégration d’une contre-électrode au sein du dispositif.

En ce qui concerne les mesures ampérométriques à travers plusieurs électrodes à potentiels différents, des exemples macroscopiques ont montré le fonctionnement indépendant de chaque électrode vis-à-vis d’une électrode de référence commune [228]. Cette configuration se retrouve souvent en microfluidique dans les mesures ampérométriques en fin de canal de séparation électrophorétique où plusieurs électrodes fixées, souvent deux, à différents potentiels, permet la discrimination d’espèces chimiques difficiles à séparer [229, 230].

L’intégration d’une cellule électrochimique entière dans un dispositif microfluidique implique la plupart du temps l’intégration d’une contre-électrode pour éviter toute réaction parasite au

niveau de l'électrode de référence. Dans notre cas de figure, envisager l'intégration d'électrodes supplémentaires n'est pas encore souhaitable car cela risquerait de surcharger le dispositif et les étapes de fabrication. Il convient dans un premier temps de s'assurer à tout moment que les courants mesurés ne dépassent pas une certaine limite. Si nécessaire, nous pourrions utiliser, en guise de contre-électrode, un des connecteurs fluidiques qui sont des tubes métalliques insérée dans le bloc d'élastomère. Cette configuration serait plus souhaitable, car le dégazage à la surface de la contre-électrode, lors de réactions complémentaires ne se ferait pas dans les microcanaux et ne perturberait donc pas le fonctionnement du dispositif.

Enfin, le cas de l'intégration de plusieurs électrodes de référence proches d'électrodes de travail n'est pas traité. Toutes ces électrodes seraient baignées dans la même solution. La distorsion éventuelle des champs électriques pourrait se faire au détriment des mesures. Une étude, même expérimentale, sur ce point précis pourrait nous donner des éléments intéressants d'amélioration du système. Cependant, le manque d'électronique dédiée, comme un multipotentiostat, nous empêche d'effectuer de telles études pour le moment.

## 7.3 Développement d'un système intégré

Après avoir déterminé les conditions de mesures électrochimiques intégrables dans un dispositif microfluidique et conçu des réseaux de microélectrodes permettant d'effectuer des analyses électrochimiques localisées, nous abordons la question de l'intégration de ces microélectrodes dans un dispositif microfluidique et de leur utilisation pour l'analyse électrochimique sur cellules. Réaliser un tel dispositif microfluidique consiste simplement en l'assemblage de chambres de mesure sur le réseau de microélectrodes, le positionnement de cellules et leur activation, accompagné du suivi des réactivités cellulaires par analyse électrochimique.

Nous avons étudié individuellement, au cours des chapitres précédents, les différentes fonctionnalités d'une éventuelle plate-forme d'analyses électrochimiques sur cellules uniques. L'étude de chacune de ces fonctionnalités, le positionnement cellulaire, le maintien en survie de cellules dans un milieu confiné et les mesures électrochimiques en milieu confiné, a dégagé des problématiques singulières qu'il convient de garder à l'esprit lors de l'assemblage des différentes fonctionnalités en un dispositif intégré.

Nous aborderons dans un premier temps la conception d'un dispositif intégré permettant le positionnement de cellules dans des chambres microfluidiques contenant chacune une microélectrode, leur activation chimique et leur analyse électrochimique. Dans un deuxième temps, la mise en œuvre de telles analyses sera détaillée.

### 7.3.1 Conception du dispositif intégré

Nous avons conçu un dispositif entièrement intégré constitué d'un substrat de verre, comprenant le réseau de microélectrodes décrit dans le paragraphe 7.2.1 précédent, et d'un bloc de PDMS comprenant un réseau de canaux microfluidiques, décrit dans le chapitre 3, permettant la gestion des fluides et des cellules dans les chambres microfluidiques. En alignant ces chambres de mesure au-dessus du réseau de microélectrodes, nous obtenons alors un réseau de chambres de mesure confinées contenant chacune une microélectrode. Ainsi, un nombre défini de cellules peut être positionné dans un milieu confiné correspondant aux chambres de mesure, le milieu fluidique de chacune de ces chambres pourra être contrôlé dans le temps et dans l'espace par

les canaux microfluidiques et enfin leur contenu en espèces électroactives pourra être suivi par analyse électrochimique.

### Rappel du contexte de l'analyse électrochimique

Grâce aux études effectuées dans un microsystème simple, nous avons pu déterminer les objets et les conditions d'analyses convenables à des analyses électrochimiques en milieu confiné. Dans un premier temps, nous avons confirmé la pertinence des microélectrodes planes pour le suivi en temps réel d'espèces électroactives libérées par une cellule (paragraphe 6.3, page 120). Nous avons ensuite montré la possibilité de détecter le stress oxydant de macrophages de souris suite à une activation chimique par un ionophore calciqum dans un dispositif microfluidique à l'aide d'une microélectrode en bande platinée (paragraphe 7.1.1, page 129). Cette dernière étude a été centrée sur la mesure de la réponse collective de macrophages et a été effectuée sur plusieurs dizaines de cellules dans une chambre de mesure d'un volume de l'ordre du microlitre, très largement supérieur au volume d'une cellule qui est de l'ordre de grandeur du picolitre. Malgré ses nombreux avantages, notamment d'automatisation et de parallélisation des mesures, une telle étude souffre de la perte d'information due à la mesure simultanée des réponses cellulaires individuelles et à la dilution des espèces électroactives, de la même manière que dans le cas d'une analyse électrochimique macroscopique sur une grande population de cellules.

Nous nous proposons d'affiner ces mesures en diminuant la taille des chambres de mesure et des microélectrodes. Ainsi, nous pourrions obtenir des informations plus précises, avec un moindre risque de dilution des espèces à mesurer, tout en s'offrant le choix de mesurer une réponse collective ou une série de réponses individuelles. La distinction entre ces deux types de mesures ne réside pas seulement dans la différence du nombre de cellules interrogées. Une réponse collective est représentative des phénomènes biologiques liés à la réaction d'un tissu ou d'un groupe de cellules et ne doit pas être négligée. Cependant, du fait de la variabilité des cellules au niveau de leur avancement dans leur cycle cellulaire et de leur expression génétique, la réponse des cellules est en fait un ensemble hétérogène moyenné lors d'une analyse sur un groupe de cellules. Pour accéder à des informations précises à propos des mécanismes sous-jacents des phénomènes de flambée oxydative, il est nécessaire d'analyser les réponses à l'échelle de l'individu.

Les analyses à l'échelle de la cellule unique demandent des précautions particulières au niveau de la mise en œuvre et au niveau de l'interprétation des résultats. D'abord, les événements de mesure doivent être nombreux pour avoir accès à des données statistiques. Le nombre de cellules à interroger dépend beaucoup de la variabilité au sein même de la population de cellules. Selon son homogénéité, il peut être nécessaire d'analyser jusqu'au millier de cellules. Sachant que le temps de mesure est limité, ce nombre dépend également de l'objet de la mesure. Après une demi-heure dans le tampon de mesure, les cellules ne sont plus considérées comme viables, et elles ont eu le temps d'accumuler des réactions de stress liées aux conditions de mesure. Ainsi, dans le cas de l'exocytose, un événement dure quelques dizaines de millisecondes et sur une même cellule, plusieurs dizaines de pics peuvent être analysés, selon la taille de l'électrode. Au contraire, le nombre de mesures de stress oxydatif sur une cellule unique est limité à une mesure par cellule puisque ce phénomène engendre un mécanisme de durée variable qui demande ensuite un temps de régénération des espèces relativement long. Une deuxième précaution liée aux mesures à l'échelle de la cellule unique réside dans le conditionnement des cellules. En effet, la plupart des cellules nécessitent un environnement particulier pour avoir un comportement

considéré comme normal. L'interaction avec une surface au travers des points focaux d'adhésion cellulaire et les interactions intercellulaires au travers des jonctions serrées, pour les cellules en contact entre elles, ou au travers de messagers chimiques, pour les cellules plus éloignées, sont parmi les critères les plus importants. Dans le cas où l'environnement des cellules ne satisfait pas les conditions habituelles, leur comportement sera alors considéré comme biaisé. Ce problème est moins critique pour les cellules circulantes, par exemple les cellules sanguines, car elles sont par nature individualisées dans leur milieu biologique.

Le cas des macrophages est intermédiaire. Ce sont des cellules circulantes qui sont connues pour leur propriété d'adhésion sur certains tissus. Ainsi, ce sont des cellules qui devraient supporter à la fois la circulation dans des canaux microfluidiques et l'immobilisation dans les chambres de mesure. Elles devraient également, lorsqu'elles ont adhéré à une surface et ont subi un réarrangement de leur structure interne, présenter deux pôles différents, un pôle basal correspondant à la portion de la membrane cellulaire impliquée dans l'adhésion au substrat et un pôle apical correspondant à la partie de la membrane cellulaire au contact plus direct avec le milieu fluide environnant. Ces différents pôles présentent des comportements différents pour de nombreux événements biologiques.

### Configuration

L'utilisation d'un dispositif microfluidique permet de contrôler les paramètres pertinents pour les mesures sur cellules en général, et pour les mesures du stress oxydatif en particulier. Pour expliciter cette affirmation, considérons une microélectrode platinée plane de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre telle celles décrites dans le paragraphe 7.2.1, page 134.

Nous avons vu, dans le chapitre 3, qu'en choisissant convenablement les caractéristiques géométriques du réseau de microcanaux, il était possible de piéger une ou plusieurs cellules dans une chambre microfluidique. En assemblant cette chambre au-dessus de la microélectrode, nous obtenons une chambre de mesure. De plus, la gestion des flux dans le réseau de microcanaux permet le maintien d'un environnement fluide stable dans les chambres de mesure qui ne perturbera ni les cellules ni les mesures, ce qui est d'autant plus important lorsque les cellules ne se trouvent pas directement posées sur l'électrode. Les changements du contenu fluide des chambres se feront alors par diffusion des molécules, en changeant le contenu fluide des canaux. De cette manière, un tel dispositif microfluidique nous permet d'effectuer des mesures du stress oxydant de façon *quasi* comparable à la configuration traditionnelle où une microélectrode est approchée, au moyen de micromanipulateurs, de la surface d'une cellule ou d'un groupe de cellules adhérentes sur une boîte de Petri. La multiplication de chaque chambre de mesure en un réseau et l'automatisation des manipulations donnent un avantage pratique au dispositif microfluidique sur le montage traditionnel. Notons néanmoins que le confinement imposé par les géométries du dispositif pourrait avoir un effet néfaste sur les cellules, tout particulièrement pour des chambres contenant plusieurs cellules. En effet, lorsque le stress oxydant est déclenché, les cellules libèrent des espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote extrêmement toxiques. Le confinement et la stabilité de l'environnement permettent certes le maintien de ces espèces réactives dans un milieu confiné pour améliorer les mesures, mais ces mêmes avantages s'obtiennent au détriment de la survie de cellules. Il convient de repérer les concentrations limites au-delà desquelles les espèces réactives sont toxiques et de construire les chambres de telle sorte que le nivellement des concentrations se fasse assez rapidement pour éviter un stress supplémentaire ou même la mort rapide des cellules.

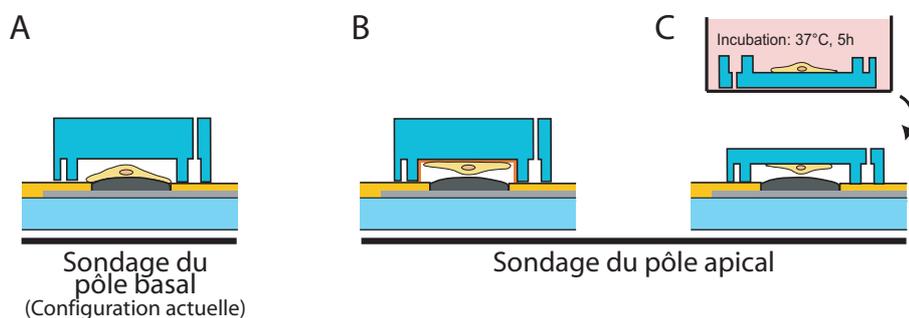


FIG. 7.10 – Différentes configurations d'analyse électrochimique dépendant de l'assemblage du dispositif. A. Configuration actuelle, le dispositif est assemblé directement et les cellules sont piégées sur les électrodes. B. Assemblage identique au premier cas, mais avec une étape de traitement du PDMS pour favoriser l'adhésion des cellules sur ce dernier. C. Piégeage des cellules dans les chambres dans un premier temps, suivi d'un repos pour les cellules dans un grand volume de tampon et enfin terminant par un assemblage au-dessus des microélectrodes.

L'intérêt du dispositif microfluidique intégré que nous utilisons est qu'il permet des flexibilités supplémentaires au montage générique décrit ci-dessus en modifiant légèrement les étapes d'assemblage ou en changeant la forme du réseau de canaux. Nous avons vu que les blocs de PDMS contenant les chambres de mesure et le réseau de canaux microfluidiques pouvaient être assemblés de manière réversible sur le réseau de microélectrodes. Ceci nous permet de tester et d'utiliser une grande variété de réseaux microfluidiques différents pour des activations séquentielles selon les chambres, ou d'effectuer des séries de traitements différents de produits anti-oxydants ou pro-oxydants avant l'activation chimique. Nous parlerons de ces possibilités en fin de ce chapitre.

Évoquons enfin des variations de configuration de mesure supplémentaire pour l'analyse électrochimique des cellules dans notre dispositif intégré. Le dispositif de positionnement cellulaire permet le piégeage d'une ou plusieurs cellules au fond d'une chambre de mesure. La question qu'il convient de se poser est celle du positionnement des cellules vis-à-vis de la microélectrode. Dans un premier temps, le positionnement des cellules dans l'espace à deux dimensions du réseau de microcanaux peut être prévu par les simulations et l'adaptation des données expérimentales, en choisissant avec attention les géométries du réseau de microcanaux. Cependant, il est également possible de contrôler l'emplacement des cellules dans la troisième dimension, au-dessus de l'électrode (figure 7.10). Dans ce cas, deux configurations sont possibles. Les macrophages sont des cellules adhérentes lorsqu'elles sont laissées au repos. Ainsi, lorsqu'elles sont positionnées à la verticale des microélectrodes, elles peuvent soit se déposer sur la surface de l'électrode même, permettant des mesures sur le pôle basal, soit adhérer sur le PDMS au-dessus de l'électrode, permettant alors des mesures sur le pôle apical des cellules. La distance séparant la cellule et l'électrode sera dans ce cas imposée par la hauteur de la chambre de mesure. Ce contrôle n'est pas encore réalisé, mais il peut être possible grâce à des fonctionnalisations des surfaces de PDMS favorisant ou défavorisant l'adhésion cellulaire (figure 7.10 B). Ces considérations proviennent d'une configuration envisagée au tout début du projet où l'assemblage des chambres de mesure devait se faire avec des cellules déjà positionnées, afin d'approcher au dernier moment les microélectrodes à la surface des cellules (figure 7.10 C). Cette configuration assurerait alors le repos et l'adhésion des cellules sur le PDMS, dans un premier

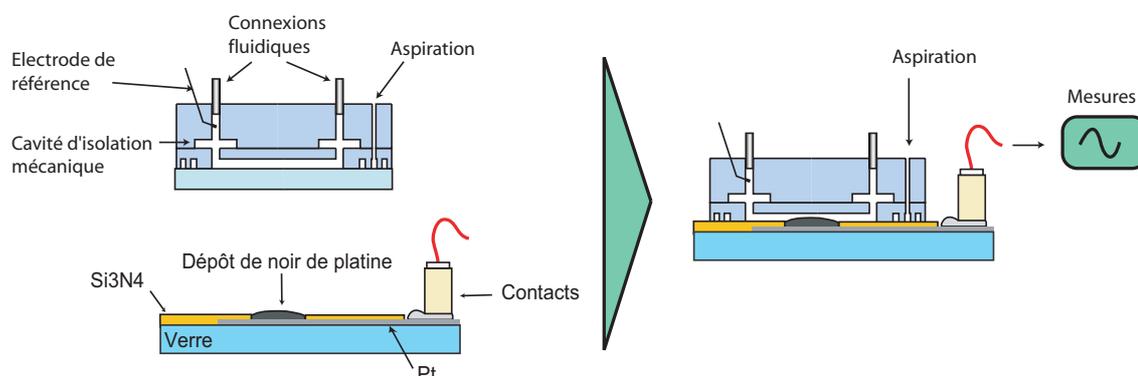


FIG. 7.11 – Assemblage du dispositif final : les différents connexions et contacts sont établis séparément avant l'assemblage.

temps, dans un milieu non confiné permettant une reconfiguration de la structure interne des cellules de manière plus habituelle, avant de confiner ces dernières dans un volume nettement plus faible en recouvrant le dispositif en PDMS par le substrat contenant les microélectrodes.

### 7.3.2 Mesures électrochimiques sur cellules piégées

Nous allons décrire dans le paragraphe suivant l'assemblage effectif du dispositif intégré ainsi que les précautions prises lors des différentes manipulations autour du dispositif final.

#### Montage expérimental

Le dispositif intégré est constitué d'un substrat contenant les microélectrodes et un bloc de PDMS contenant le réseau de canaux fluidiques fabriqué avec les techniques habituelles de lithographie molle. L'assemblage se fait de manière réversible avec notre technique de micro-aspiration, afin de pouvoir réutiliser chacune des parties.

##### *Assemblage et précautions*

Ce dispositif rassemble sur une surface correspondant à celle d'une demi lame de microscope de nombreux éléments : des connecteurs en plastique pour les contacts des microélectrodes, un dispositif microfluidique avec ses connecteurs fluidiques, et une électrode de référence macroscopique qu'il convient d'insérer dans le bloc d'élastomère (figure 7.11). La présence de tous ces éléments sur une surface réduite impose divers contraintes sur le bloc en PDMS pouvant conduire au désassemblage du dispositif intégré. Pour s'assurer que la micro-aspiration maintienne convenablement le dispositif en place, chaque tube et câble doit être immobilisé et les contraintes apportées par l'insertion des tubes ou de l'électrode de référence doivent être minimisées. Pour cela, il a été nécessaire de construire un dispositif multicouches contenant des cavités isolant le réseau de microcanaux des contraintes dues à la déformation du bloc d'élastomère (voir paragraphe 2.3.2, page 51).

L'efficacité de l'assemblage réversible par micro-aspiration est vérifiée en plaçant le bloc de PDMS serti de toutes les connexions fluidiques sur un substrat plat. Dans le cas où le dispositif est bien plaqué sur la surface plane, nous procédons à l'alignement des chambres de mesure sur

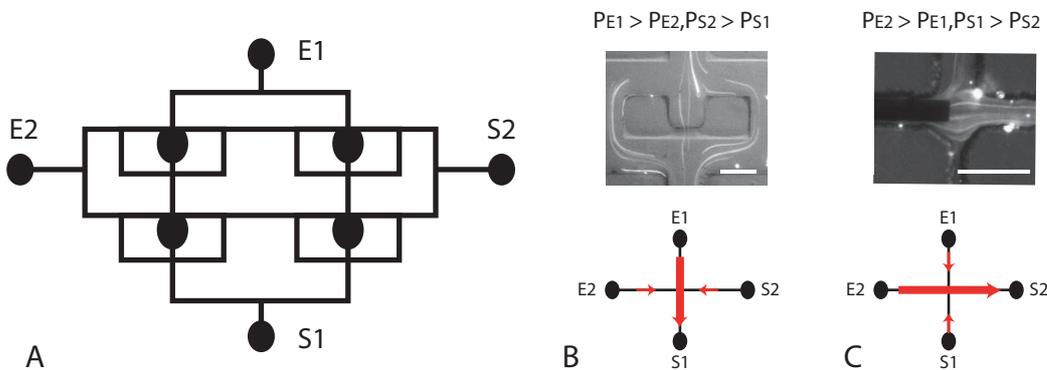


FIG. 7.12 – Gestion des flux. A. Schéma récapitulatif. B. Flux selon l'axe  $E_1S_1$  pour le positionnement cellulaire. C. Flux selon l'axe  $E_2S_2$  pour l'activation des cellules. Les barres d'échelle mesurent  $40\ \mu\text{m}$ .

les microélectrodes grâce à un contrôle visuel par microscopie inversée. L'accès à l'espace directement au-dessus des microélectrodes est important pour faciliter le placement et l'alignement manuel du bloc de PDMS. Une fois tous les éléments insérés et fixés, nous pouvons appliquer le vide dans la cavité de micro-aspiration pour éliminer l'air résiduel dans le réseau de microcanaux et le maintien en place du dispositif. Dans la condition où l'ensemble est parfaitement immobile, il est alors possible d'arrêter le vide dans le réseau d'aspiration et de garder une adhésion suffisante du bloc de PDMS sur son substrat pour que le dispositif maintienne l'assemblage. Ceci permet notamment d'éliminer le bruit provenant du système d'aspiration pendant les mesures électrochimiques.

