



HAL
open science

Méthodes analytiques pour la détection de phénomènes biologiques de sécrétion à l'échelle de la cellule unique.

Anne Meunier

► **To cite this version:**

Anne Meunier. Méthodes analytiques pour la détection de phénomènes biologiques de sécrétion à l'échelle de la cellule unique.. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT: . tel-00858915

HAL Id: tel-00858915

<https://theses.hal.science/tel-00858915>

Submitted on 9 Sep 2013

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.



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

PHYSICO-CHIMIE ANALYTIQUE

(Ecole Doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris-Centre – ED 388)

Présentée par

Mlle Anne MEUNIER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Méthodes analytiques pour la détection de phénomènes biologiques de sécrétion à l'échelle de la cellule unique.

Soutenue le 23.09.2011

Devant le jury composé de :

M. Fethi BEDIQUI	Rapporteur
M. Alain WALCARIUS	Rapporteur
M. Didier DEVILLIERS	Examineur
M. Stéphane MARINESCO	Examineur
M. Christian AMATORE	Directeur de thèse
M. Frédéric LEMAITRE	Co-encadrant
Mme Manon GUILLE-COLLIGNON	Co-encadrant

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

PHYSICO-CHIMIE ANALYTIQUE

(Ecole Doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris-Centre – ED 388)

Présentée par

Mlle Anne MEUNIER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Méthodes analytiques pour la détection de phénomènes biologiques de sécrétion à l'échelle de la cellule unique.

Soutenue le 23.09.2011

Devant le jury composé de :

M. Fethi BEDIQUI	Rapporteur
M. Alain WALCARIUS	Rapporteur
M. Didier DEVILLIERS	Examineur
M. Stéphane MARINESCO	Examineur
M. Christian AMATORE	Directeur de thèse
M. Frédéric LEMAITRE	Co-encadrant
Mme Manon GUILLE-COLIGNON	Co-encadrant

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du laboratoire « Activation Moléculaire et Réactivités Electrochimiques » à l'École Normale Supérieure de Paris. Je souhaite donc remercier Christian Amatore, mon directeur de thèse, tout d'abord pour m'avoir accueillie dans son équipe, mais également pour ses nombreux conseils, remarques scientifiques et pour avoir partagé son amour de la science comme il le fait si bien.

Je tiens ensuite à remercier Messieurs Fethi Bedioui et Alain Walcarius pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Messieurs Didier Devilliers et Stéphane Marinesco pour accepter de prendre part à l'évaluation de ce travail.

Je voudrais ensuite remercier Frédéric Lemaître et Manon Guille-Collignon pour m'avoir encadrée pendant ces trois dernières années. Merci pour tous leurs conseils, leurs encouragements, leur gentillesse et leur disponibilité au quotidien. Un grand merci aussi en particulier pour ces derniers mois pour la correction et les relectures de ma thèse. Enfin, merci pour leur soutien et la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je tiens également à remercier Stéphane Arbault, actuellement à l'Institut des Sciences Moléculaires de l'université de Bordeaux mais qui, pendant la première année de ma thèse était présent et disponible.

J'exprime aussi toute ma reconnaissance à Alaric Koh, en fin de thèse quand j'ai débuté la mienne. Merci de m'avoir initiée aux nombreuses techniques du laboratoire malgré son emploi du temps de troisième année très chargé. Je pense en particulier à la fabrication longue, et on peut le dire, un peu fastidieuse, des ultramicroélectrodes. Ce travail, bien qu'un peu lassant est alors devenu très supportable grâce à l'aide d'Alaric, Cong, Marine ou PierLuca...

La nature interdisciplinaire de ce travail a impliqué plusieurs collaborations. Tout d'abord, je voudrais remercier François Darchen et son équipe qui nous ont ouvert les portes de leur laboratoire à l'IBPC pour les manipulations de couplage ampérométrie/TIRFM. Un grand merci à Marine Bretou pour son initiation et ses précieux conseils quant à la patience à avoir lors de manipulations biologiques. Merci également à Isabelle Fanget et Ouardane Jouanot pour leur persévérance et leur aide face aux divers problèmes techniques et/ou biologiques que nous avons rencontrés.

Je voudrais également remercier l'équipe de Yong Chen, et en particulier Zhou Xiongtu (Christophe) et Lei Lei pour avoir été très accueillants dans leur salle blanche et pour avoir répondu avec patience à mes nombreuses questions. Merci aussi à Rémy Fulcrand avec qui nous avons arpenté différentes salles blanches du 5^{ème} arrondissement et avec qui j'ai pu apprendre beaucoup sur la microfabrication.

Je voulais également remercier tous ceux dont le parcours plus « biologique » que le mien ont su revenir sur les bases pour m'expliquer les notions élémentaires de la biologie cellulaire et m'apprendre la manipulation de cellules : Claire Giroux, Sara Sebbai...