### *Gestion fluïdique*

La gestion des fluides se fait au travers d'un système de réservoirs pour éviter tout contact autour du dispositif. Nous avons vu dans le chapitre 3 que l'utilisation du réseau de microcanaux pour le positionnement et l'activation cellulaire se fait en deux étapes : le piégeage des cellules et l'activation des cellules (voir figure 7.12). Dans un premier temps, le flux contenant des cellules traverse le réseau de microcanaux de telle sorte que les lignes de courant puissent traverser les chambres de mesure, donc selon l'axe  $E_1S_1$ . Une fois les cellules convenablement positionnées dans chaque chambre de mesure, le flux pourra se faire de manière perpendiculaire selon l'axe  $E_2S_2$  afin de conserver un milieu fluïdique stable dans les chambres de mesure. De cette manière, les espèces chimiques dans les chambres seront en équilibre avec celles traversant le réseau fluïdique. Dès lors que la composition du fluide injecté est modifiée, le contenu des chambres pourra être à son tour modifié par la diffusion des espèces chimiques (voir paragraphe 3.2.3, page 64).

La méthode dont la mise en œuvre est la plus simple consiste en l'établissement de quatre réservoirs correspondant aux quatre accès fluïdiques,  $E_1$ ,  $S_1$ ,  $E_2$  et  $S_2$ , du dispositif. Le contrôle des flux se fait alors par la gestion des différences de pression appliquées entre chaque réservoir. En effet, lorsque tous les réservoirs sont placés à la même pression hydrostatique, le système est à l'équilibre et le flux est nul dans le réseau de microcanaux. En appliquant une différence de pression entre deux groupes de réservoirs, les fluides vont alors traverser le réseau de microcanaux

pour retrouver un équilibre des pressions. Les schémas 7.12 B et C illustrent les différentes configurations d'utilisation du système de réservoirs. Ce système présente néanmoins quelques inconvénients. Il ne peut fonctionner que si la pression hydrostatique de chaque réservoir est la même. Cependant, cet équilibre est fragile et difficile à contrôler. Dès lors que le niveau de liquide d'un des réservoirs bouge, cet équilibre est perdu et il devient alors difficile d'éliminer les flux parasites. Restaurer le flux initial requiert l'utilisation d'un indicateur de mouvement de liquide ainsi qu'un système de détection, ce qui peut se faire avec un contrôle constant sous microscope. Pour éviter cela, il devient alors nécessaire d'utiliser des réservoirs hermétiques de surface suffisante pour éviter une variation niveau des liquides pendant l'expérience et par là éviter la brisure d'équilibre hydrostatique. Un tel système est volumineux et n'est pas modulable. L'ajout de vannes pour une gestion plus sophistiquée des flux pourra être envisagé.

### Mesures électrochimiques

Après l'assemblage effectif du dispositif intégré, nous avons effectué la mesure d'une première trace ampérométrique de cellules piégées et activées dans une chambre microfluidique. Nous avons choisi ici de réaliser nos premières mesures sur plusieurs cellules pour s'assurer d'une quantité suffisante d'espèces électroactives libérées pour la détection électrochimique.

#### *Blindage pour les mesures*

L'assemblage décrit précédemment permet d'utiliser toutes les fonctionnalités du dispositif intégré : positionnement et activation cellulaires, et mesure électrochimique. Cependant, malgré le faible bruit détecté lors des mesures électrochimiques, un blindage de l'ensemble du dispositif reste nécessaire. En effet, le moindre mouvement aux alentours du montage expérimental se répercute dans le signal par un bruit additionnel, lié particulièrement aux vibrations de l'air.

Ainsi, nous avons utilisé une boîte en aluminium usinée de telle sorte que les contacts et le dispositif puissent y être enfermés (figure 7.13 B). Un trou a été percé sur le capot de la boîte afin d'y faire passer les tubes reliant les réservoirs aux connections fluidiques. Un tel trou diminue l'effet de blindage de la boîte, mais le bruit causé par le manipulateur reste néanmoins notablement diminué.

#### *Un premier signal*

Enfin, une première mesure de traces ampérométriques a été effectuée sur trois macrophages RAW 264.7 isolées dans une chambre contenant une microélectrode et ensuite activées par l'ionophore calcique à une concentration finale de  $5 \mu\text{M}$  (figure 7.13). Pour la mise en œuvre de cette mesure, bon nombre des précautions citées précédemment n'avaient pas été prises. Ainsi, pendant la mesure, le couvercle de la boîte pour le blindage n'était pas placé, permettant un accès plus facile des différents réservoirs fluidiques. Le flux à travers les microcanaux était imposé par le placement de gouttes de volume et donc de hauteur différente en entrée  $E_1$  et en sortie  $S_1$ , et l'électrode de référence était tout simplement plongée dans une de ces gouttes.

Cette mesure nous a permis de déceler les points importants d'amélioration, notamment sur la stabilité du signal pendant la mesure, la réduction du bruit ambiant ainsi que sur les aspects pratiques de manipulation du dispositif intégré. La figure 7.13 représente le signal mesuré avec, dans un premier temps la baisse exponentielle du courant représentant la polarisation de la microélectrode dans la solution, et à partir de 400 secondes, une augmentation du courant

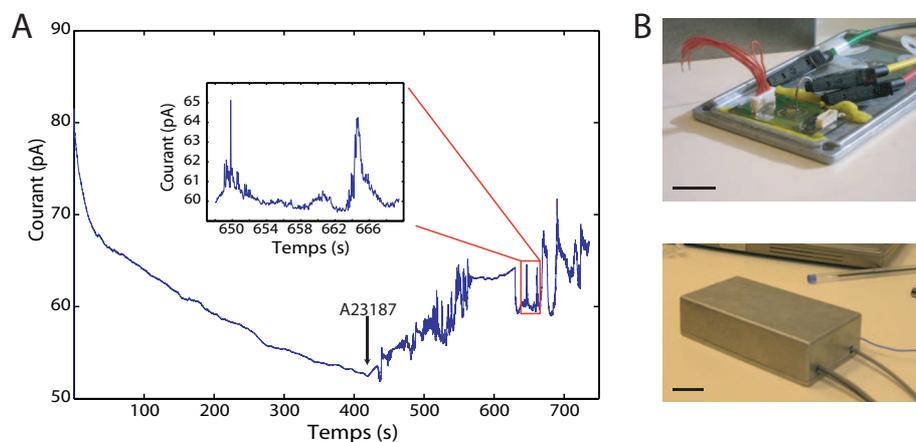


FIG. 7.13 – Trace ampérométrique (A) dans une chambre de mesure contenant trois macrophages de souris RAW 264.7 et une microélectrode platine de  $10\ \mu\text{m}$  de diamètre. L'ionophore calcique (A23187) a été injecté à  $t=415\text{s}$ . La baisse du courant en première partie du signal correspond à la polarisation de l'électrode, alors que l'augmentation du courant suite à l'injection de l'ionophore calcique correspond à l'oxydation d'une espèce active libérée par les cellules. L'agrandissement d'une zone montre le niveau de bruit dans la condition de mesures illustrée par les photographies (B). Les barres d'échelle mesurent 2 cm.

suivant l'injection du ionophore calcique A23187. La mesure qui suit l'injection de l'activateur ne peut être exploitée, du fait de l'instabilité du signal et du bruit, mais elle a permis néanmoins une première validation du montage expérimental.

Grâce aux améliorations du montage expérimental définies dans le paragraphe 7.3.2 précédent, nous allons pouvoir effectuer des mesures ampérométriques dans de meilleures conditions et analyser les signaux mesurés.

## 7.4 Conclusion

Nous avons réalisé dans ce travail les étapes de développement techniques pour l'obtention d'un microsystème de mesures électrochimiques du stress oxydant. Nous avons d'abord établi un protocole d'activation chimique et de mesure du stress oxydant compatible avec les milieux confinés. Nous avons ensuite construit un réseau de microélectrodes de la dimension d'une cellule unique. Nous avons enfin intégré ce réseau de microélectrodes dans le dispositif de positionnement et d'activation cellulaire étudié dans les parties précédentes pour réaliser une première mesure sur cellules dans un micro-environnement contrôlé.

Les différentes étapes de développement de mesures électrochimiques du stress oxydant dans un dispositif microfluidique intégrés exposés dans ce chapitre nous ont permis d'aboutir à un microsystème de mesure relativement complet. Il permettra de réaliser dans un premier temps des analyses standard de stress oxydant sur le pôle basal de cellules uniques.

Cependant, l'intérêt de réaliser de telles mesures dans un tel microsystème ne se limite pas à la simple miniaturisation et automatisation des mesures réalisées aujourd'hui. L'exploitation des avantages spécifiques aux microsystèmes pour la mesure électrochimique de réactivité cellulaire

à l'échelle de la cellule unique sera abordée dans le chapitre suivant.



## Chapitre 8

# Vers une analyse électrochimique en parallèle

Les développements techniques et expérimentaux détaillés dans le chapitre précédent ont abouti à l'intégration d'un système d'analyse électrochimique sur cellules vivantes dans des chambres microfluidiques dont le micro-environnement est maîtrisé. Nous avons réussi à reproduire une configuration d'analyse sur cellule unique de synapse artificielle dans un microsystème où les différentes étapes expérimentales peuvent être complètement automatisées. Cependant, les avantages du microsystème que nous avons conçu ne se limitent pas à l'automatisation des tâches de manipulation, d'activation et de mesure des cellules vivantes. Nous avons conçu un microsystème qui présente une certaine flexibilité dans sa structure, avec une multitude de microélectrodes pour des mesures en parallèle et des unités fonctionnelles interchangeable, comme le réseau de microcanaux ou même la plaque contenant le réseau de microélectrodes.

Ce court chapitre détaillera l'exploitation envisageable des avantages des microsystèmes en général, et de notre microsystème en particulier. Ces diverses exploitations permettront des analyses originales de processus biologiques comme la communication intercellulaire, en contrôlant des paramètres pertinents, inaccessibles dans les systèmes d'analyse conventionnels. Nous traiterons dans un premier temps l'exploitation du réseau de microélectrodes, avant d'aborder le contrôle supplémentaire de différents paramètres grâce à des modifications mineures du système expérimental.

**8. Vers une analyse électrochimique en parallèle**

---

<b>8.1</b>	<b>Exploitation du réseau de microélectrodes</b>	<b>155</b>
8.1.1	Multiplication des mesures	155
8.1.2	Problématique du multipotentiostat	156
<b>8.2</b>	<b>Contrôle de paramètres supplémentaires</b>	<b>156</b>
8.2.1	Implémentations dans le dispositif intégré	156
8.2.2	Implémentations dans le montage expérimental	158
<b>8.3</b>	<b>Conclusion</b>	<b>158</b>

---

## 8.1 Exploitation du réseau de microélectrodes

Notre microsystème de mesure électrochimique sur cellules vivantes est constitué d'un réseau de microélectrodes sur lequel est assemblé un réseau de chambres de mesure correspondantes. La présence dans un même lieu de cellules de mesure dans des conditions comparables permet des mesures électrochimiques dans des configurations variables.

### 8.1.1 Multiplication des mesures

La problématique générale des mesures localisées, sur des cellules vivantes, concerne l'accès aux statistiques. En effet, la variabilité entre chaque individu d'une population de cellules est naturellement grande et l'accès à une information fiable, à l'établissement de mécanismes valables, passe par une multiplication des mesures. Notre système a été conçu pour cela, puisqu'il contient un réseau de microélectrodes pouvant être adressés ensemble ou individuellement.

#### Multiplication par addition des mesures

Une première utilisation de notre réseau de microélectrodes est d'effectuer une moyenne sur l'ensemble des mesures réalisées dans le microsystème. Ceci se fait en connectant toutes les microélectrodes. Une précaution à prendre néanmoins pour cette configuration de mesure est d'utiliser une contre-électrode pour éviter les réactions parasites pouvant se faire sur l'électrode de référence et engendrer de cette manière une modification du potentiel de référence. De cette manière, nous additionnons les mesures effectuées sur un ensemble de 36 cellules en configuration cellules uniques directement comparables du fait que les mesures ont été effectuées dans des conditions identiques de température, d'activation, de manipulation de cellules. Ainsi, nous nous affranchissons de variabilités néfastes à l'analyse des mesures, tout en gardant la précision des mesures assurée par la configuration en cellules uniques (augmentation du rapport signal-sur-bruit, diminution de la perte par diffusion des molécules à analyser, disparition d'interférences dues aux signaux provenant de cellules éloignées). Cette addition induit automatiquement une perte d'information sur les phénomènes rapides et de faible intensité qui pourraient être effacés par la somme des signaux. Cependant, une telle addition est d'autant plus pertinente à effectuer que le phénomène de stress oxydant que nous mesurons est un phénomène lent, durant plusieurs minutes ou dizaines de minutes. En effet, dans ce cas, les phénomènes rapides observés dans les mesures sur cellules uniques sont en fait dus aux variabilités individuelles et ne sont pas pris en compte dans les analyses numériques [26]. L'intérêt d'une telle mesure est qu'elle ne nécessite aucun matériel supplémentaire à celui utilisé déjà au laboratoire.

#### Mesures individuelles en parallèle

Pour réaliser des mesures individuelles en parallèle, il est nécessaire d'utiliser un multipotentiostat. C'est un appareil qui permet de contrôler séparément le potentiel de plusieurs électrodes tout en mesurant le courant qui les traverse. Ainsi, nous aurons accès à une statistique sur les mesures sur cellules uniques sans perte d'information. Cette configuration est cruciale pour l'analyse de phénomènes rapides comme l'exocytose où l'échelle temporelle du phénomène à analyser est beaucoup plus petite que celle du stress oxydant. En effet, la mesure par une microélectrode intègre les signaux sur toute la surface des cellules, effectuant déjà à l'échelle de la cellule unique une moyenne sur l'ensemble des événements. La fréquence des événements d'exocytose est en

moyenne de 3 Hz pour des mesures effectuées sur une électrode plane couvrant le pôle basal de la cellule (voir le paragraphe 6.3.2, page 122). Les signaux correspondant aux événements apparaissent donc toutes les 330 millisecondes en moyenne, et l'analyse des phénomènes individuels est possible seulement parce que la durée d'un signal est inférieure à cet intervalle. Intégrer les signaux issus d'une électrode dans l'ensemble des signaux issus du réseau entier aura pour conséquence la superposition des pics d'exocytose et la perte de toute information sur l'événement individuel du phénomène.

L'intérêt de réaliser des mesures individuelles en parallèle réside dans la possibilité de comparer les mesures entre elles sans crainte de variabilités dues aux paramètres externes comme le lot cellulaire ou les caractéristiques de l'air ambiant. Ainsi, les mesures simultanées à différents potentiels permettront d'obtenir des informations sur la nature exacte des espèces électroactives libérées par les cellules. Plus particulièrement, il devient alors possible de réaliser des mesures simultanées et d'observer des phénomènes d'interaction entre les cellules, par exemple dans le cas où les chambres de mesure sont toutes reliées et seules certaines cellules sont stimulées.

### 8.1.2 Problématique du multipotentiostat

Nous utilisons pour le moment un simple potentiostat spécialisé pour les mesures de très faibles courants, mais il ne permet pas la mesure simultanée sur plusieurs électrodes. L'ajout d'un multiplexeur à l'appareil de mesure permettrait d'effectuer des mesures séquentielles rapides sur toutes les microélectrodes du dispositif, mais ne permet pas de maintenir le potentiel sur les électrodes qui ne sont pas mesurées. La nécessité de maintenir le contrôle constant du potentiel sur les électrodes indépendamment des commutations générées par le multiplexeur nécessite une électronique complexe.

L'utilisation d'un multipotentiostat permet de réaliser des mesures simultanées sur plusieurs électrodes, à des potentiels variés, mais aucun appareil commercialisé n'allie les capacités de mesure simultanée et de mesure spécialisée des très faibles courants. La construction d'un tel appareil constituerait un projet d'un an pour un électronicien travaillant à temps plein.

## 8.2 Contrôle de paramètres supplémentaires

L'utilisation de la lithographie molle pour réaliser les dispositifs intégrés d'analyse électrochimique permet une grande variation dans les paramètres contrôlés simultanément. Pour illustrer cet avantage, nous citerons des exemples d'implémentations relativement faciles à mettre en œuvre aussi bien dans le dispositif en lui-même que dans le montage expérimental.

### 8.2.1 Implémentations dans le dispositif intégré

L'intérêt d'assembler réversiblement des blocs d'élastomères contenant des canaux et des chambres microfluidiques réside dans la fabrication aisée de ces dispositifs intégrés, dans leur modification rapide et surtout dans la possibilité de les interchanger sans avoir à fabriquer de nouveaux réseaux de microélectrodes.

A partir d'une même série de masques, nous pouvons fabriquer des moules de géométries et de hauteurs différentes. Dans le cas précis de nos chambres de positionnement cellulaire, nous pouvons faire par exemple varier la hauteur des microcanaux dans un même moule, résultant en une accélération ou une décélération du flux selon le canal parcouru. Plus précisément, nous

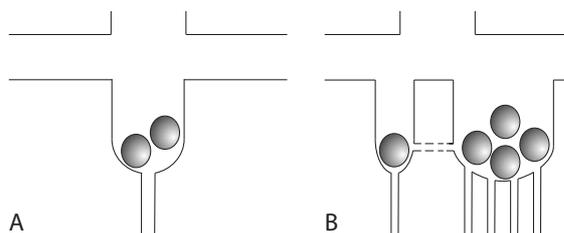


FIG. 8.1 – Exemple de changement de géométries des chambres de mesure pour contrôler des paramètres supplémentaires. A. Configuration initiale avec un chambre de mesure de  $25\ \mu\text{m}$  de large pouvant contenir deux cellules. B. En rajoutant une chambre supplémentaire pouvant piéger un groupe de cellules avec ou non un canal reliant les deux chambres, il est possible d’analyser l’influence de la communication cellulaire sur le stress oxydant d’une cellule unique.

avons envisagé d’augmenter la résistivité fluïdique des canaux de déstagement des pièges à cellules en diminuant leur hauteur tout en conservant la hauteur initiale des canaux principaux pour éviter d’augmenter inutilement la résistivité globale du dispositif. Il est également possible de modifier les masques et de créer dans une configuration similaire des chambres de mesure plus sophistiquées. Nous pouvons placer dans un même dispositif des chambres de mesure de différentes tailles, variant ainsi le nombre de cellules interrogées pour chaque mesure électrochimique et rajouter des canaux de communication de tailles variables, par exemple entre une chambre à cellule unique et une chambre contenant une dizaine de cellule pour étudier l’influence de la communication intercellulaire sur le stress oxydant (figure 8.1). Une légère modification des dessins de masques peut également rendre plus sophistiqués les écoulements fluïdiques. Les chambres en réseau sont actuellement irriguées par une même entrée d’activateur. Or, en alimentant chaque rangée de chambre par des réservoirs différents, nous pouvons déjà faire varier au sein du même dispositif la nature de l’activation chimique réalisée. Des dispositifs prenant en compte ces modifications du réseau fluïdique sont déjà réalisées, permettant à très court terme de réaliser des analyses uniques et particulièrement pertinentes.

A partir d’un même moule, nous pouvons rajouter des éléments microfluidiques améliorant le contrôle du dispositif. La lithographie molle multicouche nous permet de placer des vannes microfluidiques en travers des microcanaux (voir paragraphe 1.1.3, page 30) pour arrêter les flux et choisir les canaux d’injection. Ces éléments de contrôle actif sont particulièrement intéressants car ils diminuent fortement les volumes morts, en comparaison avec le dispositif actuel utilisant des réservoirs macroscopiques, et permettent la miniaturisation de l’ensemble, ce qui facilite un blocage hermétique du bruit ambiant puisque nous n’avons plus besoin d’accéder au dispositif pendant la mesure.

Enfin, à partir d’un même dispositif, qui peut être nettoyé et stérilisé plusieurs fois, nous pouvons également faire varier les configurations d’utilisation en effectuant des fonctionnalisations de surface pour favoriser ou défavoriser l’adhésion des cellules sur les parois du bloc d’élastomère ou en modifiant l’ordre d’assemblage du dispositif pour éventuellement travailler avec des électrodes externes dans la configuration de synapse artificielle, appliquée dans ce cas à une population de cellules adhérees à des emplacements prédéfinis, ou avec un réseau de microélectrodes placé au-dessus les cellules préalablement positionnées juste avant la mesure électrochimique.

### 8.2.2 Implémentations dans le montage expérimental

Le montage expérimental peut également bénéficier d'améliorations pour un meilleur contrôle de paramètres physiques comme la température, le taux d'humidité ou le taux de dioxyde de carbone. Ceci est facilement envisageable car le système d'analyse est de petite taille et est confiné dans une boîte hermétique. L'introduction de deux tuyaux permettant de contrôler l'air à l'intérieur de la boîte hermétique par son recyclage constant peut être facilement réalisée par des étapes d'ingénierie simples sur le matériel déjà existant. De tels systèmes existent déjà pour contrôler la température et l'humidité de l'air autour de microscopes optiques.

Des modifications du blindage en remplaçant, par exemple, une partie du support et du capot par un substrat transparent recouvert d'une fine couche conductrice, ou d'un grillage constitué d'entrelaçage de fils conducteurs permettent l'accès visuel au dispositif. Un tel accès visuel permettrait par exemple une activation du stress oxydant par les UV tout en maintenant les mesures ampérométriques.

Nous avons également vu qu'il est possible de diversifier les stimuli chimiques en multipliant les réservoirs et en introduisant des vannes supplémentaires pour contrôler les flux, tout en maintenant la partie détection inchangée. Ceci peut s'effectuer aussi bien directement dans le dispositif en modifiant le *design* du réseau fluidique, qu'en dehors de celui-ci avec un système de vannes miniaturisées que l'on peut ajouter dans le boîtier hermétique.

## 8.3 Conclusion

A travers ce chapitre de perspectives à court et moyen terme, nous avons montré les nombreuses possibilités d'analyses innovantes qu'offre notre microsystème d'analyse électrochimique. Il existe néanmoins des obstacles technologiques à franchir comme celui d'un multipotentiostat spécialisé dans la mesure simultanée de petits courants. Une collaboration avec une équipe d'électroniciens de fabricants de matériel de mesure électrochimique, par exemple, pourrait nous permettre de dépasser cette limite.

Dès lors que la gestion d'un réseau de microélectrodes est possible pour des mesures individuelles en parallèle, plusieurs axes de développement s'ouvrent à nous. Parmi elles, l'analyse concertée d'une population de cellules, dont la communication intercellulaire est contrôlée par des microcanaux, et l'analyse d'événements locaux sur une même cellule à l'aide d'ultramicroélectrodes planes (dont l'ouverture devient inférieure à  $5 \mu\text{m}$ ) sont des thématiques envisagées au laboratoire.

# Conclusion Générale



# Conclusion générale

Cette thèse a permis le développement expérimental, à partir d'outils de la microfluidique, de microsystèmes d'analyse de la réactivité cellulaire à travers deux thématiques distinctes : l'induction de cellules souches mésenchymateuses (CSM) dans la voie de différenciation neuronale et l'analyse électrochimique de la réactivité cellulaire à l'échelle de la cellule unique. Ces deux thématiques *a priori* distinctes, que j'ai menées de front, sont intrinsèquement liées. L'objectif final de ce travail était de répondre, grâce à la mesure en parallèle sur cellules uniques, à la problématique de la communication inter-cellulaire lors d'un stress appliqué à un individu ou à une population. Une telle étude ne peut se faire sans la compréhension du comportement des cellules vivantes dans les microsystèmes. La résolution des problématiques liées à la culture cellulaire soulevées par l'étude de l'induction chimique des CSM a permis une meilleure compréhension des spécificités de la manipulation de cellules vivantes dans les microsystèmes. Je regrouperai les résultats et les perspectives de ce travail selon ces deux thématiques.

La thématique de l'induction des CSM dans la voie de différenciation neuronale s'intègre dans le travail d'acquisition de compétences autour de la biologie cellulaire dans les microsystèmes, mené depuis 2004 au laboratoire. Nous avons ainsi construit, avec les outils de la lithographie molle et la technique d'assemblage réversible par micro-aspiration, des outils liés à la culture cellulaire dans les microsystèmes. L'orientation des cellules par la microstructuration des substrats, la fonctionnalisation des surfaces des microcanaux pour les rendre plus compatibles avec certaines applications biologiques, le confinement surfacique des cellules grâce à des décorations protéiques sur les substrats de culture par les techniques de *multipatterning* et enfin le contrôle de la densité cellulaire par un *design* particulier des chambres de culture cellulaire nous ont permis d'acquérir une expérience sur l'interaction cellule-substrat indispensable à la manipulation des cellules dans les microsystèmes. L'étude de la culture de deux types cellulaires dans nos dispositifs microfluidiques a montré l'importance de paramètres clés pour la réalisation de cultures cellulaires en microsystèmes, tels le flux du milieu de culture et les contraintes de cisaillement qui en résultent, ainsi que la densité d'ensemencement des cellules.

Nous avons également montré, à travers l'étude préliminaire d'une induction simple de la différenciation des CSM en adipocytes, la possibilité de réaliser des stimulations chimiques sur une population de CSM en culture dans nos dispositifs microfluidiques. Cette étude s'est poursuivie par le développement d'un microsystème de contrôle dynamique sur de longues durées de stimuli chimiques pour réaliser l'induction des CSM dans la voie de différenciation neuronale. La réalisation d'un protocole d'essai est encore en cours. Cela nous a permis de soulever une problématique importante dans la différence de la réactivité cellulaire, lors de la stimulation chimique sous flux dans un milieu confiné et lors de la stimulation chimique dans un volume macroscopique. L'étude de l'influence de configurations de stimulation variées nous permettra de

mieux comprendre les processus biologiques mis en place pendant l'induction des cellules dans une voie de différenciation cellulaire. Il sera important de développer un système fiable pour les analyses systématiques des réactivités cellulaires par immunofluorescence.

Les perspectives de l'ensemble de cette thématique, liées à une meilleure compréhension des stimuli chimiques administrés aux cellules en culture, sont l'induction de plus en plus avancée des CSM dans la voie de différenciation neuronale. La réalisation de l'induction complète des CSM dans la voie de différenciation neuronale est un défi pour la thérapie clinique liée au remplacement de tissus nerveux difficiles à se procurer. L'intégration de paramètres nouveaux dans le protocole d'induction, comme la présence de protéines surfaciques, et le criblage des différents paramètres sont à envisager pour faire avancer l'induction dans la voie de différenciation neuronale. Par ailleurs, le développement d'un système robuste assurant la culture, la stimulation variée ainsi que l'analyse systématique des cellules sera nécessaire pour permettre une certaine autonomie des expérimentateurs vis-à-vis des étapes techniques aujourd'hui réalisées dans différents laboratoires. Enfin, dans l'éventualité de la réalisation de l'induction des CSM en pseudo-neurones, il serait intéressant de coupler nos microsystemes de stimulation à un système de mesure électrochimique permettant de tester les capacités des cellules différenciées à transmettre des messages nerveux et des potentiels d'action.

Dans le cadre de l'analyse électrochimique de la réactivité cellulaire à l'échelle de la cellule unique, nous avons d'abord montré la pertinence de l'analyse électrochimique de la réactivité cellulaire dans les microsystemes à travers la réalisation de la détection de l'exocytose sur une cellule chromaffine unique dans un micropuits. Cette réalisation a été l'amorce d'un projet de couplage entre deux techniques de mesures de l'exocytose jusqu'alors indépendantes, l'ampérométrie et la microscopie à onde évanescente. L'adaptation du matériel technique est en cours pour réaliser la mesure simultanée par les deux techniques sur les mêmes événements d'exocytose afin d'effectuer pour la première fois la corrélation entre des phénomènes précédant l'exocytose d'une part et la cinétique de l'exocytose ainsi que la nature du signal chimique sécrété d'autre part. Cette corrélation permettra de faire le lien entre les événements décrits par les mesures optiques et ceux décrits par les mesures ampérométriques.

Nous avons également entrepris la réalisation d'un microsysteme intégré de détection électrochimique du stress oxydant sur cellules uniques en passant par trois phases de développement : i) la conception du dispositif microfluidique permettant d'isoler des cellules uniques dans une chambre de mesure et de contrôler dynamiquement le micro-environnement entourant la cellule, ii) la maîtrise de la manipulation de macrophages (modèle cellulaire pour nos mesures) et la compréhension de leur comportement dans nos dispositifs microfluidiques, iii) l'intégration de microélectrodes dans les chambres microfluidiques de mesure. Nous avons ainsi abouti à un microsysteme consistant en un réseau de chambres de mesures, contenant des microélectrodes fonctionnelles, et permettant d'isoler des macrophages uniques et de les maintenir en survie pendant une durée allant jusqu'à 30 minutes, durée suffisante pour réaliser nos mesures électrochimiques. Le contrôle dynamique des flux dans ce dispositif a permis dans un premier temps l'activation chimique lente de ces cellules (avec un temps de montée en concentration des molécules actives de 5 minutes). La détection électrochimique effective du stress oxydant sur une cellule unique dans ce micro-environnement reste à être réalisée afin de finaliser le microsysteme dans son intégralité. Nous pourrions alors réaliser des mesures électrochimiques sur les macrophages avec et sans addition des signaux sur l'ensemble du réseau de chambres de mesure pour accéder à des données statistiques de mesures localisées. De plus, en faisant varier les conditions de

mesure, comme le nombre de cellules sondées dans le même micro-environnement, la nature du stimulus ou la présence ou non de communication cellulaire avec une population voisine, nous posons les bases d'une analyse originale jamais réalisée jusqu'à présent.

Les perspectives de l'ensemble de cette thématique résident dans la réalisation d'analyses électrochimiques sous des conditions novatrices :

- des mesures en parallèle à différents potentiels permettra d'accéder, en un seul lot de mesures, à la cinétique de l'événement de libération chimique ainsi qu'à la nature des espèces libérées ;
- des mesures en parallèle dans un réseau de chambres communicantes et où la stimulation sera effectuée de manière locale permettra l'étude de la propagation de la réactivité cellulaire dans une population face à un stress ;
- la miniaturisation des microélectrodes en réseau permettra l'étude de phénomènes plus localisés comme l'exocytose.

La détection en parallèle par microélectrodes de flux chimiques libérées par un ensemble de cellules isolées dans un micro-environnement contrôlé constitue une analyse originale et riche en applications. En recherche fondamentale, l'étude de la communication intercellulaire face à un stimulus ainsi que l'étude de la variabilité dans la réactivité cellulaire permettraient une meilleure compréhension de mécanismes de contrôle et de régulation biologiques du stress oxydant. Dans le domaine militaire, notre système miniaturisé offre un cadre d'étude idéal des réactivités cellulaires face à des stimulations par diverses matières toxiques et pathogènes. Enfin, pour l'industrie, l'étude du stress oxydant dans des configurations variées de stimuli, de préparation chimique des cellules avec différentes drogues et de paramètres physiques contrôlés permettront le criblage de produits pharmaceutiques de grands intérêts.



Quatrième partie

**Annexes**



## Annexe A

# Lithographie molle : techniques et protocoles

La lithographie molle, plus connue sous le nom de « soft lithography », regroupe des techniques de fabrication ou de reproduction de structures en utilisant des élastomères. Dans notre cas particulier, nous utilisons des techniques de prototypage rapide relativement peu coûteuses pour obtenir des microcanaux, lieu de contrôle et de confinement de liquides de très petit volume, de l'ordre du picolitre.

Cette annexe rassemble les protocoles standards de photolithographie utilisés pour la fabrication de microcanaux de complexités diverses et les protocoles permettant de réaliser des dispositifs contenant des vannes pneumatiques et des pompes péristaltiques.

## A.1 Fabrication de microcanaux

Le principe de fabrication est particulièrement simple. Un mélange de polymère visqueux et de réticulant est versé sur un moule microfabriqué pour être laissé à dégazer puis cuire. Une fois la réaction de réticulation effectuée, l'élastomère résultant est désolidarisé du moule par simple décollement mécanique. Nous obtenons ainsi un bloc d'élastomère dans lequel est creusé les reliefs du moule initial. En plaçant une surface plane sur la face creusée de l'élastomère, un espace vide correspondant aux reliefs du moule est alors créé. Les microcanaux que nous utilisons sont ainsi formés par les reliefs imprimés dans l'élastomère recouverts d'une lame de verre. Des connexions fluidiques sont percées dans l'élastomère afin d'accéder au volume des microcanaux.

### A.1.1 Fabrication du moule par photolithographie

Il existe de nombreuses méthodes de microfabrication et la complexité et le coût de ces méthodes augmentent avec la résolution du moule à fabriquer.

L'utilisation d'approches « bottom-up » (ascendante, par apposition de parties édifiantes des structures) ou « top-down » (descendante, par destruction des parties indésirables) sont des choix à effectuer selon la précision souhaitée des motifs et selon la machinerie disponible. De manière générale, il est plus facile d'apposer de grands motifs et de graver de fins motifs [191].

L'essentiel est d'obtenir *in fine* une surface plane contenant des reliefs prédéfinis.

### Principes généraux de la photolithographie

La photolithographie, ou lithographie optique, est basée sur l'insolation sélective de fines couches de résines organiques par de la lumière puis sur leur révélation dans des solvants. Ainsi, selon la nature de la résine, la technique d'insolation et le dessin du masque utilisé pour protéger certaines parties de la lumière, différents reliefs en résine seront formés sur le substrat.

*Matériel utilisé* : résine photosensible, tournette (permettant la rotation à vitesse contrôlée d'un substrat autour d'un axe fixe), plaques chauffantes, masque contenant des parties opaques et transparentes pour la protection sélective de la résine, lampe UV (30 mW/cm<sup>2</sup>), révélateur, eau ou solvant pour le rinçage, air comprimé pour le séchage.

### Protocoles de photolithographie avec la SU8

Les résines photosensibles de type SU8 sont des résines de type « négatif », nommées ainsi par la nature du masque utilisé pour les insoler. Pour un motif de la forme d'un disque, par exemple, un masque positif correspondra à un disque noir sur un fond transparent, alors qu'un masque négatif correspondra à un disque transparent sur fond noir. Ainsi, en utilisant une résine positive avec un masque positif ou une résine négative avec un masque négatif, nous obtiendrons sur le substrat un cylindre de résine du même diamètre que le disque dessiné sur le masque.

Les particularités principales des résines SU8 résident dans leur capacité à produire des motifs à grand rapport d'aspect, plus hauts que larges, et leur résistance aux solvants.

#### *Protocole standard*

1. Étalement de la résine à la vitesse qui correspond à la hauteur finale voulue (les solutions commerciales de SU8, MicroCHEM, diffèrent dans leur proportion de solvant, donnant ainsi des résines de viscosité différente et donc des gammes de hauteur différentes). Il est

quelques fois judicieux d'effectuer un pré-traitement du substrat afin d'améliorer l'adhésion de la résine.

2. Pre-bake, étape de chauffe de la résine pour éliminer le solvant résiduel et homogénéiser de dépôt. Elle se fait à 95 °C avec un palier à 65 °C.
3. Insolation aux UV, l'énergie par surface à apporter dépend de l'épaisseur étalée.
4. Post-bake, étape de chauffe après l'insolation afin de terminer les réactions amorcées par les UV. Cette étape est cruciale et de nombreux défauts peuvent être dues à une chauffe ou un refroidissement trop rapide.
5. Développement, l'ensemble est plongé dans un révélateur qui permet de solubiliser la résine qui n'a pas réticulé. Les résidus de résine mal développée apparaîtront sous forme de traces blanches lors du rinçage du moule à l'isopropanol.

*Exemple 1 : Protocole pour un moule contenant des motifs de 50  $\mu\text{m}$  de hauteur*

La SU8 est une résine qui permet d'obtenir des motifs avec un rapport base/hauteur de l'ordre de 1, sans précaution ni optimisation particulières, contrairement aux résines plus usuelles qui offrent au mieux un rapport base/hauteur de l'ordre de 10. La résolution des motifs ne devra pas être inférieure à 40  $\mu\text{m}$  pour obtenir un moule propre.

Le substrat utilisé est une plaquette de silicium prétraitée au plasma pendant 1 minute afin de rendre la surface hydrophile.

1. Étalement de la résine SU8 3050 à 3000 tours par minute pendant 30 secondes (avec une rampe d'accélération de 500 tours par minutes par seconde).
2. Pre-bake à 65 °C pendant 5 minutes, puis à 95 °C pendant 15 minutes.
3. Insolation aux UV pendant 7 secondes et demi.
4. Post-bake à 65 °C pendant 2 minutes, puis à 95 °C pendant 5 minutes.
5. Développement dans le « SU8 developer » pendant 4 minutes puis rinçage à l'isopropanol.

Dans le cas plus délicat de résine très fluide et de motifs très fins (de l'ordre de 5  $\mu\text{m}$  par exemple), il sera nécessaire de prendre quelques précautions afin d'obtenir un résultat convenable. D'abord, il sera nécessaire de prétraiter le substrat avec un produit appelé « Omnicoat » qui s'étale à 2000 tours par minutes pendant 30 secondes et qui demande une chauffe à 180 °C pendant 2 minutes. Ensuite, les phases de montée et de descente en température lors des Pre- et Post-bake devront se faire lentement. Cela implique un chauffage et un refroidissement naturel de la plaque chauffante en même temps que le substrat. Enfin, le développement demande une attention particulière car un léger sur-développement entraînera la dissolution des motifs révélés.

*Exemple 2 : Protocole pour un moule contenant des motifs de 40, 20 et 3  $\mu\text{m}$  de hauteurs*

Les travaux de Juncker *et al.* nous ont permis de développer un protocole pour étaler et insoler successivement plusieurs couches de SU8 afin d'obtenir des motifs à plusieurs niveaux [231]. Ce protocole a été développé pour les dispositifs de piège de cellules décrits dans le chapitre 3.

*Première couche de 3  $\mu\text{m}$*

La plaquette de silicium est prétraitée à l'« Omnicoat » comme décrit précédemment et de la résine SU8 2005 y est étalée à 3000 tours par minute. Après 2 minutes à 65 °C puis 5

minutes à 95 °C, la résine est insolée pendant 3,5 secondes. Enfin, après 1 minute à 65 °C puis 3 minutes à 95 °C, l'ensemble est révélé au « SU8 developer » pendant 20 secondes.

#### *Deuxième couche de 20 $\mu\text{m}$*

De la résine SU8 3010 est étalée à 2000 tours par minute sur la première couche. L'excédent de résine sur le pourtour de la plaquette est enlevé avec un chiffon spécial salle blanche imbibé d'acétone. Après 2 minutes à 65 °C puis 10 minutes à 95 °C, la résine est insolée pendant 5 secondes, avec une étape délicate d'alignement de masque sur la première couche de résine, si nécessaire. Enfin, après 1 minute à 65 °C puis 3 minutes à 95 °C, l'ensemble est laissé à refroidir. Il n'y a pas d'étape de développement ici.

#### *Troisième couche de 40 $\mu\text{m}$*

De la résine SU8 3010 est étalée à 2000 tours par minute sur la deuxième couche. L'excédent de résine sur le pourtour de la plaquette est enlevé avec un chiffon spécial salle blanche imbibé d'acétone. Après 2 minutes à 65 °C puis 10 minutes à 95 °C, la résine est insolée pendant 14 secondes à travers un dernier masque aligné sur la deuxième couche, afin d'obtenir une couche finale de 40  $\mu\text{m}$ . Après 2 minutes à 65 °C puis 5 minutes à 95 °C, l'ensemble est laissé à refroidir. Enfin, la résine est mise au développement dans le « SU8 developer » pendant 4 minutes puis rincée à l'isopropanol.

### A.1.2 Moulage dans un élastomère et montage

Une fois un moule obtenu par microfabrication, il est nécessaire de faire un traitement anti-adhésif afin de s'assurer du décollement après le moulage. Le moule est donc mis en contact avec une vapeur de TMCS (triméthylchloro-silane) pendant au moins une minute.

#### Préparation du PDMS et moulage

L'élastomère utilisé est en fait un mélange de chaînes polymériques (poly-diméthylsiloxane) avec son réticulant à une proportion en volume de 10 : 1. Le produit est commercialisé sous forme de gomme siliconée visqueuse (RTV 625 A et B, General Electrics). Une fois préparé, le mélange est versé sur le moule et laissé à dégazer afin d'éliminer les bulles d'air résiduelles. Il est parfois judicieux de placer l'ensemble quelques instants dans une cloche à vide afin de décoller les petites bulles coincées entre les motifs les plus fins du moule. Enfin, l'ensemble est mis dans un four à 80 °C au moins pendant 1 heure et 30 minutes.

La variation du temps de cuisson va de pair avec la stabilité du bloc de PDMS. Moins le bloc est cuit, plus forte sera la réorganisation interne et surfacique de l'assemblage des chaînes de polymère [36]. De plus, la variation de la proportion entre chaînes de polymère et réticulant change les propriétés mécaniques du bloc de PDMS [88].

#### Montage final

Une fois le bloc de PDMS démoulé, il reste une étape d'adaptation au dispositif expérimental. En effet, il est nécessaire de créer des accès aux chambres et aux canaux microfluidiques. La plupart du temps, il suffit de percer aux extrémités des canaux un trou avec une aiguille propre, de section droite et de diamètre correspondant aux tuyaux de connexions.

Enfin, après un nettoyage des surfaces si nécessaire, l'assemblage final se fait grâce à la mise au contact conforme le bloc de PDMS et le substrat. Selon les utilisations, il est habituel d'effectuer un prétraitement des surfaces afin que celles-ci soient irréversiblement collées, évitant ainsi les risques de fuites. Ce prétraitement se fait en créant un plasma (gaz ionisé) sur le bloc de PDMS et le substrat, activant chaque surface. Après le contact conforme, des liaisons covalentes peuvent alors se former à l'interface et de cette manière maintenir indéfiniment le contact entre le PDMS et le substrat [34].

## A.2 Lithographie molle « multi-couche »

La lithographie molle multicouche, ou plus communément *Multilayer Soft Lithography* -MSL-, a été un verrou technologique pour les puces microfluidiques. En effet, elle permet d'y apporter des éléments de contrôle actif en introduisant des vannes et des pompes, contrôlées grâce à une interface avec un ordinateur de bureau [38]. L'utilisation de tels éléments de contrôle actif permet de réaliser aisément des tâches séquentielles en microfluidique [62].