Enfin, merci à tous ceux qui de près ou de loin, ont participé à la réalisation de cette thèse : les permanents, les doctorants, post-docs ou stagiaires que j'ai côtoyés ces dernières années. Je pense en particulier à Anne-Sophie, Célia, Elise, Gaétan, Guillaume, Gregory, Ludovic, Philippe, et j'en passe, avec qui j'ai partagé ma vie de « thésarde », congrès, discussions de couloirs, pauses café, ou encore quelques verres, ... Grâce à leur bonne humeur générale et leur enthousiasme, le laboratoire a toujours été un endroit agréable où j'ai eu plaisir à travailler.

Table des matières

Table des matières	p.1
Liste des abréviations	p.5
Liste des figures	p.6
Liste des tableaux	p.10

Introduction générale	p.11
-----------------------	------

PARTIE A : Utilisation des ultramicroélectrodes pour la détection de molécules libérées par une cellule vivante

I. <u>Généralités</u>	p.19
II. <u>Propriétés des interfaces chargées et des méthodes faradiques, inconvénients des électrodes usuelles</u>	p.20
II.I. Courant faradique	p.20
II.II. Processus non faradiques	p.21
II.III. La chute ohmique	p.23
II.IV. Bilan	p.23
III. <u>Propriétés des ultramicroélectrodes</u>	p.24
III.I. Régime de diffusion d'une UME	p.24
III.II. Effets sur la constante de temps, la chute ohmique et le rapport signal sur bruit	p.27
III.II.1. Cas d'une ultramicroélectrode sphérique	p.27
III.II.2. Cas d'une ultramicroélectrode de type disque	p.29
III.II.3. Cas d'une ultramicroélectrode de type bande	p.29
III.III. Bilan	p.29
IV. <u>Détection de biomolécules électroactives libérées par une cellule unique : configuration synapse « semi-artificielle »</u>	p.31
IV.I. Synapse chimique	p.31
IV.II. Synapse « semi-artificielle »	p.33
IV.III. L'exocytose vésiculaire : nature des signaux et objectifs	p.35
IV.IV. Le stress oxydant : nature des signaux et objectifs	p.36
IV.IV.1. Stimulation mécanique	p.38
IV.IV.2. Stimulation biochimique	p.39
IV.V. Conclusion	p.40

PARTIE B : Mise au point du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie de fluorescence pour l'étude de l'exocytose

I. <u>L'exocytose vésiculaire</u>	p.43
I.I. Mécanisme de l'exocytose	p.43
I.I.1. Généralités	p.43
I.I.2. Biogénèse et maturation des granules de sécrétion	p.44
I.I.3. Migration des granules de sécrétion vers la membrane plasmique	p.45
I.I.4. Accrochage des granules de sécrétion à la membrane plasmique	p.45
I.I.5. Fusion membranaire	p.47
I.II. Techniques analytiques utilisées : avantages et inconvénients	p.50
I.II.1. Technique électrophysiologique : le patch-clamp	p.51
I.II.2. L'ampérométrie	p.56
I.II.3. La microscopie optique	p.72
I.III. Originalité et intérêt de l'approche couplée	p.79
II. <u>Développement des dispositifs pour le couplage</u>	p.80
II.I. Contraintes expérimentales	p.80
II.II. Evolution et procédé de fabrication des dispositifs de couplage	p.82
II.II.1. Preuve de concept et premiers dispositifs	p.82
II.II.2. Evolution des dispositifs	p.84
II.III. Caractérisation électrochimique des dispositifs	p.88
II.III.1. Etude de l'influence du dépôt de collagène sur la détection électrochimique	p.89
II.III.2. Influence de la concentration de collagène	p.91
II.III.3. Influence de la vitesse de balayage	p.94
II.III.4. Comparaison de la vitesse de transfert électronique sur carbone et ITO	p.97
III. <u>Choix d'un modèle cellulaire adéquat pour le couplage TIRFM/ampérométrie</u>	p.99
III.I. Systèmes biologiques permettant l'étude de l'exocytose : intérêts et limites	p.99
III.I.1. Les neurones	p.100
III.I.2. Les cellules hématopoïétiques	p.100
III.I.3. Les cellules endocrines	p.101
III.II. Etude ampérométrique des cellules BON	p.104
III.II.1. N13 et BC21 sans modification (ni transfection ni chargement)	p.105
III.II.2. N13 et BC21 non transfectées	p.106
III.II.3. N13 et BC21 transfectées VMAT1	p.109
III.II.4. N13 et BC21 électroporées en présence de sérotonine (N13/5-HT ; BC21/5-HT)	p.111
III.II.5. BC21 électroporées en présence de sérotonine sur électrode d'ITO	p.114
III.III. Rôle du modèle cellulaire pour le couplage : problématique du pH dans la bande cellule/électrode	p.117
III.III.1. Généralités	p.117
III.III.2. Modélisation du pH : le cas des cellules chromaffines	p.118
III.III.3. Modélisation du pH : le cas des cellules BON	p.126
IV. <u>Fonctionnement des dispositifs de couplage</u>	p.130
IV.I. Conditions expérimentales	p.130
IV.II. Démonstration de la faisabilité du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie TIRF	p.133
IV.III.1. Analyse d'événements couplés	p.133
IV.III.2. Analyse des pics ampérométriques obtenus lors du couplage	p.136