### A.2.1 Les principes du MSL

Le MSL consiste à superposer deux réseaux de canaux microfluidiques séparés d'une fine membrane de PDMS flexible. Au croisement de canaux de couches différentes, la membrane est supportée de part et d'autre par les fluides contenus dans chaque canal. Lorsqu'une surpression est appliquée dans un canal, la membrane se déforme jusqu'à boucher complètement le canal de plus faible pression. C'est ainsi que nous obtenons une vanne.

En actionnant séquentiellement des vannes qui se suivent le long d'un canal, trois vannes, plus exactement, il est possible de créer un mouvement de liquide dans le canal contrôlé. C'est ainsi que nous obtenons une pompe péristaltique.

### A.2.2 Utilisation pratique du MSL

Le protocole de fabrication de dispositifs microfluidiques multicouche a été adapté de celui de Unger *et al.* [38]. La principale difficulté réside dans la fabrication de la fine membrane séparant la couche de contrôle, c'est à dire la vanne, de la couche contrôlée. Elle doit être assez fine pour se déformer jusqu'à fermer le canal contrôlé, mais en même temps assez épaisse afin de pouvoir retrouver rapidement sa position de repos lorsque la surpression est relâchée. Ainsi, il a été défini un rapport idéal de 1/10, où 1 correspond à l'épaisseur de la membrane et 10 la largeur du canal à contrôler. Ajoutons que l'intersection entre la vanne et le canal, c'est à dire la surface de la membrane, doit être suffisamment grande pour permettre une convenable déformation de cette dernière. Si la vanne est plus fine que le canal qu'elle traverse, alors la surface de la membrane sera insuffisante pour lui permettre d'atteindre la paroi opposée dans le canal traversé. C'est ainsi que l'on arrive à faire croiser des vannes et des canaux sans pour autant créer une situation de vanne pneumatique.

### Fabrication d'un moule pour la couche contrôlée

Le dispositif se fabrique à partir de deux moules correspondant aux canaux et à la couche de contrôle et s'alignant parfaitement. Le profil des canaux contrôlé doit être elliptique afin que les

fines membranes puissent les boucher complètement [38]. Pour cela, il faudra utiliser des résines photosensibles déformables après le développement. C'est l'étape appelée « fluage » et se fait habituellement à haute température (120 °C).

Une résine photosensible déformable utilisée au laboratoire pour fabriquer les moules pour les canaux de profil elliptique est la SPR 220-7 (Shipley). Le protocole de fabrication est le suivant :

1. Étalement de la résine SPR 220-7 à 1800 tours par minute pendant 30 secondes (avec une rampe d'accélération de 500 tours par minutes par seconde).
2. Pre-bake à 115 °C pendant 5 minutes.
3. Insolation aux UV pendant 8 secondes.
4. Développement dans un mélange en volume de 1 : 4 de AZ400K : eau pendant environ 2 minutes puis rinçage à l'eau.
5. Fluage à 120 °C pendant 4 minutes.

### Protocole de fabrication d'un dispositif multicouche

La fabrication d'un dispositif multicouche consiste en la superposition de couches d'élastomères moulés. Le nombre couches utilisées et la configuration de l'assemblage peuvent varier, mais la configuration habituelle consiste à placer la couche de contrôle au-dessus des canaux [62].

- Couche de contrôle : préparation habituelle du PDMS mais cuisson partielle de 45 minutes.
- Canaux : du PDMS à proportion  $A : B$  différente est préparée et étalée en fine couche sur le moule, pour obtenir environ 10  $\mu\text{m}$  d'élastomère. Habituellement, nous utilisons du PDMS 1 : 20 étalée avec une tournette à 4500 tours par minute pendant une minute. La cuisson est également partielle est dure 45 minutes.
- Assemblage : Une fois le bloc de PDMS de la couche de contrôle est préparé, c'est-à-dire démoulé, troué et nettoyé, il le faut aligner sur le moule des canaux contenant la fine couche de PDMS de proportion différente partiellement cuite. Il s'en suit une cuisson plus longue d'au moins 1 heure et 30 minutes avant de démouler, trouer, nettoyer et enfin assembler ce dernier bloc de PDMS mixte sur son substrat.

L'assemblage puis la cuisson de plusieurs couches partiellement cuites de PDMS de proportion de polymère : réticulant différentes permet au réticulant de diffuser à travers l'interface des différentes couches et de former ainsi des liaisons covalentes. Il est primordial pour l'utilisation d'éléments de contrôle actif que les différentes couches soient parfaitement solidaires. Il est possible de remplacer l'adhésion des différentes couches par diffusion par une adhésion plus habituelle créée par l'activation au plasma. Ces choix dépendent très fortement du profil des canaux et de leur utilisation et sont à déterminer empiriquement.

## Annexe B

# Exploitation du concept de la micro-aspiration

Nous avons vu que la microfluidique permettait la gestion des petits volumes de fluide dans des milieux confinés et contrôlés. Les réactions bien contrôlées et avantageuses rendues possibles par la microfluidique présentent néanmoins un inconvénient majeur qui est la difficulté d'accès à l'intérieur des microchambres et des microcanaux. Nous avons présenté, dans le chapitre 2, la technique d'assemblage réversible de dispositifs microfluidiques par micro-aspiration. La possibilité de pouvoir assembler et désassembler les dispositifs microfluidiques sans matériel supplémentaire est un avantage indéniable, notamment pour l'accès à l'intérieur du dispositif. Cependant, la micro-aspiration présente par ailleurs des propriétés de gestion de volume intéressantes que nous avons seulement évoqué dans le corps de ce manuscrit. Nous citerons dans cette annexe quelques applications tirant parti des avantages spécifiques que procure la micro-aspiration afin de mettre en exergue la valeur ajoutée de cet outil. Enfin, en dernière partie de cette annexe, nous avons rassemblé les résultats des simulations effectuées pour mieux comprendre le comportement d'un dispositif microfluidique assemblé par micro-aspiration.

Notons que ces travaux ont été réalisés en étroite collaboration, tout au long de cette thèse, avec Maël Le Berre.

## B.1 Chimie de surface à haute résolution

L'assemblage réversible des dispositifs microfluidiques par micro-aspiration permet d'utiliser les dispositifs microfluidiques comme une étape provisoire dans une série d'expériences. Prenons pour exemple la modification des surfaces par des canaux microfluidiques, pour obtenir des motifs complexes de résolution spatiale de l'ordre de la centaine de microns. Jusqu'à présent, la réalisation de modifications chimiques complexes ne pouvait s'effectuer qu'*in situ*, et l'utilisation des surfaces ainsi modifiées étaient effectuées soit directement à l'intérieur des microcanaux, soit à l'extérieur, après un processus fastidieux de dissection du dispositif [89]. Ce qu'apporte la micro-aspiration ici est la possibilité de réaliser des traitements de surface avec des canaux microfluidiques assemblés de manière étanche, et d'utiliser les surfaces modifiées en désassemblant avec facilité le dispositif microfluidique.

### *Multi-Colour Microcontact Printing*

Une application directe de l'exemple cité en introduction est d'utiliser un dispositif microfluidique assemblé par micro-aspiration pour déposer différentes molécules biologiques de manière sélective sur la surface d'un substrat qui servira ensuite de tampon de résolution micrométrique. Les résultats d'une telle technique ont été présentés dans le chapitre 2 page 53.

Le *microcontact printing* est une technique très répandue d'impression de motifs de résolution micrométrique par contact conforme entre le substrat et le tampon en élastomère. L'encre utilisée pour cette technique peut contenir différents types de molécules (silanes, protéines, particules). Le principe de cette technique est très simple : le tampon en PDMS structuré par des motifs est immergé dans un liquide contenant des molécules destinées à être déposées ; une fois les molécules d'« encre » adsorbées sur le tampon, celui-ci est séché puis mis en contact avec le substrat, afin que les molécules puissent y être transférées ; le substrat est enfin rincé pour ne garder sur sa surface une couche monoassemblée de molécules d'« encre ».

Dans le cas du *multi-colour microcontact printing*, l'encrage se fait par microfluidique : des canaux sont alignés sur les structures correspondant aux motifs et différentes solutions d'« encre » peuvent irriguer les motifs. Ainsi, nous pouvons utiliser simultanément plusieurs types de molécules selon les emplacements pour l'encrage et même créer des motifs complexes de gradient de molécules (voir figure 2.9 page 53).

### *Protocole expérimental*

La réalisation de tels motifs nécessite deux moules correspondant au dispositif microfluidique pour l'encrage (canaux de 10  $\mu\text{m}$  de hauteur) et au tampon (motifs de 1  $\mu\text{m}$  de hauteur), ainsi que le substrat sur lequel seront transférés les motifs *in fine*. Pour des motifs dont la répartition des molécules A et B se fait selon un gradient, nous utilisons un canal microfluidique large de 500  $\mu\text{m}$  de cinq entrées et une sortie. Chaque entrée correspond à un réservoir d'une proportion différente de molécules (100%/0% ; 75%/25% ; 50%/50% ; 25%/75% ; 0%/100%). Après une certaine distance de flux parallèle de ces différents liquides, les molécules diffusent et forment un gradient continu de proportion dans le volume. Une fois le mélange en molécule s'est déposé sur les parois du dispositif microfluidique, ce dernier est rincé et désassemblé. Le tampon utilisé comme « plancher » pour le dispositif microfluidique d'encrage contient alors en sa surface des molécules adsorbées, réparties selon les proportions en volume contrôlées par le dispositif

d'encrage. La réalisation du *multi-colour microcontact printing* avec une répartition de deux molécules différentes en gradient de proportion se fait de la manière suivante :

1. Préparation du tampon, du dispositif d'encrage et du substrat final par rinçage dans l'éthanol pur filtré puis dans l'éthanol à 75% filtré avant d'être séché par de l'air filtré. L'absence de particules et de poussière est ici primordiale pour le bon fonctionnement de la technique.
2. Le bloc de PDMS d'encrage est aligné sur le tampon de telle sorte que les motifs soient placés à l'emplacement du gradient de molécules, les réservoirs et les tuyaux sont remplis d'eau déionisée et les tuyaux sont placés dans les connexions fluidiques prévues. La cavité de micro-aspiration est connectée à une pompe à vide et une fois l'assemblage étanche du dispositif microfluidique s'encrage est réalisé, le vide est appliqué dans la cavité, maintenant l'étanchéité du dispositif pendant la durée de son utilisation.
3. Une première étape d'attente de 5 minutes permet l'évacuation de l'air contenu à l'intérieur des canaux. Une fois l'air évacué, le tuyau de sortie des liquides est connecté à un pousse-seringue qui permet d'évacuer les liquides à un débit constant de  $5 \mu\text{L}/\text{min}$ . Le dispositif est maintenu dans cette configuration pendant 5 minutes pour assurer la stabilisation des flux. Les réservoirs doivent contenir le même volume de liquide pour assurer un débit équivalent dans chaque canal.
4. Lorsque le flux est considéré stabilisé, c'est-à-dire lorsque l'évacuation des liquides dans chaque réservoir s'effectue à la même vitesse, une quantité équivalente de mélange de molécules à différentes proportions est placée dans chaque réservoir (A : BSA-FITC à  $20\mu\text{g}/\text{mL}$  B : BSA-Cy3 à  $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cette étape est répétée dans le cas où les réservoirs se vident. Le temps total d'encrage correspondant à l'adsorption des molécules sur les parois du canal microfluidique dure 15 minutes.
5. Les réservoirs sont ensuite remplis par un tampon phosphate, PBS, pour un premier rinçage. Une fois les réservoirs complètement vidés, le dispositif d'encrage est désassemblé et le tampon est à nouveau rincé puis séché.
6. Le tampon est ensuite mis en contact conforme avec le substrat pendant 10 secondes pour effectuer le transfert des molécules. Le substrat est enfin rincé abondamment à l'eau déionisée et ensuite séché pour son utilisation ultérieure.

## B.2 Gestion de volumes

Un deuxième aspect à fort potentialité de la micro-aspiration est la gestion des volumes de gaz, ou plus exactement l'élimination des gaz dans le dispositif microfluidique. Cet effet provient de la perméabilité aux gaz à travers les mailles du PDMS. Considérons un volume de gaz entouré de PDMS (pour permettre son évacuation) et de liquides (pour combler le volume évacué), comme une bulle d'air dans un canal par exemple. En appliquant le vide dans une cavité limitrophe de la bulle, l'air va être littéralement aspiré par les parois du PDMS (figure B.1). Autour de cet aspect, nous avons développé quelques applications pratiques :

### B.2.1 Dégazage rapide d'un dispositif microfluidique

Le dégazage d'un dispositif microfluidique peut se faire très simplement dans une cloche à vide, en remplaçant tout l'air contenu dans les microcanaux par un tampon fluide. Cependant,

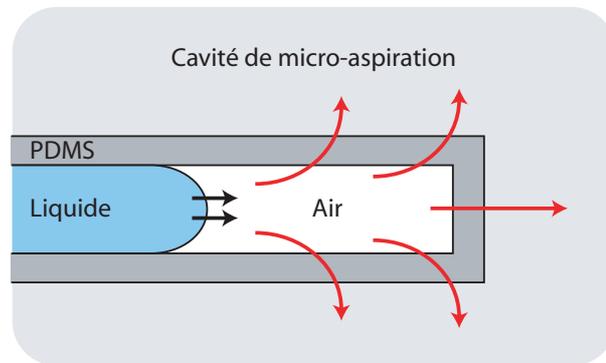


FIG. B.1 – Schéma illustrant le dégazage dans un microcanal assemblé par micro-aspiration : le vide relatif dans la cavité de micro-aspiration impose un flux d'air à travers les parois des microcanaux et des microchambres. Dans le cas où le volume d'air est délimité par un liquide, le volume d'air traversant le PDMS sera remplacé par le volume équivalent de liquide.

il n'est pas toujours pratique de déplacer le dispositif durant l'expérience, ou même de briser la chaîne de stérilité de l'expérience. En intégrant des cavités de micro-aspiration tout autour ou au-dessus des canaux, et en se procurant d'une petite pompe à vide (un vide relatif de 150 mBar suffit), cette étape peut alors s'effectuer sans déplacement du dispositif.

### Élimination de bulles d'air

Une des raisons principales du dégazage est la présence inévitable et indésirable de bulles d'air dans les dispositifs. En effet, le PDMS est hydrophobe, et quand bien même sa surface serait traitée afin de devenir hydrophile, les réarrangements des chaînes [36] lui redonnent son caractère hydrophobe initial. Cette hydrophobicité, ajoutée aux défauts sur les parois inhérents à la microfabrication, favorise la formation et la rétention de bulles dans les microcanaux. La présence de ces bulles perturbe grandement le flux prévu à l'intérieur des canaux. Pour la plupart des expériences, il est nécessaire d'éliminer toute bulle d'air avant l'utilisation du dispositif.

Lorsqu'un dispositif microfluidique contient des cavités de micro-aspiration dans lesquelles est appliqué un vide relatif constant, les bulles d'air dans les canaux fluidiques sont inexistantes.

### Intégration de contrôles actifs

Par ailleurs, l'intégration des contrôles actifs dans les puces microfluidiques assemblées par micro-aspiration présente les mêmes difficultés que dans des puces microfluidiques habituelles. Cependant, cette configuration présente des avantages non négligeables. D'abord, au niveau de la fabrication, les dispositifs contenant des vannes et des pompes sont difficiles à fabriquer et le rendement est bien inférieur à 50%, surtout dans le cadre du développement d'un dispositif. En utilisant un dispositif assemblé par micro-aspiration, nous pouvons désormais fabriquer des dispositifs multicouches et surtout les réutiliser. En outre, au niveau de l'utilisation, les étapes de préparation sont grandement écourtées par les méthodes de remplissage des vannes par micro-aspiration. En effet, le remplissage en fluide des canaux bouchés se faisait par une application de surpression à l'entrée du canal, forçant alors l'air piégé à l'intérieur du canal de s'échapper au travers du PDMS. Cette méthode rend l'utilisation de dispositifs contenant de nombreuses

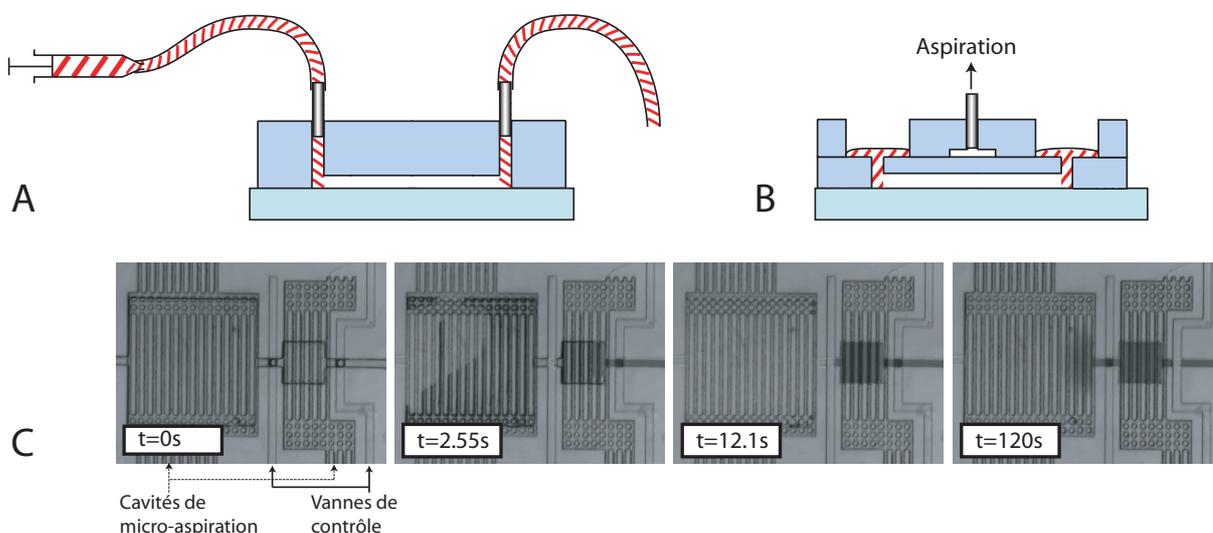


FIG. B.2 – A et B : Schéma illustrant l'emplacement des volumes morts (en hachuré) dans les dispositifs microfluidiques habituels (A) et dans les dispositifs utilisant la micro-aspiration pour déplacer les liquides (B). C : Montage de microphotographies suivant le remplissage d'une chambre de cristallisation de protéines par diffusion. Le réactif rare contient du colorant pour faciliter la visualisation. Les chambres sont initialement vides, séparées par une vanne de contrôle, puis sont remplies de réactifs différents lorsque les vannes de micro-aspiration sont activées. Au bout de 10 secondes, lorsque les chambres sont effectivement remplies, la vanne séparant les deux chambres est relâchée et permet la diffusion des réactifs.

vannes très laborieuse. Au contraire, en appliquant le vide dans les cavités de micro-aspiration dans un dispositif contenant des vannes, il se crée une dépression accélérant l'évacuation de l'air piégé. Il ne suffit plus que de boucher les entrées de chaque vanne avec un goutte du liquide de remplissage, d'appliquer le vide et d'attendre quelques minutes pour réaliser un remplissage facilité de vannes.

### B.2.2 Déplacement de fluides de volume fixe

Afin que l'air puisse être éliminé d'un canal, il est nécessaire que le volume occupé soit remplacé par un autre fluide. Nous utilisons cet effet pour déplacer un liquide de volume fixe dans les canaux. De cette manière, il est possible de s'affranchir des volumes morts inévitables en utilisant les supports expérimentaux habituels autour de la microfluidique. En effet, un des grands avantages de la microfluidique est de pouvoir manipuler des volumes extrêmement faibles. Cela est vrai seulement dans les microcanaux. Or, rappelons que toutes les techniques de déplacement de liquides (injection par seringue, déplacements dus à la différence de pression hydrostatique, déplacements par électroosmose...) requièrent un remplissage complet des canaux microfluidiques. La plupart du temps, ce remplissage se fait soit par seringues, soit par micropipette, et les volumes utilisés ne peuvent être en-dessous de quelques microlitres, mais ces volumes restent toujours largement supérieurs aux volumes effectifs des chambres microfluidiques. Ces volumes morts résultent des dispositifs d'injection et des canaux acheminant les fluides vers les chambres de réaction (figure B.2 A et B).

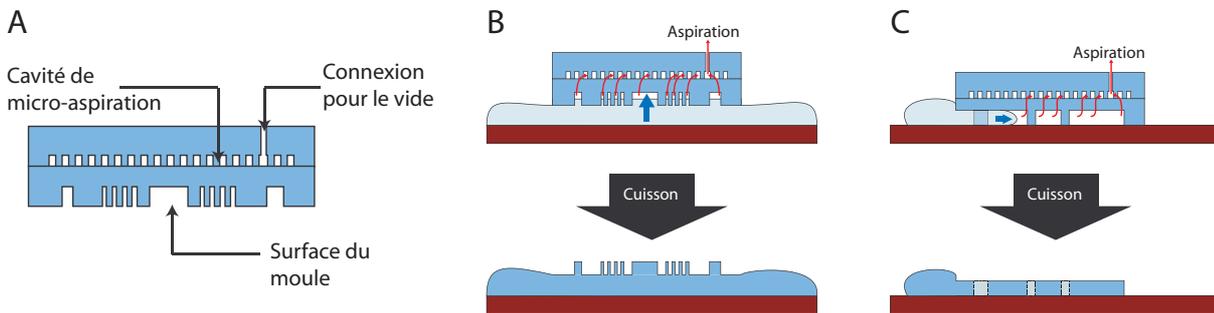


FIG. B.3 – Schéma, adapté de [232], illustrant les techniques de moulage assisté par la micro-aspiration, appliquée au moulage du PDMS. Un moule en PDMS contenant des cavités de micro-aspiration (A) peut être utilisé soit pour une structuration de surface (B) soit pour un moulage complet par remplissage (C).

Dans le cas de la micro-aspiration, il est certes toujours nécessaire d'acheminer d'une manière ou d'une autre les liquides vers les réservoirs des dispositifs, mais les volumes morts sont réduits au minimum puisque le déplacement des liquides ne nécessite plus le remplissage total des canaux. Ainsi, s'il était possible de placer le volume exact du réactif à utiliser à l'entrée d'un canal, alors il n'y aurait plus de volume mort. Prenons pour illustration le cas d'un remplissage d'une série de chambres de cristallisation de protéine. Ce cas de figure est tout à fait à propos puisque les réactifs nécessaires sont souvent extrêmement rares. Le dispositif est simple et le matériel limité au minimum. La seule difficulté réside dans la fabrication du dispositif qui nécessite l'intégration de vannes pour le contrôle de l'acheminement des gouttes et des cavités de micro-aspiration pour activer le déplacement des gouttes. Dans ce cas de figure, chaque goutte créée est acheminée vers la chambre de réaction correspondante et l'expérience peut-être répétée jusqu'à l'épuisement du réservoir initial (figure B.2 C).

### B.2.3 Techniques de moulage

Les techniques de moulage, surtout à l'échelle submicrométrique, sont souvent limitées par la force capillaire qui empêche de nombreux types de matériaux de remplir les plus petites cavités à mouler. La micro-aspiration peut palier dans une certaine mesure cette difficulté. Il nous a été possible de mouler plusieurs types de matériaux, mais le produit du moulage n'était pas parfait à cause d'une légère déformation du moule, due à la dépression appliquée sur les surfaces. Il était donc nécessaire de coupler la micro-aspiration à d'autres techniques « rectificatrices », ce qui réduit notablement son champ d'application. Nous utilisons néanmoins cette technique pour fabriquer des fines membranes de PDMS percées de trous. Ces techniques de moulage ont été développées au laboratoire de microfluidique plus particulièrement par Maël Le Berre, doctorant, qui leur a donné le nom générique de techniques de lithographie assistée par micro-aspiration, MAAL - *Micro-aspiration assisted lithography* [232]. La figure B.3 illustre ces techniques.

### Une alternative au nanoimprint

Le *nanoimprint* est une technique de lithographie non conventionnelle à faible coût permettant une réplique fidèle d'une large surface de motifs nanométriques. Un des points critiques

pour cette technique est l'évacuation de bulles d'air et la déformation du moule dû à la grande pression appliquée. L'utilisation de la micro-aspiration permet ici de réduire certaines de ces difficultés puisque cette technique ne nécessite pas l'application de pression ou de température pour mouler la résine photosensible. La réticulation de la résine peut se faire par exposition aux UV directement à travers le PDMS puisque ce dernier est transparent.

Nous avons réalisé la structuration d'une résine photosensible grâce à cette technique (figure B.3 B), avec un moule contenant des motifs de piliers de 150 nm de diamètre et de hauteur. Pour cela, nous avons étalé une première couche tampon de polyméthacrylate de méthyle - PMMA - de 300 nm d'épaisseur sur un substrat plan en silicium. Après une cuisson d'une minute à 180 °C, une couche de 200 nm de résine photosensible utilisée habituellement pour les techniques de *nanoimprint*, LR8765 (de BASF), a été étalée grâce à une tournette. Le moule en PDMS est ensuite déposé délicatement sur la surface de résine et un vide relatif de 870 mbar a été appliqué dans la cavité de micro-aspiration pendant une minute. Les structures du moule étant remplies de résine, l'ensemble a été exposé aux UV à 450 mJ/cm<sup>2</sup>. Une fois le moule retiré, l'ensemble résulte en une structuration propre et régulière de la résine.

Il reste néanmoins quelques défauts sur la régularité à grande échelle puisque le vide relatif dans la cavité de micro-aspiration déforme légèrement le moule. L'amélioration de cette technique pourra se réaliser à travers l'optimisation de la distance séparant la cavité de micro-aspiration et les structures du moule pour permettre une structuration régulière sur une grande surface tout en gardant une vitesse de moulage convenable.

### Moulage par remplissage capillaire

Le moulage par remplissage capillaire peut être amélioré avec la micro-aspiration puisque la dépression relative transmise dans les volumes capillaires permet de réduire grandement les forces capillaires empêchant le moulage de certaines matières.

Nous avons réalisé avec cette technique un film de PDMS de 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur contenant des trous de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre. Pour cela, il a été nécessaire de traiter au préalable le substrat au plasma afin de favoriser l'adhésion du PDMS sur ce dernier. Le moule est ainsi placé sur le substrat traité et un mélange de PDMS non réticulé, à proportion 10 : 1, est étalé aux entrées du moule. Le vide relatif est appliqué dans la cavité de micro-aspiration pendant deux minutes, puis l'ensemble est placé sur une plaque chauffante à 90 °C pendant deux minutes supplémentaires. Après le refroidissement de l'ensemble, le vide est relâché et le moule retiré.

Des moulages similaires ont été également effectués avec une solution de boîtes quantiques, ou *quantum dots*, diluées dans un solvant volatil, résultant en un dépôt homogène, et du gel d'agar (en chauffant au préalable le substrat et le moule avant de placer le matériel à mouler) pour réaliser des microcanaux.

## B.3 Simulations supplémentaires pour l'assemblage par micro-aspiration

Nous avons décrit dans le chapitre 2 le principe de fonctionnement de la micro-aspiration et, à travers un modèle physique et des simulations numériques, prévu dans une certaine mesure le comportement des dispositifs microfluidiques assemblés par micro-aspiration vis-à-vis de paramètres expérimentaux tels que l'épaisseur du dispositif, le facteur de remplissage et la hauteur du canal microfluidique (figure B.4 A, B et C).

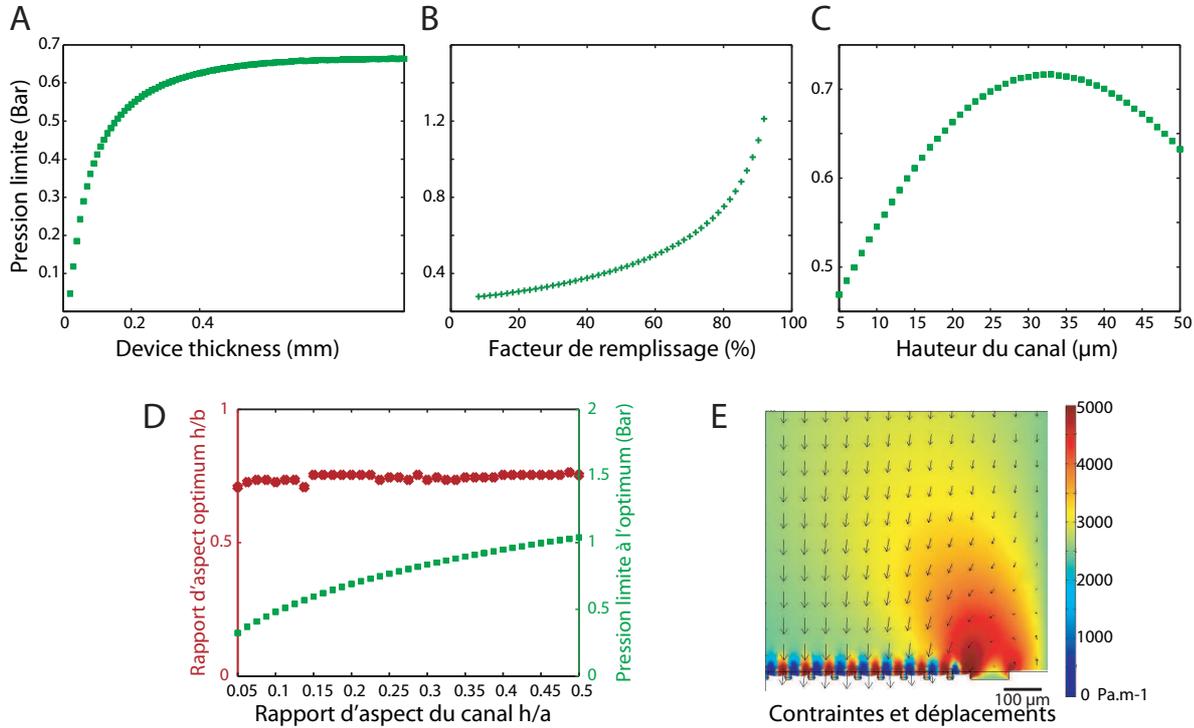


FIG. B.4 – Résultats des simulations numériques supplémentaires. A, B, C. Variation de la pression limite admissible dans un canal en fonction de l'épaisseur du dispositif (A), le facteur de remplissage pour la cavité d'aspiration (B) et la hauteur du canal microfluidique (C). D. Variation de l'optimum du rapport d'aspect de l'anneau de garde  $h/b$  (rouge) et de la pression limite pour cet optimum (vert) en fonction du rapport d'aspect du canal  $h/a$ . E. Répartition des contraintes dans les mailles du PDMS; les flèches indiquent le déplacement de ces mailles.

La figure B.4D illustre l'indépendance du rapport d'aspect optimal de l'anneau de garde ( $h/b=0,75$ ) par rapport à celui du canal microfluidique. Par contre, plus le rapport d'aspect du canal  $h/a$  est élevé, plus élevée sera la pression limite admissible.

La figure B.4E représente les valeurs des contraintes de cisaillement calculées à chaque maille du réseau modélisant le bloc de PDMS ainsi que le déplacement de ces derniers. La forme ovoïdale au-dessus de l'anneau de garde corrobore, dans une certaine mesure avec l'hypothèse du modèle physique considérant que seul un parallélépipède, de hauteur  $h_{cis}$ , au-dessus de l'anneau de garde subit les cisaillements du bloc de PDMS. La variation des paramètres  $a$  et  $b$  fait varier la hauteur sur laquelle les valeurs des contraintes sont élevées : cet effet est pris en compte dans le modèle physique en posant  $h_{cis} = \beta_a a + \beta_b b$ . L'ajustement des paramètres du modèle physique aux résultats expérimentaux donne une valeur du couple  $(\beta_a, \beta_b) = (1.0403, -0.083898)$ .

Ces simulations ont été réalisées par Maël Le Berre par la programmation sur le couplage des logiciels *MATLAB* et *COMSOL*, utilisant la boîte à outil *Plane Stress* en deux dimensions du module de mécanique structurale du logiciel *COMSOL*.

## Annexe C

# Protocoles pour la Biologie Cellulaire en microsystemes

Sont compilés dans cette annexe les différents protocoles utilisés pour les manipulations de biologie cellulaire présentées dans ce manuscrit.

## C.1 Solutions tampons

### *Tampon phosphate PBS (1X)*

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Le pH a été ajusté à 7,4 avec de l'HCl.

### *Tampon Krebs-Ringer bicarbonate (KRB)*

118 mM NaCl

4,7 mM KCl

2,5 mM CaCl<sub>2</sub>

1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,2 mM MgSO<sub>4</sub>

24,2 mM NaHCO<sub>3</sub>

Le pH a été ajusté à 7,4 avec de l'HCl.

## C.2 Culture cellulaire

### C.2.1 Macrophage RAW

La lignée de macrophage RAW 264.7 (American Type Culture Collection), obtenue grâce à l'équipe de M Jean Claude Drapier à l'ICSN (CNRS, Gif sur Yvette, France) se cultive à 37 °C dans une atmosphère stérile humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Milieu de culture des RAW 264.7*

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant 4,5 g.L<sup>-1</sup> de D-glucose et de sodium pyruvate (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

5% de sérum foetal de veau (Invitrogen)

20 µg.L<sup>-1</sup> gentamycin (Sigma)

#### *Passage*

La lignée est maintenue à une densité d'environ 2 à 5.10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> de milieu de culture en réalisant une dilution des cellules au dixième tous les trois jours. Les cellules sont détachées mécaniquement sous un flux de milieu imposé par une micropipette ou une seringue.

### C.2.2 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses murines et humaines procurées par l'équipe de M Luc Sensebé à l'EFS (Tours, France) se cultivent à 37 °C dans une atmosphère stérile humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

*Milieu de culture*

$\alpha$ -MEM (+)nucleosides pour les CSM murines et  $\alpha$ -MEM (-)nucleosides pour les CSM humaines

- 10% de sérum foetal de veau (Perbio)
- 1% Pénicilline et Streptomycine (Gibco)
- 1% L-glutamine (Gibco)
- 0,01 % Fugizone (Gibco)

Le milieu est changé deux fois par semaine jusqu'à la confluence des cellules. Pour une densité d'ensemencement de 1 000 cellules.cm<sup>-2</sup> en boîte de Petri, les CSM murines deviennent confluentes en 10 jours et les CSM humaines en 21 jours.

*Passage*

Une fois les cellules arrivées à confluence, elles sont détachées de leur substrat de culture par trypsination.

1. Laver deux fois au PBS 1X
2. Ajouter de la trypsine-EDTA sur le support de culture (ex : 3 mL pour une flasque de 75 cm<sup>2</sup>)
3. Laisser agir l'enzyme dans l'incubateur à 37°C pendant 2 à 5 minutes et vérifier au microscope le bon détachement des cellules
4. Diluer 2 à 5 fois la trypsine dans du milieu de culture et resuspendre les cellules
5. Centrifuger les cellules à 1 000 (jusqu'à 1 500) tours.min<sup>-1</sup> pendant 10 minutes
6. Resuspendre les cellules dans du milieu de culture frais
7. Réaliser un comptage des cellules vivantes par marquage au bleu Trypan
8. Ensemencer les cellules à la densité voulue

## C.3 Différenciation cellulaire

### C.3.1 Différenciation adipocytaire sur CSM humaines

*Ensemencement et induction*

1. Les CSM humaines sont ensemencées à une densité de 50 000 cellules.cm<sup>-2</sup> avec du milieu standard.
2. Après 24 heures, les cellules sont induites dans le milieu de différenciation.
3. Le milieu est renouvelé deux fois par semaines.
4. La différenciation se fait pendant 14 jours

*Milieu de différenciation*

- DMEM(low glucose) (Gibco)
- 20% SVF (Perbio)
- 0,5 mM IBMX (Sigma)
- 60  $\mu$ M Indomethacine (Sigma)

1  $\mu$ M Dexamethasone (Sigma)  
1% Pénicilline et Streptomycine (Gibco)

#### Coloration

1. Les cellules sont fixées avec de la para-formaldéhyde à 4%, PFA (Sigma), diluée dans le tampon phosphate pendant 10 minutes à 4 °C
2. Rincer 3 fois au PBS.
3. Ajouter la solution de rouge de Nil (Sigma) à 1  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> et incuber 30 minutes à 4 °C.
4. Rincer 3 fois au PBS.
5. Observation au microscope (excitation : 450-500 nm ; émission  $\geq$  528 nm)

### C.3.2 Induction de la différenciation neuronale sur CSM murines

L'induction testée en chambre microfluidique est la suivante, en partant d'approximativement d'une densité de 500 cellules.cm<sup>-2</sup> :

Jour 1	Ensemencement et culture
Jour 2	FGF2 (100 ng/mL)
Jour 5	FGF8 (50 ou 100 ng/mL) + SHH (10, 50, 100, 200 ou 500 ng/mL)
Jour 8	BDNF ou GDNF (10 ng/mL)
Jour 11	Fixation et marquage par immunofluorescence

## C.4 Protocoles de modification des surfaces

### C.4.1 Structures en vaguelettes

Le protocole suivant permet l'obtention de vaguelettes de 1  $\mu$ m de période et de 100 nm d'amplitude.

1. Mouler 2 mm de PDMS 1 : 16 dans une grand boîte de Petri.
2. Couper une bande de 2x5 cm<sup>2</sup> et plaquer la bande autour d'un tube de centrifugation de 50 mL (3 à 4 cm de diamètre), voir figure 4.1 page 78.
3. Effectuer un traitement au plasma pendant 15 minutes.
4. Retirer délicatement la bande de PDMS du tube.

### C.4.2 Fonctionnalisation des surfaces

La fonctionnalisation des surfaces des microcanaux s'effectue peu de temps après l'assemblage du dispositif suivant l'activation des surfaces au plasma. Ainsi, ce sont les groupements -OH de la surface de verre et de l'élastomère qui pourront réagir avec les différents réactifs.

1. Après une activation des surfaces au plasma et l'assemblage du dispositif, l'ensemble est laissé à cuire 30 minutes à 80 °C afin de s'assurer d'une bonne étanchéité du dispositif.
2. Une solution de 2% d'APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane, Sigma) dans de l'acétone est injectée dans le dispositif et laissée à incuber pendant 2 heures à température ambiante. Les canaux sont ensuite rincés avec de l'acétone.

3. Les protéines d'intérêt à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sont incubées dans un mélange de 10 mM de NHS (N-hydroxysuccinimide, Sigma) et de 20 mM de EDAC (N-ethyl- N0-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Sigma) pendant quelques minutes avant d'être injectées dans le dispositif et laissées incuber pendant une heure.
4. Le dispositif est ensuite rincé une fois au PBS puis à l'eau déionisée.
5. Les groupements fonctionnels restés libres sont par la suite bloqués par de la BSA (Sigma) à  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pendant 30 minutes.

### C.4.3 *Microcontact printing*

Ce protocole a été adapté d'un protocole procuré par l'équipe de M Matthieu Piel de l'Institut Curie (CNRS, Paris, France) grâce aux travaux de Yannick Giau.

#### *Encrage*

- Rincer les tampons de PDMS dans un bain d'éthanol pur dans un sonicateur.
- Laisser sécher les tampons sous la hotte à flux laminaire.
- Recouvrir le tampon avec 30 à  $100 \mu\text{L}$  d'une solution de protéine à  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sur les structures du tampon et retirer délicatement les bulles.
- Laisser incuber 30 à 45 minutes, jusqu'à une heure, dans une boîte hermétique et opaque.

#### *Préparation des lames*

- Nettoyer les lames de microscopes dans un bain soniqué d'éthanol pur.
- Sécher les lames sous la hotte à flux laminaire.
- Placer des marques éventuelles pour faciliter le repérage des transferts.

#### *Transfert des protéines*

- Aspirer rapidement la totalité de la solution d'encrage et ne pas laisser les protéines sécher (moins de 3 minutes).
- Placer délicatement le tampon sur la surface de verre prévue et presser délicatement le tampon pendant 20 secondes.
- Laisser le tampon en place pendant 5 à 15 minutes (il est possible de stabiliser les protéines en chauffant l'ensemble à  $140^\circ\text{C}$  pendant 30 secondes).
- Retirer délicatement le tampon et rincer la lame de verre à l'eau déionisée. Les tampons peuvent être nettoyé pendant une heure dans l'eau pure puis l'éthanol et réutilisés.

#### *Blocage de la surface de verre au PEG-g-PLL*

- Recouvrir la zone de transfert d'une goutte d'une solution de PEG-g-PLL (SurfaceSolutionS, Suisse) de  $0,1$  à  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, Sigma) à pH 7,4.
- Laisser incuber jusqu'à 90 minutes.
- Les lames sont ensuite rincées 2 fois au PBS avant d'être utilisées.

## C.5 Analyse d'image

Les programmes suivants sont les programmes utilisés pour l'analyse d'image avec le logiciel *MATLAB*.

*Obtenir l'orientation d'une cellule par rapport à l'horizontale*

```

A = imread('60x-0005a.jpg');
B = imread('60x-0005b.jpg');

BWs = edge(B, 'sobel', (graythresh(B) * .05));
figure, imshow(BWs), title('binary gradient mask');
se = strel('octagon',3);
BWsdil = imdilate(BWs, se);
imshow(BWsdil), title('dilated gradient mask');
BWdfill = imfill(BWsdil, 'holes');

C = uint8(BWdfill);

seD = strel('disk',40);
BW1 = imerode(BWdfill,seD);

figure, imshow(BWdfill);
BW2 = bwareaopen(BWdfill,2000); imshow(BW2)
BW2 = bwareaopen(BW1,10000); imshow(BW2)
seD = strel('diamond',10);
BWfinal = imerode(BW2,seD);
BWs2= edge(I, 'sobel', (graythresh(I) * .01));
I2=imsubtract(BWs2,BWdfill);
BW3 = imclearborder(BW2, 4);
figure, imshow(BW3), title('cleared border image');

D = B - C*256;
correl
Xmax = maxloc(Xcor,3);
Ymax = maxloc(Ycor,3);
clear(i);
z=(-0.5)*(angle(Ymax(2,3) +i*(Ymax(2,3) - Xmax(2,3)))*180/pi
    + angle(Ymax(2,2) +i*(Ymax(2,2) - Xmax(2,2)))*180/pi);

L = bwlabel(BW3);
stats = regionprops(L,'Orientation');
for t = 1 : length(stats)
    u = stats(t).Orientation;
end

```

```

%a = dir
%if a(t).name(length(a(t).name)) == 'g'

    Obtenir l'orientation des vaguelettes

function angleMaxDeg=getAngle(i)
tic

% i est l'image de depart
% l'ange resultat est en degre

i=double(i(1:floor(end/2)*2, 1:floor(end/2)*2));

i=(i(1:2:end, 1:2:end)+i(1:2:end, 2:2:end)
+i(2:2:end, 1:2:end)+i(2:2:end, 2:2:end))/4;
% on reduit par 2 en x et 2 en y la dimension de i

f=(abs(i-mean(mean(i)))); % image renormalisée
BW=imdilate(f, ones(10,10))>15; % on dilate sur un carré de 20 par 20,
% les pixels >15 sont =1 dans BW sinon 0
BW = imfill(BW, 'holes'); % on bouche les trous
imean=sum(sum(i.*(1-BW)))/sum(sum(1-BW));
% on fait la moyenne de i sur les pixels 0 de BW
i2=BW*imean+(1-BW).*i;
% on garde les valeurs de i quand BW=0 sinon, on met la moyenne
ffti2=fft2(i2);
i3=fftshift(abs(ifft2(ffti2.*conj(ffti2)))); % auto-correlation de i2
i3=i3-mean(mean(i3));

pas=180;
dist=50;
offs=0.5;
teta=[0:(pi)/pas:pi];
pas=pas+1;
x1=round(cos(teta)*dist+size(i,1)/2+offs);
y1=round(sin(teta)*dist+size(i,2)/2+offs);
x2=round(cos(teta+pi)*dist+size(i,1)/2+offs);
y2=round(sin(teta+pi)*dist+size(i,2)/2+offs);

pasLigne=50;
v=[0:pasLigne]/pasLigne; % vecteur de 0 à 1 avec pasLigne points
somme=zeros(1,pas);
for k=1:pas,

    xLigne=round(x1(k)*v+x2(k)*(1-v));
    yLigne=round(y1(k)*v+y2(k)*(1-v));

```

```
for k2=1:pasLigne+1,
    %disp([xLigne(k2), yLigne(k2)])
    %disp( i3(xLigne(k2), yLigne(k2)))
    %pause
    somme(k)=somme(k)+i3(xLigne(k2), yLigne(k2));
end
end
[val, index]=max(somme);
plot(somme)
angleMaxDeg=-90+teta(index)*180/pi;
toc
end
```

## Annexe D

# Fabrication des microélectrodes

Sont détaillés ci-après les différents protocoles de fabrication des microélectrodes sur substrat de verre.

## D.1 Préparation des substrats et photolithographie

### *Nettoyage des lames de verres*

Les lames de microscope en verre sont préalablement coupées et dépoussiérées avant d'être nettoyées au Piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  - 70/30 pendant au moins 30 minutes. Elles sont ensuite rincées trois fois à l'eau déionisée et laissées immergées jusqu'à leur utilisation. Au dernier moment, ces lames propres pourront être séchées à l'air comprimé filtré.

### *Protocole de photolithographie*

Tout substrat utilisé lors de ce protocole doit être préalablement traité au plasma pendant 60 secondes à 350 mTorr, puis à la vapeur de TMCS (triméthylchloro-silane, Sigma) pendant 60 secondes supplémentaires. La photolithographie est réalisée avec la résine photosensible AZ5214E utilisée habituellement pour les procédés de *lift-off*.

- Etalement de la résine à 4500 rpm (@300 rpm/s) pendant 30 secondes.
- Chauffage à 125 °C pendant 1 minute.
- Exposition en présence du masque aux UV sur un fond noir, pour éviter les réflexions supplémentaires, à 180 mJ/cm<sup>2</sup>.
- Chauffage à 125 °C pendant 1 minute.
- Exposition aux UV sur un fond noir de la totalité du substrat, sans masque, à 600 mJ/cm<sup>2</sup>.
- Développement à l'AZMif726 pendant 40 secondes.
- Nettoyage au plasma pendant 1 minute à 350 mTorr.

Lors des étapes de photolithographie intermédiaires, il est important de bien nettoyer les substrats pour s'acquitter des particules éventuelles accumulées lors du transport des échantillons.

## D.2 Dépôt de métaux et d'isolants ; gravure

Nous remercions le Laboratoire de Photonique et Nanostructures pour le soutien technique, et tout particulièrement Guilhem Velve Casquillas, qui a rendu possible cette partie de la microfabrication des électrodes.

### *Dépôt métallique*

Le dépôt métallique des 3 métaux Ti/Pt/Cr aux épaisseurs relatives de 5/50/5nm s'effectue avec la machine alcatel SCM 450, évaporateur à canon à électron. Les caractéristiques du procédé sont les suivants :

- Pression <  $5.10^{-7}$  mbar
- Ti : 0.5/1 nm/min
- Pt : 0.5 nm/min
- Cr : 0.5/1 nm/min

### *Dépôt de Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>*

Le dépôt de la couche isolante de nitrure de silice, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, d'une épaisseur de 400 nm s'effectue avec la machine UNAXIS RF-PECVD ND200. Les caractéristiques du procédé sont les suivants :  
 Temperature du substrat : 280 °C

Gaz :  $\text{SiH}_4$  : 5 sccm et  $\text{N}_2$  : 400 sccm

Puissance RF : 100W

Temps de dépôt : 1411 secondes

#### *Gravure de $\text{Si}_3\text{N}_4$*

Le gravure sèche de la couche isolante de nitrure de silice,  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , pour découvrir le métal s'effectue avec la machine NEXTRAL NE100. Les caractéristiques du procédé sont les suivants :

$\text{SF}_6$  : 10 sccm Pression : 30 mTorr Puissance RF : 30W (vitesse de gravure théorique : 117 nm/min) Temps de gravure : 5 minutes

#### *Gravure de la couche de chrome*

La couche d'accroche en chrome s'élimine par gravure humide par immersion dans la solution de gravure *Chrome Etch* de 30 à 60 secondes. Il est important de ne pas oublier d'éliminer les résidus de résine souvent présents à l'acétone.

### D.3 Réalisation des contacts

Les connecteurs utilisés pour réaliser les contacts sont des *SH connectors 1.0mm pitch* (JST) qui permettent des contacts propres et maniables (figure 7.4B, page 135).

Pour les coller sur les pistes de métal, nous utilisons de la pâte à braser qui, après chauffage, ne mouille que les parties métalliques. Pour cela, il est important d'appliquer une très faible quantité de pâte à braser sur les pattes des connecteurs, de placer ces derniers sur les pistes métalliques, et de chauffer l'ensemble à  $180^\circ\text{C}$  jusqu'à la fusion de la pâte à braser. L'ensemble doit être rapidement enlevé de la plaque chauffante et refroidi progressivement.

Les caractéristiques de la pâte à braser CMS Jelt6825 (ITW) sont les suivantes :

Alliage :  $\text{Sn}_62\text{Pb}_36\text{Ag}_2$

Température de fusion :  $178^\circ\text{C}$

### D.4 Dépôt de noir de platine

Le dépôt de noir de platine est réalisée par réduction de l'acide hexachloroplatinique  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ , et est suivie par la mesure du courant d'électrodéposition du platine  $\text{Pt}_{IV}$  en  $\text{Pt}^0$ . La quantité de noir de platine déposé est déterminée en intégrant le courant d'électrodéposition au cours du temps.

La solution de platination a pour composition, pour 10 mL (à conserver à l'abri de la lumière) :

2,4 mg Acétate de Plomb (II)

1,5 mL Acide hexachloroplatinique

9,59 mL PBS

La platination s'effectue habituellement en fixant un potentiel à l'électrode de  $-65\text{ mV VS Ag/AgCl}$ .



# Index



# Index

- Chronoampérométrie, 117
- Courant capacitif, 113
- Courant faradique, 114
- CSM, 87, 88, 93
  - Différenciation adipocytaire, 94, 183
  - Différenciation neuronale, 97, 184
- Culture cellulaire, 181
  - Densité d'ensemencement, 88, 96
  - Flux, 87
  - Géométries, 86
- Exocytose, 15, 111
  - Expérimentation, 121
  - Pôle apical vs. pôle basal, 122
- Fonctionnalisation des surfaces, 28, 81, 184
- ITO, 120
  - Indice de réfraction, 124
- Lithographie molle, 27, 167
  - Protocole, 168
- Lithographie molle multicouche, 30
  - Éléments actifs, 33
  - Protocole, 171
- Micro-aspiration, 41
  - Applications, 173
  - Culture cellulaire, 101
  - Modèles, 42
  - Précautions expérimentales, 50
  - Règles de conception, 49
  - Simulations, 47, 179
  - Validation expérimentale, 45
- Microélectrode, 37
  - Bibliographie, 115
  - Caractérisation, 138
  - Configuration à 3 électrodes, 129
  - Electrodéposition, 137, 191
  - Fabrication, 136, 189
  - ITO, 120
  - Propriétés, 114
  - Réseau, 116
    - Configurations, 155
    - Fabrication, 134
    - Référence, 141
    - Stress oxydant, 132
- Micropatterning
  - GLM, 83
  - Microcontact printing, 52, 83, 185
  - Multi-colour microcontact printing, 52, 174
- Microstructures en vaguelettes, 77, 184
- Multilayer soft lithography, 30
- Multipotentiostat, 156
- Noir de Platine, 129, 137, 139, 191
- Onde évanescente, 119, 123
- Patch-clamp, 118
- PDMS, 28
  - Module de Young, 46
- Pièges à cellules
  - Bibliographie, 57
  - Couplage électrochimique, 62
  - Diffusion des réactifs, 63
  - Expérimentation, 103
  - Simulations, 58
  - Viabilité cellulaire, 105
- Référence (électrode de), 140
- RAW, 20, 87, 127
  - Positionnement, 102
- ROS,RNS, 17
- Soft lithography, 27
- Stress oxydant, 17, 132

- Synapse artificielle, 117, 122
- Système intégré, 143
  - Configurations, 145
  - Mesures, 149
  - Montage expérimental, 147
  - Paramètres supplémentaires, 156

# Bibliographie



# Bibliographie

- [1] ALBERTS, BRAY, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS et WALTER. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, USA, 1994.
- [2] E. J. STEWART, R. MADDEN, G. PAUL et F. TADDEI. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *Public Library of Science Biology*, **3**, 295 (2005).
- [3] M. BORNENS et M. PIEL. Centrosome inheritance : birthright or the privilege of maturity? *Current biology*, **12**, 71 (2002).
- [4] M. B. ELOWITZ, A. J. LEVINE et E. D. SIGGIA. Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science*, **297**, 1183 (2002).
- [5] N. Q. BALABAN, J. MERRIN, R. CHAIT, L. KOWALIK et S. LEIBLER. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science*, **305**, 1622 (2004).
- [6] G. WHITESIDES. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, **442**, 368 (2006).
- [7] A. MANZ, D. J. HARRISON, E. M. J. VERPOORTE, J. C. FETTINGER, A. PAULUS, H. LUDI et H. M. WIDMER. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems - capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography*, **593**, 253 (1992).
- [8] D. N. BRESLAUER, P. J. LEE et L. P. LEE. Microfluidics-based systems biology. *Molecular BioSystems*, **2**, 97 (2006).
- [9] J. EL-ALI, P. K. SORGER et K. F. JENSEN. Cells on chips. *Nature*, **442**, 403 (2006).
- [10] E. THÉRY, A. JIMÉNEZ-DALMARONI, V. RACINE, M. BORNENS et F. JÜLICHER. Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature*, **447**, 493 (2007).
- [11] S. TAKAYAMA, E. OSTUNI, P. LEDUC et K. NARUSE. Laminar flows - Subcellular positioning of small molecules. *Nature*, **411**, 1016 (2001).
- [12] P. J. LEE, P. J. HUNG, Rao. V. M. et L. P. LEE. Nanoliter Scale Microbioreactor Array for Quantitative Cell Biology. *Biotechnology and Bioengineering*, **94**, 5 (2006).
- [13] R. D. BURGOYNE et A. MORGAN. Secretory Granule Exocytosis. *Physiological Reviews*, **83**, 581 (2003).
- [14] D. ZENISEK, J. A. STEYER et W. ALMERS. Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature*, **406**, 849 (2000).
- [15] T. K. CHEN, G. LUO et A. G. EWING. Amperometric Monitoring of Stimulated Catecholamine Release from Rat Pheochromocytoma (PC12) Cells at the Zeptomole Level. *Analytical Chemistry*, **66**, 3031 (1994).

- [16] P. E. MARSZALEK, B. FARRELL, P. VERDUGO et Fernandez J. M.. Kinetics of release of serotonin from isolated secretory granules. I. Amperometric detection of serotonin from electroporated granules. *Biophysical Journal*, **73**, 1160 (1997).
- [17] S. E. HOCHSTETLER, M. PUOPOLO, S. GUSTINCICH, E. RAVIOLA et Wightman R. M.. Real-time amperometric measurements of zeptomole quantities of Dopamine released from neurons. *Analytical Chemistry*, **72**, 489 (2000).
- [18] C. AMATORE, Y. BOURET et L. MIDRIER. Time-resolved dynamics of the vesicle membrane during individual exocytotic secretion events, as extracted from amperometric monitoring of adrenaline exocytosis from chromaffin cells. *Chemistry-A European Journal*, **5**, 2151 (1999).
- [19] C. AMATORE, Y. BOURET, E. R. TRAVIS et R. M. WIGHTMAN. Adrenaline release by chromaffin cells : Constrained swelling of the vesicle matrix leads to full fusion. *Angewandte Chemie-International Edition*, **39**, 1952 (2000).
- [20] Y. BOURET. Diffusion en milieu nanométrique confiné : application à l'exocytose de neurotransmetteurs et à la communication moléculaire dans les dendrimères redox. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), 2002.
- [21] M. GUILLE. Détection par microélectrodes de flus atto- à femtomolaires de neuromédiateurs sur cellule unique et dans un tissu vivant. Thèse de doctorat, Université Denis Diderot (Paris 6), 1997.
- [22] C. AMATORE, S. ARBAULT, I. BONIFAS, Y. BOURET, M. ERARD et M. GUILLE. Dynamics of full fusion during vesicular exocytotic events : Release of adrenaline by chromaffin cells. *Chemphyschem*, **4**, 147 (2003).
- [23] C. AMATORE, S. ARBAULT, Y. BOURET, M. GUILLE, F. LEMAÎTRE et Y. VERCHIER. Regulation of exocytosis in chromaffin cells by trans-insertion of lysophosphatidylcholine and arachidonic acid into the outer leaflet of the cell membrane. *Chembiochem*, **7**, 1998 (2006).
- [24] A. FAVIER. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, **20**, 573 (1999).
- [25] C. AMATORE, S. ARBAULT, D. BRUCE, P. de OLIVEIRA et E. M. VUILLAUME. Analysis of Individual Biochemical Events Based on Artificial Synapses using Ultramicroelectrodes : Cellular Oxidative Burst. *Faraday Discussions*, **116**, 319 (2000).
- [26] C. AMATORE, S. ARBAULT, C. BOUTON, K. COFFI, J. C. DRAPIER, H. GHANDOUR et Y. TONG. Monitoring in Real Time with a Microelectrode the Release of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by a Single Macrophage Stimulated by its Membrane Mechanical Depolarization. *Chembiochem*, **7**, 653 (2006).
- [27] R. DUGGIRALA, Il-Seok S. et A. LAL. A pyroelectric-piezoelectric valve for integrated microfluidics. Paru dans *TRANSDUCERS, Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 12th International Conference, 2003*, page 1554. IEEE Service Center, USA, 2003.
- [28] T. P. BURG et S. R. MANALIS. Suspended microchannel resonators for biomolecular detection. *Applied Physics Letters*, **83**, 2698 (2003).
- [29] Y. XIA et G. M. WHITESIDES. Soft Lithography. *Angewandte Chemie-International Edition*, **37**, 551 (1998).
- [30] M. ESASHI, S. SHOJI et A. NAKANO. Normally closed microvalve and micropump fabricated on a silicon-wafer. *Sensors and Actuators*, **20**, 163 (1989).

- [31] J. L. YANG, T. ONO et M. ESASHI. Surface effects and high quality factors in ultrathin single-crystal silicon cantilevers. *Applied Physics Letters*, **77**, 3860 (2000).
- [32] N. FERTIG, R. H. BLICK et J. C. BEHREND. Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip. *Biophysical Journal*, **82**, 3056 (2002).
- [33] L. MARTYNOVA, L. E. LOCASCIO, M. GAITAN, G. W. KRAMER, R. G. CHRISTENSEN et W. A. MACCREHAN. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Analytical Chemistry*, **69**, 4783 (1997).
- [34] D. C. DUFFY, J. C. McDONALD, O. J. A. SCHUELLER et G. WHITESIDES. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, **70**, 4974 (1998).
- [35] M. CHAUDURY et G. WHITESIDES. Direct Measurement of Interfacial Interactions between Semispherical Lenses and Flat Sheets of Poly(dimethylsiloxane) and Their Chemical Derivatives. *Langmuir*, **7**, 1013 (1991).
- [36] B. KIM, E. K. PETERSON et I. PAPAUTSKY. Long-term stability of plasma oxidized PDMS surfaces. Paru dans *Proceedings of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference*, page 1554. IEEE, USA, 2004.
- [37] M. LI, J. WANG, Lei ZHUANG et S. Y. CHOU. Fabrication of circular optical structures with a 20 nm minimum feature size using nanoimprint lithography. *Applied Physics Letters*, **76**, 673 (2000).
- [38] M. A. UNGER, H.-P. CHOU, T. THORSEN, A. SCHERER et S. QUAKE. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science*, **288**, 113 (2000).
- [39] D. T. CHIU, N. L. JEON, S. HUANG, R. S. KANE, C. J. WARGO, I. S. CHOI, D. E. INGER et G. M. WHITESIDES. Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 2408 (2000).
- [40] E. OSTUNI, R. KANE, C. S. CHEN, D. E. INGBER et G. M. WHITESIDES. Patterning Mammalian Cells Using Elastomeric Membranes. *Langmuir*, **16**, 7811 (2000).
- [41] K. IKUTA, K. HIROWATARI et T. OGATA. Long-term stability of plasma oxidized PDMS surfaces. Paru dans *Proceedings of the International Conference on IEEE Micro Electro-Mechanical Systems*, page 1. IEEE, USA, 1994.
- [42] P. M. MCINTYRE. Microfabrication technology for DNA sequencing. *Trends in Biotechnology*, **14**, 69 (1996).
- [43] J. VOLDMAN, M. L. GRAY et M. A. SCHMIDT. Microfabrication in Biology and Medicine. *Review of Biomedical Engineering*, **1**, 401 (1999).
- [44] M. MEHRVAR et M. ABDI. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical Science*, **20**, 1113 (2004).
- [45] G. HANRAHAN, D. G. PATIL et J. WANG. Electrochemical sensors for environmental monitoring : design, development and applications. *Journal of Environmental Monitoring*, **6**, 657 (2004).
- [46] J. CHENG, P. FORTINA, S. SURREY, L. J. KRICKA et P. WILDING. Microchip-based Devices for Molecular Diagnosis of Genetic Diseases. *Molecular diagnosis*, **1**, 183 (1996).

- [47] P. MARSH et D. L. CARDY. Molecular diagnostics : future probe-based strategies. *Methods in Molecular Biology*, **266**, 167 (2004).
- [48] K. HUIKKO, R. KOSTIAINEN et T. KOTIAHO. Introduction to micro-analytical systems : bioanalytical and pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **20**, 149 (2003).
- [49] K. BHADRIRAJU et C. S. CHEN. Engineering cellular microenvironments to cell-based drug testing improve. *Drug Discovery Today*, **7**, 612 (2002).
- [50] J. J. PANCAZIO, S. A. GRAY, Y. S. SHUBIN, N. KULAGINA, D. S. CUTTINO, K. M. SHAFFER, K. EISEMANN, A. CURRAN, B. ZIM, G. W. GROSS et T. J. O'SHAUGHNESSY. A portable microelectrode array recording system incorporating cultured neuronal networks for neurotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 1339 (2003).
- [51] K. IRIMIA, S.-Y. LIU, W. G. THARP, A. SAMADANI, M. TONER et M. C. POSNANSKY. Microfluidic system for measuring neutrophil migratory responses to fast switches of chemical gradients. *Lab on a Chip*, **6**, 191 (2006).
- [52] W. GU, X. ZHU, N. FUTAI, B. S. CHO et S. TAKAYAMA. Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **87**, 269 (2004).
- [53] J. S. MARCUS, W. F. ANDERSON et S. R. QUAKE. Parallel Picoliter RT-PCR Assays Using Microfluidics. *Analytical Chemistry*, **78**, 956 (2006).
- [54] A. Y. FU, H.-P. CHOU, C. SPENCE, F. H. ARNOLD et S. R. QUAKE. An Integrated Microfabricated Cell Sorter. *Analytical Chemistry*, **74**, 2451 (2002).
- [55] C. L. HANSEN, E. SKORKALAKES, J. M. BERGER et Quake S. R.. A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 16531 (2002).
- [56] J. P. GLEESON, P. M. ROCHE, J. WEST et A. GELB. Modelling annular micromixers. *Siam Journal on Applied Mathematics*, **64**, 1294 (2004).
- [57] J. W. HONG, V. STUDER, G. HANG, F. W. ANDERSON et S. R. QUAKE. A nonoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture. *Nature Biotechnology*, **22**, 435 (2004).
- [58] T. THORSEN, S. J. MAERKL et S. R. QUAKE. Microfluidic Large-Scale Integration. *Science*, **298**, 580 (2002).
- [59] Z.S. HUA, Y. M. XIA, O. SRIVANNAVIT, J. M. ROUILLARD, X. ZHOU, X. GAO et E. GULARI. A versatile microreactor platform featuring a chemical-resistant microvalve array for addressable multiplex syntheses and assays. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **16**, 1433 (2006).
- [60] W. H. GROVER, R. H. C. IVESTER, E. C. JENSEN et R. A. MATHIES. Development and multiplexed control of latching pneumatic valves using microfluidic logical structures. *Lab on a Chip*, **6**, 623 (2006).
- [61] J. S. MARCUS, W. F. ANDERSON et S. R. QUAKE. Microfluidic Single-Cell mRNA Isolation and Analysis. *Analytical Chemistry*, **78**, 3084 (2006).
- [62] J. MELIN et S. R. QUAKE. Microfluidic Large-Scale Integration : The Evolution of Design Rules for Biological Automation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **36**, 213 (2007).

- [63] P. S. DITTRICH et A. MANZ. Single-molecule fluorescence detection in microfluidic channels - the Holy Grail in uTAS? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**, 1771 (2005).
- [64] T. KITAMORI, M. TOKESHI, A. HIBARA et K. SATO. Thermal lens microscopy and microchip chemistry. *Analytical Chemistry*, **76**, 52A (2004).
- [65] MP. DUGGAN, T. MCCREEDY et J. W. AYLOTT. A non-invasive analysis method for on-chip spectrophotometric detection using liquid-core waveguiding within a 3D architecture. *Analyst*, **128**, 1336 (2003).
- [66] M. LIU, B.-F. and Ozaki, Y. UTSUMI, T. HATTORI et S. TERABE. Chemiluminescence Detection for a Microchip Capillary Electrophoresis System Fabricated in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, **75**, 36 (2003).
- [67] J. C. SANDERS, Z. L. HUANG et J. P. LANDERS. Acousto-optical deflection-based whole channel scanning for microchip isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection. *Lab on a Chip*, **1**, 167 (2001).
- [68] C. D. COSTIN et R. E. SYNOVEC. A microscale-molecular weight sensor : Probing molecular diffusion between adjacent laminar flows by refractive index gradient detection. *Analytical Chemistry*, **74**, 4558 (2002).
- [69] P. D. I. FLETCHER, S. J. HASWELL et Zhang X.. Monitoring of chemical reactions within microreactors using an inverted Raman microscopic spectrometer. *Electrophoresis*, **24**, 3239 (2003).
- [70] M. PALUMBO, C. PEARSON, J. NAGEL et M. C. PETTY. A single chip multi-channel surface plasmon resonance imaging system. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **90**, 264 (2003).
- [71] E. TAMAKI, K. SATO, M. TOKESHI, M. AIHARA et T. KITAMORI. Single-Cell Analysis by a Scanning Thermal Lens Microscope with a Microchip : Direct Monitoring of Cytochrome c Distribution during Apoptosis Process. *Analytical Chemistry*, **74**, 1560 (2002).
- [72] S. BALSLEV et A. KRISTENSEN. Microfluidic single-mode laser using high-order Bragg grating and antiguiding segments. *Optics Express*, **13**, 344 (2005).
- [73] X.-M. ZHAO, A. STODDART, S. P. SMITH, E. KIM, Y. XIA et G. M. WHITESIDES. Fabrication of single-mode polymeric waveguides using micromolding in capillaries. *Advanced Materials*, **8**, 420 (1996).
- [74] P. YANG, G. WIRNSBERGER, H. C. HUANG, S. R. CORDERO, M. D. MCGEHEE, B. SCOTT, T. DENG, G. M. WHITESIDES, B. F. CHMELKA, Buratto S. K. et G. D. STUCKY. Mirrorless Lasing from Mesostuctured Waveguides Patterned by Soft Lithography. *Science*, **287**, 465 (2000).
- [75] D. V. VEZENOV, B. T. MAYERS, R. S. CONROY, G. M. WHITESIDES, P. T. SNEE, Y. CHAN, D. G. NOCERA et M. G. BAWENDI. A Low-Threshold, High-Efficiency Microfluidic Waveguide Laser. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 8952 (2005).
- [76] Y. XIA, E. KIM, X.-M. ZHAO, J. A. ROGERS, M. PRENTISS et G. M. WHITESIDES. Complex Optical Surfaces Formed by Replica Molding Against Elastomeric Masters. *Science*, **273**, 347 (1996).
- [77] Y. GAMBIN, O. LEGRAND et S. R. QUAKE. Microfabricated rubber microscope using soft solid immersion lenses. *Applied Physics Letters*, **88**, 174102 (2006).

- [78] D. PSALTIS, S. R. QUAKE et C. YANG. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature*, **442**, 381 (2006).
- [79] H. LEE, Y. LIU, D. HAM et R. M. WESTERVELT. Integrated cell manipulation system - CMOS/microfluidic hybrid. *Lab on a Chip*, **7**, 331 (2007).
- [80] N. PAMME. Magnetism and microfluidics. *Lab on a Chip*, **6**, 24 (2006).
- [81] J. S. ROSSIER, M. A. ROBERTS, R. FERRIGNO et H. H. GIRAULT. Electrochemical detection in polymer microchannels. *Analytical Chemistry*, **71**, 4294 (1999).
- [82] E. BAKKER. Electrochemical Sensors. *Analytical Chemistry*, **76**, 3285 (2004).
- [83] D. J. BEEBE, J. S. MOORE, J. M. BAUER, Q. YU, R. H. LIU, C. DEVADOSS et B.-H. JO. Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels. *Nature*, **404**, 588 (2000).
- [84] F. ARAI, C. NG, H. MARUYAMA, A. ICHIKAWA, H. EL-SHIMY et T. FUKUDA. On chip single-cell separation and immobilization using optical tweezers and thermosensitive hydrogel. *Lab on a Chip*, **5**, 1399 (2005).
- [85] D. KIM et D. J. BEEBE. Hydrogel-based reconfigurable components for microfluidic devices. *Lab on a Chip*, **7**, 193 (2007).
- [86] S. K. W. DERTINGER, D. T. CHIU, N. L. JEON et G. M. WHITESIDES. Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks. *Analytical Chemistry*, **73**, 1240 (2001).
- [87] J. de JONG, R. G. H. LAMMERTINK et M. WESSLING. Membranes and microfluidics : a review. *Lab on a Chip*, **6**, 1125 (2006).
- [88] D. ARMANI et C. LIU. Re-configurable Fluid Circuits By PDMS Elastomer Micromachining. Paru dans *12th International Conference on MEMS, MEMS 99*, page 222. IEEE, USA, 1998.
- [89] S. K. W. DERTINGER, X. JIANG, Z. LI, V. N. MURTHY et G. M. WHITESIDES. Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 12542 (2002).
- [90] A. BERNARD, J.-P. RENAULT, B. MICHEL, H. R. BOSSHARD et E. DELAMARCHE. Microcontact Printing of Proteins. *Advanced Materials*, **12**, 1067 (2000).
- [91] A. BERNARD, B. MICHEL et E. DELAMARCHE. Micromosaic immunoassays. *Analytical Chemistry*, **73**, 8 (2001).
- [92] E. THÉRY, V. RACINE, A. PÉPIN, M. PIEL, Y. CHEN, J.-B. SIBARITA et M. BORNENS. The Orientation of the Division Axis can be Controlled in Cultured Cells. *Nature Cell Biology*, **10**, 947 (2005).
- [93] A. KUMAR et Whitesides G. M.. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, **63**, 2002 (1993).
- [94] P. M. ST. JOHN, R. DAVIS, N. CADY, J. CZAJKA, C. A. BATT et H. G. CRAIGHEAD. Diffraction-Based Cell Detection Using a Microcontact Printed Antibody Grating. *Analytical Chemistry*, **70**, 1108 (1998).
- [95] B. C. WHEELER, J. M. COREY, G. J. BREWER et D. W. BRANCH. Microcontact printing for precise control of nerve cell growth in culture. *Journal of Biomechanical Engineering*, **121**, 73 (1999).

- [96] C. CROZATIER, M. LE BERRE et Y. CHEN. Multi-colour micro-contact printing based on microfluidic network inking. *Microelectronic Engineering*, **83**, 910 (2006).
- [97] U. SEGER, S. GAWAD, R. JOHANN, A. BERTSCH et P. RENAUD. Cell immersion and cell dipping in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, **4**, 148 (2004).
- [98] X. Y. PENG et P. C. H. LI. A Three-Dimensional Flow Control Concept for Single-Cell Experiments on a Microchip. 1. Cell Selection, Cell Retention, Cell Culture, Cell Balancing, and Cell Scanning. *Analytical Chemistry*, **76**, 5273 (2004).
- [99] W. HELLMICH, C. PELARGUS, K. LEFFHALM, A. ROS et D. ANSELMETTI. Single cell manipulation, analytics, and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology. *Electrophoresis*, **26**, 3689 (2005).
- [100] T. BRASCHLER, R. JOHANN, M. HEULE, L. METREF et P. RENAUD. Gentle cell trapping and release on a microfluidic chip by in situ alginate hydrogel formation. *Lab on a Chip*, **5**, 553 (2005).
- [101] G. D. M. JEFFRIES, J. S. EDGAR, Y. ZHAO, J. P. SHELBY, C. FONG et D. T. CHIU. Using Polarization-Shaped Optical Vortex Traps for Single-Cell Nanosurgery. *Nano Letters*, **7**, 415 (2007).
- [102] J. H. KOSCHWANEZ, R. H. CARLSON et D. R. MELDRUM. Easily fabricated magnetic traps for single-cell applications. *Review of Scientific Instruments*, **78**, 044301 (2007).
- [103] A. B. FUCHS, A. ROMANI, D. FREIDA, G. MEDORO, M. ABONNENC, L. ALTOMARE, I. CHARTIER, D. GUERGOUR, C. VILLIERS, P. N. MARCHE, M. TARTAGNI, GUERRIERI, F. CHATELAIN et N. MANARESI. Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab on a Chip*, **6**, 121 (2006).
- [104] V. KOHLI, A. Y. ELEZZABI et J. P. ACKER. Cell nanosurgery using ultrashort (femtosecond) laser pulses : applications to membrane surgery and cell isolation. *Lasers in Surgery and Medicine*, **37**, 227 (2005).
- [105] G. TO'A SALAZAR, Y. WANG, G. YOUNG, M. BACHMAN, C. E. SIMS, G. P. LI et N. L. ALLBRITTON. Micropallet Arrays for the Separation of Single, Adherent Cells. *Analytical Chemistry*, **79**, 682 (2007).
- [106] H. KIM, J. DOH, D. J. IRVINE, R. E. COHEN et P. T. HAMMOND. Large Area Two-Dimensional B Cell Arrays for Sensing and Cell-Sorting Applications. *Biomacromolecules*, **5**, 822 (2004).
- [107] M. TANASE, E. J. FELTON, D. S. GRAY, A. HULTGREN, C. S. CHEN et E. H. REICH. Assembly of multicellular constructs and microarrays of cells using magnetic nanowires. *Lab on a chip*, **5**, 598 (2005).
- [108] N. M. TORIELLO, E. S. DOUGLAS et R. A. MATHIES. Microfluidic Device for Electric Field-Driven Single-Cell Capture and Activation. *Analytical Chemistry*, **77**, 6935 (2005).
- [109] M. EVANDER, L. JOHANSSON, T. LILLIEHORN, J. PISKUR, M. LINDVALL, S. JOHANSSON, M. ALMQVIST, T. LAURELL et J. NILSSON. Noninvasive Acoustic Cell Trapping in a Microfluidic Perfusion System for Online Bioassays. *Analytical Chemistry*, **79**, 2984 (2007).
- [110] I. BIRAN et D. R. WALT. Optical Imaging Fiber-Based Single Live Cell Arrays : A High-Density Cell Assay Platform. *Analytical Chemistry*, **74**, 3046 (2002).

- [111] A. VALERO, F. MERINO, F. and Wolbers, R. LUTTGE, I. VERMES, H. ANDERSSON et A. van den BERG. Apoptotic cell death dynamics of HL60 cells studied using a microfluidic cell trap device. *Lab on a Chip*, **5**, 49 (2005).
- [112] A. R. WHEELER, R. J. THRONSET, W. R. adn Whelan, A. M. LEACH, R. N. ZARE, Y. H. LIAO, I. D. FARRELL, K. and Manger et A. DARIDON. Microfluidic Device for Single-Cell Analysis. *Analytical Chemistry*, **75**, 3581 (2003).
- [113] Z. WANG, M.-C. KIM, M. MARQUEZ et T. THORSEN. High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis. *Lab on a Chip*, **7**, 740 (2007).
- [114] K. DI CARLO, L. Y. WU et L. P. LEE. Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip*, **6**, 1445 (2006).
- [115] W.-H. TAN et S. TAKEUCHI. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 1146 (2007).
- [116] F. WHITE. Viscous Fluid Flow, 2nd edition. McGraw-Hill, USA, 1991.
- [117] D. J. BEEBE, G. A. MENSING et G. M. WALKER. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **4**, 261 (2002).
- [118] A. AJDARI. Steady flows in networks of microfluidic channels : building on the analogy with electrical circuits. *Comptes Rendus Physique*, **5**, 539 (2004).
- [119] A. FOLCH et M. TONER. Microengineering of cellular interactions. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **2**, 227 (2000).
- [120] V. L. TSANG et S. N. BHATIA. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced drug delivery reviews*, **56**, 1635 (2004).
- [121] S. BRITLAND, P. CLARK, P. CONNOLLY et G. MOORES. Micropatterned substratum adhesiveness : a model for morphogenetic cues controlling cell behavior. *Experimental Cell Research*, **198**, 124 (1992).
- [122] C. S. CHEN, M. MRKSICH, S. HUANG, G. M. WHITESIDES et D. E. INGBER. Geometric control of cell life and death. *Science*, **276**, 1425 (1997).
- [123] J. L. TAN, J. TIEN, D. M. PIRONE, D. S. GRAY, K. BHADRIRAJU et C. S. CHEN. Cells lying on a bed of microneedles : An approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 1484 (2003).
- [124] A. SIN, K. C. CHIN, M. F. JAMIL, Y. KOSTOV, G. RAO et M. L. SHULER. The Design and Fabrication of Three-Chamber Microscale Cell Culture Analog Devices with Integrated Dissolved Oxygen Sensors. *Biotechnology Progress*, **20**, 338 (2003).
- [125] E. LECLERC, Y. SAKAI et T. FUJII. Microfluidic PDMS (Polydimethylsiloxane) Bioreactor for Large-Scale Culture of Hepatocytes. *Biotechnology Progress*, **20**, 750 (2004).
- [126] G. MEHTA, K. MEHTA, D. SUD, J. SONG, T. BERSANO-BEGEY, N. FUTAI, Y. S. HEO, Mycek M.-A., J. LINDERMAN et S. TAKAYAMA. Quantitative measurement and control of oxygen levels in microfluidic poly(dimethylsiloxane) bioreactors during cell culture. *Biomedical Microdevices*, **9**, 123 (2007).
- [127] M. J. POWERS, K. DOMANSKY, M. R. KAAZEMPUR-MOFRAD, A. KALEZI, A. CAPITANO, A. UPADHYAYA, P. KURZAWSKI, K. E. WACK, D. B. STOLZ, R. KAMM et L. G. GRIFFITH. A Microfabricated Array Bioreactor for Perfused 3D Liver Culture. *Biotechnology and bioengineering*, **78**, 257 (2002).

- [128] A. SIVARAMAN, J. K. LEACH, S. TOWNSEND, T. IIDA, B. J. HOGAN, D. B. STOLZ, Fry R., L. D. SAMSON, S. R. TANNENBAUM et Griffith L. G.. A microscale in vitro physiological model of the liver : predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. *Current drug metabolism*, **6**, 569 (2005).
- [129] S. N. BHATIA, M. L. YARMUSH et M. TONER. Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures : hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, **34**, 189 (1997).
- [130] Y. LI, B. YUAN, H. JI, D. HAN, S. CHEN, F. TIAN et Jiang X.. A Method for Patterning Multiple Types of Cells by Using Electrochemical Desorption of Self-Assembled Monolayers within Microfluidic Channels. *Angewandte Chemie International Edition*, **46**, 1094 (2007).
- [131] U. M. LIEGIBEL, U. SOMMER, B. BUNDSCHUH, B. SCHWEIZER, Hilscher U., Lieder A., Nawroth P. et Kasperk C.. Fluid shear of low magnitude increases growth and expression of TGF-beta-1 and adhesion molecules in human bone cells in vitro. *Experimental and clinical endocrinology and diabetes*, **112**, 356 (2004).
- [132] E. LECLERC, B. DAVID, L. GRISCOM, B. LE PIOUFLE, T. FUJII, P. LAYROLLE et C. LEGALLAIS. Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment. *Biomaterials*, **27**, 586 (2006).
- [133] J. EL-ALI, S. GAUDET, A. GUNTHER, P. K. SORGER et K. F. JENSEN. Cell stimulus and lysis in a microfluidic device with segmented gas-liquid flow. *Analytical Chemistry*, **77**, 3629 (2005).
- [134] Faure S. P. FRENEA, M. and, B. LE PIOUFLE, P. COQUET et H. FUJITA. Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, **23**, 597 (2003).
- [135] M. S. YANG, C. W. LI et J. YANG. Cell docking and on-chip monitoring of cellular reactions with a controlled concentration gradient on a microfluidic device. *Analytical Chemistry*, **74**, 3991 (2002).
- [136] P. J. LEE, P. J. HUNG, R. SHAW, L. JAN et L. P. LEE. Microfluidic application-specific integrated device for monitoring direct cell/cell communication via gap junctions between individual cell pairs. *Applied Physics Letters*, **86**, 223902 (2005).
- [137] N. L. JEON, H. BASKARAN, S. K. W. DERTINGER, G. M. WHITESIDES, L. van de WATER et M. TONER. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nature Biotechnology*, **20**, 826 (2002).
- [138] V. V. ABHYANKAR, M. A. LOKUTA, A. HUTTENLOCHER et D. J. BEEBE. Characterization of a membrane-based gradient generator for use in cell-signaling studies. *Lab on a Chip*, **6**, 389 (2006).
- [139] E. M. LUCCHETTA, J. H. LEE, L. A. FU, N. H. PATEL et R. F. ISMAGILOV. Dynamics of Drosophila embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics. *Nature*, **434**, 1134 (2005).
- [140] L. BOUSSE. Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **34**, 270 (1996).
- [141] M. B. GU, R. J. MITCHELL et B. C. KIM. Whole-cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 1586 (2004).

- [142] H. K. WU, A. WHEELER et R. N. ZARE. Chemical cytometry on a picoliter-scale integrated microfluidic chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 12809 (2004).
- [143] J. GAO, X. F. YIN et Z. L. FANG. Integration of single cell injection, cell lysis, separation and detection of intracellular constituents on a microfluidic chip. *Lab on a Chip*, **4**, 47 (2004).
- [144] V. V. ABHYANKAR et D. J. BEEBE. Lab-on-Chips for Cellomics, page 257. Springer Publishing, 2004.
- [145] B. G. CHUNG, L. A. FLANAGAN, S. W. RHEE, P. H. SCHWARTZ, A. P. LEE, E. S. MONUKI et N. L. JEON. Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. *Lab on a chip*, **5**, 401 (2005).
- [146] L. KIM, M. D. VAHEY, H. Y. LEE et J. VOLDMAN. Microfluidic arrays for logarithmically perfused embryonic stem cell culture. *Lab on a Chip*, **6**, 394 (2006).
- [147] S. FIEDLER, S. G. SHIRLEY, T. SCHNELLE et G. FUHR. Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. *Analytical Chemistry*, **70**, 1909 (1998).
- [148] X. HU, W. M. ARNOLD et U. ZIMMERMANN. Alterations in the electrical properties of lymphocyte-T and lymphocyte-B membranes induced by mitogenic stimulation :activation monitored by electro-rotation of single cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1021**, 191 (1990).
- [149] F. F. BECKER, X.-B. WANG, Y. HUANG, R. PETHIG, J. VYKOUKAL et P. R. GASCOYNE. Separation of human breast-cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 860 (1995).
- [150] X. HU, P. H. BESSETTE, J. QIAN, C. D. MEINHART, P. S. DAUGHERTY et H. T. SOH. Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 15757 (2005).
- [151] P. C. H. LI et D. J. HARRISON. Transport, manipulation, and reaction of biological cells on-chip using electrokinetic effects. *Analytical Chemistry*, **69**, 1564 (1997).
- [152] S. W. LEE et Y. C. TAI. A micro cell lysis device. *Sensors and Actuators A-Physical*, **73**, 74 (1999).
- [153] H. LU, M. A. SCHMIDT et K. F. JENSEN. A microfluidic electroporation device for cell lysis. *Lab on a Chip*, **5**, 23 (2005).
- [154] D. DI CARLO, K. H. JEONG et L. P. LEE. Reagentless mechanical cell lysis by nanoscale barbs in microchannels for sample preparation. *Lab on a Chip*, **3**, 287 (2003).
- [155] N. CHIEM et D. J. HARRISON. Microchip-Based Capillary Electrophoresis for Immunoassays : Analysis of Monoclonal Antibodies and Theophylline. *Analytical Chemistry*, **69**, 373 (1997).
- [156] S. YAO, D. S. ANEX, W. B. CALDWELL, D. W. ARNOLD, K. B. SMITH et P. G. SCHULTZ. SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 5372 (1999).
- [157] J. P. KUTTER, S. C. JACOBSON, N. MATSUBARA et J. M. RAMSEY. Solvent-Programmed Microchip Open-Channel electrochromatography. *Analytical Chemistry*, **70**, 3291 (1998).
- [158] B. HERBERT et P. G. RIGHETTI. A turning point in proteome analysis : Sample prefractionation via multicompartement electrolyzers with isoelectric membranes. *Electrophoresis*, **21**, 3639 (2000).

- [159] M. A. NORTHRUP, M. T. CHING, R. M. WHITE et R. T. WATSON. DNA amplification with a microfabricated reaction chamber. Paru dans *Proceedings Transducers 93 : 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators, Yokohama, Japan*, page 924. IEEE, USA, 1993.
- [160] P. WILDING, M. A. SHOFFNER et L. J. KRICKA. PCR in a silicon microstructure. *Clinical Chemistry*, **40**, 1815 (1994).
- [161] J. KAMEOKA, R. ORTH, B. ILIC, D. CZAPLEWSKI, T. WACHS et H. G. CRAIGHEAD. An Electro spray Ionization Source for Integration with Microfluidics. *Analytical Chemistry*, **74**, 5897 (2002).
- [162] H. YIN, K. KILLEEN, R. BRENNEN, D. SOBEK, M. WERLICH et T. van de GOOR. Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, sample enrichment column, and nanoelectrospray tip. *Analytical Chemistry*, **75**, 527 (2005).
- [163] K. SATO, M. YAMANAKA, M. TAKAHASHI, H. Tokeshi, H. KIMURA et T. KITAMORI. Microchip-based immunoassay system with branching multichannels for simultaneous determination of interferon-gamma. *Electrophoresis*, **23**, 734 (2002).
- [164] G. GRUNER. Carbon nanotube transistors for biosensing applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **384**, 322 (2006).
- [165] G. F. ZHENG, F. PATOLSKY, Y. CUI, W. U. WANG et C. M. LIEBER. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nature Biotechnology*, **23**, 1294 (2005).
- [166] C. ZIEGLER. Cantilever-based biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **379**, 946 (2004).
- [167] A. CURTIS et C. WILKINSON. Topographical control of cells. *Biomaterials*, **18**, 1573 (1997).
- [168] R. G. FLEMMING, C. J. MURPHY, G. A. ABRAMS, S. L. GOODMAN et P. F. NEALEY. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*, **20**, 573 (1999).
- [169] X. JIANG, S. TAKAYAMA, X. QIAN, E. OSTUNI, H. WU, N. BOWDEN, P. LEDUC, D. E. INGER et G. M. WHITESIDES. Controlling Mammalian Cell Spreading and Cytoskeletal Arrangement with Conveniently Fabricated Continuous Wavy Features on Poly(dimethylsiloxane). *Langmuir*, **18**, 3273 (2002).
- [170] N. BOWDEN, S. BRITAIN, A. G. EVANS, J. W. HUTCHINSON et G. M. WHITESIDES. Spontaneous formation of ordered structures in thin films of metals supported on an elastomeric polymer. *Nature*, **393**, 146 (1998).
- [171] N. BOWDEN, W. HUCK, K. PAUL et G. M. WHITESIDES. The controlled formation of ordered, sinusoidal structures by plasma oxidation of an elastomeric polymer. *Applied Physics Letters*, **75**, 17 (1999).
- [172] Z. L. ZHANG, C. CROZATIER, M. LE BERRE et Y. CHEN. In situ bio-functionalization and cell adhesion in microfluidic devices. *Microelectronic Engineering*, **78-79**, 556 (2005).
- [173] J. W. LUSSI, D. FALCONNET, J. A. HUBBELL, M. TEXTOR et G. CSUCS. Pattern stability under cell culture conditions : A comparative study of patterning methods based on PLL-g-PEG background passivation. *Biomaterials*, **27**, 2534 (2006).

- [174] A. TOUROVSKAIA, X. FIGUEROA-MASOT et A. FOLCH. Differentiation-on-a-chip : A microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab on a Chip*, **5**, 14 (2005).
- [175] P. J. HUNG, P. J. LEE, P. SABOUNCHI, R. LIN et L. P. LEE. Continuous Perfusion Microfluidic Cell Culture Array for High-Throughput Cell-Based Assays. *Biotechnology and Bioengineering*, **89**, 1 (2005).
- [176] L. KIM, Y.-C. TOH, J. VOLDMAN et H. YU. A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *Lab on a Chip*, **7**, 681 (2007).
- [177] P. BOURIN, L. SENSEBÉ et P. CHARBORD. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) : données, controverses, perspectives. *Hématologie*, **10**, 434 (2004).
- [178] A. HERMANN, R. GASTL, S. LIEBAU, M. OANA POPA, J. FIELDER, B. O. BOEHM, M. MAISEL, H. LERCHE, J. SCHWARZ, R. BRENNER et A. STORCH. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science*, **117**, 4411 (2004).
- [179] C. CROZATIER, I. TAPSOBA, M. LE BERRE, S. ARBAULT, C. AMATORE et Y. CHEN. A reversibly assembled microfluidic chip for culture and analysis of single cell array. Paru dans *Micro Total Analysis Systems 2006*, Vol. 1, page 981. Japan Academic Association, Japan, 2006.
- [180] A. J. BARD et L. R. FAULKNER. Electrochimie, Principes, Méthodes et Applications. Masson, France, 1983.
- [181] R. M. WIGHTMAN. Voltammetry with Microscopic Electrodes in New Domains. *Science*, **240**, 415 (1988).
- [182] A. M. BOND. Past, present and future contributions of microelectrodes to analytical studies employing voltammetric detection. A review. *Analyst*, **11**, 1R (2002).
- [183] K. P. TROYER et R. M. WIGHTMAN. Dopamine Transport into a Single Cell in a Picoliter Vial. *Analytical Chemistry*, **74**, 5370 (2002).
- [184] C. AMATORE et B. FOSSET. Equivalence between Microelectrodes of Different Shapes : Between Myth and Reality. *Analytical Chemistry*, **68**, 4377 (1996).
- [185] R. T. KENNEDY, L. HUANG, M. A. ATKINSON et P. DUSH. Amperometric monitoring of chemical secretions from individual pancreatic beta-cells. *Analytical Chemistry*, **65**, 1882 (1993).
- [186] J. WANG. Analytical Electrochemistry, 2nd edition. Wiley Publishing, USA, 2000.
- [187] W. R. VANDAVEER, S. A. PASAS-FARMER, D. J. FISCHER, C. N. FRANKENFELD et S. M. LUNTE. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **25**, 3528 (2004).
- [188] A. J. DEMELLO. Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, **442**, 394 (2006).
- [189] H. CRAIGHEAD. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature*, **442**, 387 (2006).
- [190] D. DANIEL et I. G. R. GUTZ. Microfluidic cells with interdigitated array gold electrodes : Fabrication and electrochemical characterization. *Talanta*, **68**, 429 (2005).
- [191] Y. CHEN et A. PÉPIN. Nanofabrication : Conventional and nonconventional methods. *Electrophoresis*, **22**, 187 (2001).

- [192] V. N. GORAL, N. V. ZAYTSEVA et A. J. BAEUMNER. Electrochemical microfluidic biosensor for the detection of nucleic acid sequences. *Lab on a Chip*, **6**, 414 (2006).
- [193] E. NEBLING, T. GRUNWALD, J. ALBERS, P. SCHÄFER et R. HINTSCHE. Electrical Detection of Viral DNA Using Ultramicroelectrode Arrays. *Analytical Electrochemistry*, **76**, 689 (2004).
- [194] S. A. G. EVANS, J. M. ELLIOTT, L. M. ANDREWS, P. N. BARTLETT, P. J. DOYLE et DENUAULT. Detection of Hydrogen Peroxide at Mesoporous Platinum Microelectrodes. *Analytical Chemistry*, **74**, 1322 (2002).
- [195] J. HULLER, M. T. PHAM et S. HOWITZ. Thin layer copper ISE for fluidic microsystem. *Sensors and Actuators B*, **89**, 1 (2005).
- [196] R. N. ORTH, M. WU, D. A. HOLOWKA, H. G. CRAIGHEAD et B. A. BAIRD. Mast cell activation on patterned lipid bilayers of subcellular dimensions. *Langmuir*, **19**, 1599 (2003).
- [197] M. GALLOWAY, W. STRYJEWSKI, A. HENRY, S. M. FORD, S. LLOPIS, R. L. MCCARLEY et S. A. SOPER. Contact Conductivity Detection in Poly(methyl methacrylate)-Based Microfluidic Devices for Analysis of Mono- and Polyanionic Molecules. *Analytical Chemistry*, **74**, 2407 (2002).
- [198] X. CAI, N. KLAUKE, A. GLIDLE, P. COBBOLD, G. L. SMITH et J. M. COOPER. Ultra-Low-Volume, Real-Time Measurements of Lactate from the Single Heart Cell Using Microsystems Technology. *Analytical Chemistry*, **74**, 908 (2002).
- [199] A. A. OLIVA, C. D. JAMES, C. E. KINGMAN, H. G. CRAIGHEAD et G. A. BANKER. Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing. *Neurochemical research*, **28**, 1639 (2003).
- [200] C. D. JAMES, A. J. H. SPENCE, N. M. DOWELL-MESFIN, R. J. HUSSAIN, K. L. SMITH, H. G. CRAIGHEAD, M. S. ISAACSON, W. SHAIN et J. N. TURNER. Extracellular Recordings From Patterned Neuronal Networks Using Planar Microelectrode Arrays. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **51**, 1640 (2004).
- [201] I. SUZUKI, Y. SUGIO, Y. JIMBO et K. YASUDA. Stepwise pattern modification of neuronal network in photo-thermally etched agarose architecture on multi-electrode array chip for individual cell-based electrophysiological measurement. *Lab on a Chip*, **5**, 241 (2005).
- [202] S. K. RAVULA, M. A. MCCLAIN, M. S. WANG, J. D. GLASS et B. FRAZIER. A multielectrode microcompartment culture platform for studying signal transduction in the nervous system. *Lab on a Chip*, **6**, 1530 (2006).
- [203] F. MORIN, N. NISHIMURA, L. GRISOM, B. LEPIOUFLE, H. FUJITA, Y. TAKAMURA et E. TAMIYA. Constraining the connectivity of neuronal networks cultured on microelectrode arrays with microfluidic techniques : A step towards neuron-based functional chips. *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 1093 (2006).
- [204] A. F. DIAS, G. DERNICK, V. VALERO, M. G. YONG, C. D. JAMES, H. G. CRAIGHEAD et M. LINDAU. An electrochemical detector array to study cell biology on the nanoscale. *Nanotechnology*, **13**, 285 (2002).
- [205] I. HAFEZ, K. KISLER, K. BERBERIAN, G. DERNICK, V. VALERO, M. Y. YONG, H. G. CRAIGHEAD et M. LINDAU. Electrochemical imaging of fusion pore openings by electrochemical detector arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **39**, 13879 (2005).

- [206] T. M. PEARCE, J. A. WILSON, S. G. OAKES, S.-Y. CHIU et J. C. WILLIAMS. Integrated microelectrode array and microfluidics for temperature clamp of sensory neurons in culture. *Lab on a chip*, **5**, 97 (2005).
- [207] G. ZECH et P. FROMHERTZ. Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 10457 (2001).
- [208] R. M. WIGHTMAN, J. A. JANKOWSKI, R. T. KENNEDY, K. T. KAWAGOE, T. J. SCHROEDER, D. J. LESZCZYNSZYN, J. A. NEAR, E. J. DILIBERTO JR et O. H. VIVEROS. Temporally Resolved Catecholamine Spikes Correspond to Single Vesicle Release from Individual Chromaffin Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**, 10754 (1991).
- [209] T. J. SCHROEDER, J. A. JANKOWSKI, K. T. KAWAGOE, R. M. WIGHTMAN, C LEFROU et C. AMATORE. Analysis of diffusional broadening of vesicular packets of catecholamines released from biological cells during exocytosis. *Analytical Chemistry*, **64**, 3077 (1992).
- [210] P. BLOUNT, S. I. SUKHAREV, P. C. MOE, B. MARTINAC, et C. KUNG.
- [211] G. Alvarez de TOLEDO, R. FERNÁNDEZ-CHACÓN et J. M. FERNÁNDEZ. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*, **363**, 554 (1993).
- [212] A. CHANTURIYA, L. V. CHERNOMORDIK et J. ZIMMERBERG. Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 14423 (1997).
- [213] E. V. MOSHAROV, L.-W. GONG, B. KHANNA, D. SULZER et M. LINDAU. Intracellular Patch Electrochemistry : Regulation of Cytosolic Catecholamines in Chromaffin Cells. *Journal of Neuroscience*, **23**, 5835 (2003).
- [214] J. A. STEYER, H. HORSTMANN et W. ALMERS. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Public Library of Science Biology*, **388**, 474 (1997).
- [215] García A. G. von RÜDEN, L. and et M. G. LÓPEZ. The mechanism of Ba<sup>2+</sup> -induced exocytosis from single chromaffin cells. *FEBS Letters*, **336**, 48 (1999).
- [216] C. AMATORE, S. ARBAULT, F. LEMAÎTRE et Y. VERCHIER. Comparison of apex and bottom secretion efficiency at chromaffin cells as measured by amperometry. *Biophysical Chemistry*, **127**, 165 (2007).
- [217] D. PERRAIS, I. C. KLEPPE, J. W. TARASKA et W. ALMERS. Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology*, **560**, 413 (2004).
- [218] S. ARBAULT, P. PANTANO, J. A. JANKOWSKI, M. VUILLAUME et C. AMATORE. Monitoring an oxidative stress mechanism at a single human fibroblast. *Analytical Chemistry*, **67**, 3382 (1995).
- [219] C. AMATORE, S. ARBAULT, Y. CHEN, C. CROZATIER et I. TAPSOBA. Electrochemical detection in a microfluidic device of oxidative stress generated by macrophage cells. *Lab on a Chip*, **7**, 233 (2007).
- [220] A. TAKAHASHI, P. CAMACHO, J. D. LECHLEITER et B. HERMAN. Measurement of Intracellular Calciums. *Physiological Reviews*, **79**, 1089 (1999).

- [221] S. ARBAULT, N. SOJIC, D. BRUCE, C. AMATORE, A. SARASIN et M. VUILLAUME. Oxidative stress in cancer prone xeroderma pigmentosum fibroblasts. Real-time and single cell monitoring of superoxide and nitric oxide production with microelectrodes. *Carcinogenesis*, **25**, 509 (2004).
- [222] Lima E. A. WERDICH, A. A. and, B. IVANOV, I. GES, M. E. ANDERSON, J. P. WIKSWO et F. J. BAUDENBACHER. A microfluidic device to confine a single cardiac myocyte in a sub-nanoliter volume on planar microelectrodes for extracellular potential recordings. *Lab on a Chip*, **4**, 357 (2004).
- [223] G. VOSKERICIAN, M. S. SHIVE, R. S. SHAWGO, H. von RECUM, J. M. ANDERSON, M. J. CIMA et R. LANGER. Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices. *Biomaterials*, **24**, 1959 (2003).
- [224] J. GUSTAVSSON, G. ATLANOV, A. ERRACHID, J. SAMITIER, J. A. PLANELL et E. ENGEL. Modulation of Biological Properties of Silicon Nitride for Biosensor Applications by Self-Assembled Monolayers. *Advances in Science and Technology*, **53**, 122 (2006).
- [225] J. XUE, X. YING, J. CHEN, Y. XIAN et L. JIN. Amperometric Ultramicrosensors for Peroxynitrite Detection and Its Application toward Single Myocardial Cells. *Analytical Chemistry*, **72**, 5313 (2000).
- [226] M. E. SANDISON, N. ANICET, A. GLIDLE et J. M. COOPER. Optimization of the Geometry and Porosity of Microelectrode Arrays for Sensor Design. *Analytical Chemistry*, **74**, 5717 (2002).
- [227] N. SOJIC. Ultramicroélectrodes et détection de flux chimiques impliquant des femtomoles. Thèse de doctorat, Université Denis Diderot (Paris 6), 1997.
- [228] J. C. HOOGVLIET, J. M. REIJN et W. P. van BENNEKOM. Multichannel Amperometric Detection System for Liquid Chromatography and Flow Injection Analysis. *Analytical Chemistry*, **63**, 2418 (1991).
- [229] D. ROSTON et P. T. KISSINGER. Series Dual-Electrode Detector for Liquid Chromatography/Electrochemistry. *Analytical Chemistry*, **54**, 429 (1982).
- [230] R. S. MARTIN, A. J. GAWRON, S. M. LUNTE et C. S. HENRY. Dual-Electrode Electrochemical Detection for Poly(dimethylsiloxane)-Fabricated Capillary Electrophoresis Microchips. *Analytical Chemistry*, **72**, 3196 (2000).
- [231] D. JUNCKER, H. SCHMID, A. BERNARD, I. CAELEN, B. MICHEL, N. DE ROOIJ et E. DELAMARCHE. Soft and rigid two-level microfluidic networks for patterning surfaces. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **18**, 532 (2001).
- [232] M. LE BERRE, J. SHI, C. CROZATIER, G. VELVE CASQUILLAS et Y. CHEN. Micro-aspiration assisted lithography. *Microelectronic Engineering*, **84**, 864 (2007).

## Résumé

Les systèmes d'analyse miniaturisés sont particulièrement adaptés pour les analyses de cellules en faible nombre ou de cellules isolées. Une telle diminution du volume d'analyse permet une augmentation de la concentration locale et par conséquent une augmentation de la sensibilité des mesures effectuées. Les travaux présentés dans cette thèse se positionnent dans ce cadre en proposant un outil analytique novateur, couplant le contrôle dynamique des micro-environnements de la cellule par la microfluidique et l'analyse instantanée et locale des espèces en solution par l'électrochimie.

Grâce au développement d'outils modulables de culture cellulaire et de manipulation de cellules vivantes dans des dispositifs microfluidiques, nous avons mis en place le contrôle dynamique stable de stimulations chimiques sur une population de cellules souches mésenchymateuses (CSM) en culture et poursuivons cette étude dans le but d'induire la réactivité cellulaire des CSM vers la voie de différenciation neuronale.

Le développement d'un microsystème intégré de détection électrochimique du stress oxydant sur cellules uniques est mis en œuvre à travers la réalisation d'un dispositif microfluidique consistant en un réseau de chambres de mesures, contenant des microélectrodes fonctionnelles, et permettant d'isoler des macrophages uniques et de les maintenir en survie pendant plusieurs dizaines de minutes, durée suffisante pour réaliser nos mesures électrochimiques. En faisant varier les conditions de mesure, comme le nombre de cellules sondées dans le même micro-environnement, la nature du stimulus ou la présence ou non de communication cellulaire avec une population voisine, nous posons les bases d'une analyse originale jamais réalisée jusqu'à présent.

## Summary

For the analytical study of single cells or small groups of cells, it is of the utmost importance to reduce the sample volume and therefore to increase both the local concentration of the analytes and the sensitivity of the measurements. Micro-analytical systems are particularly relevant for such purposes. This thesis presents a novel analytical tool, coupling the dynamic control of micro-environments with microfluidics and the instant and local analysis of electroactive molecules with electrochemistry.

With the development of convenient microfluidic cell culture tools and cell manipulation schemes, we have set up a stable and long-term dynamic control of chemical stimulations on a population of Mesenchymal Stem Cells (MSC). We are striving towards the induction of MSC's biological reactivity into the neuronal differentiation pathway.

To demonstrate an on-chip electrochemical detection of oxidative stress on single cells, we have fabricated a sophisticated microsystem with an array of detection chambers, each addressed by a microelectrode, and in which macrophage cells can be trapped and maintained alive throughout the detection time. By varying the detection conditions, the number of cells investigated in the same micro-environment, the type of stimulations or the degree of intercellular communications between the objects investigated, we are establishing the building blocks for an unparalleled analytical study that has yet to be realized.