IV.III. Couplage TIRFM/ampérométrie : conclusions des études sur cellules BON BC21	p.137
IV.III.1. Le couplage est-il viable pour d'autres modèles cellulaires que les BON ?	p.137
IV.III.2. Mise en regard de ce travail par rapport à la littérature	p.140
V. <u>Conclusions et perspectives</u>	p.141

PARTIE C : Mise au point d'un microsystème pour la mesure du stress oxydant

I. <u>Le stress oxydant cellulaire</u>	p.145
I.I. Production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS)	p.146
I.I.1. Les NADPH oxydases et l'anion superoxyde	p.146
I.I.2. Les NO synthases et le monoxyde d'azote	p.147
I.I.3. Réactions chimiques menant à la formation de ROS/RNS	p.148
I.II. Effets bénéfiques, néfastes, et régulation des ROS/RNS	p.150
I.II.1. Effets bénéfiques	p.150
I.II.2. Effets néfastes	p.152
I.II.3. Régulation des ROS/RNS	p.154
I.III. Etat de l'art de la détection des ROS/RNS	p.157
I.III.1. Détection des ROS/NOS par chimiluminescence	p.157
I.III.2. Détection des ROS/NOS par fluorescence	p.158
I.III.3. Détection des ROS/NOS par réaction avec des biomolécules	p.159
I.III.4. Détection des ROS/NOS par réaction de Griess	p.160
I.III.5. Détection des ROS/NOS par résonance de spin électronique (RSE)	p.161
I.III.6. Conclusion	p.162
I.IV. Détection électrochimique des ROS/RNS : principes et limites	p.162
I.IV.1. Détection électrochimique des ROS/RNS	p.162
I.IV.2. Détection des ROS/RNS par ampérométrie à potentiel constant	p.171
II. <u>Améliorations de la mesure par microélectrode de carbone platinée sur cellule unique</u>	p.177
II.I. Détection par chronoampérométrie à triple saut de potentiel des ROS/RNS produites par un macrophage immunostimulé	p.178
II.II. Intérêt des microsystèmes pour l'étude du stress oxydant	p.181
III. <u>Fabrication des microsystèmes</u>	p.182
III.I. Contraintes expérimentales	p.182
III.II. Procédé de fabrication des dispositifs	p.183
III.II.1. Preuve de concept et premiers dispositifs : historique	p.183
III.II.2. Evolution des dispositifs : but de cette thèse	p.185
III.III. Caractérisation électrochimique des dispositifs	p.190
III.III.1. Caractérisation de l'électrode de travail	p.190
III.III.2. Choix des potentiels de mesure	p.193
III.IV. <u>Fonctionnement du dispositif</u>	p.194
III.V. <u>Conclusions et perspectives</u>	p.197
Conclusion générale et Perspectives	p.199

<u>I. Fabrication des électrodes et des microsystèmes pour l'étude de l'exocytose et du stress oxydant</u>	p.207
I.I. Fabrication des ultramicroélectrodes à fibre de carbone	p.207
I.I.1. Isolement de la fibre de carbone	p.207
I.I.2. Insertion de la fibre isolée dans un capillaire de verre	p.208
I.I.3. Fabrication de l'ultramicroélectrode de carbone	p.208
I.I.4. Isolation électrique des fibres de carbone	p.209
I.I.5. Polissage de la fibre de carbone	p.210
I.I.6. Platination de la surface active	p.211
I.II. Fabrication des dispositifs pour la détection couplée du mécanisme d'exocytose	p.212
I.II.1. Préparation du substrat	p.212
I.II.2. Création des électrodes	p.212
I.II.3. Isolation électrique des électrodes	p.213
I.II.4. Connexion électrique des électrodes	p.214
I.II.5. Traitement du dispositif	p.215
I.III. Fabrication des microsystèmes pour l'étude du stress oxydant	p.215
I.III.1. Création des électrodes	p.215
I.III.2. Chloration des électrodes de référence	p.218
I.III.3. Connexion électrique des électrodes	p.218
I.III.4. Préparation des canalisations	p.218
<u>II. Techniques analytiques utilisées pour l'étude de systèmes biologiques</u>	p.220
II.I. Techniques électrochimiques	p.220
II.I.1. La voltammétrie	p.220
II.I.2. L'ampérométrie à potentiel constant	p.221
II.I.3. Les électrodes de référence	p.223
II.II. Technique optique : la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente (TIRFM)	p.224
II.III. Mesure de l'exocytose	p.225
II.III.1. Détection de la sérotonine lors de l'exocytose des cellules BON par ampérométrie sur UME de carbone	p.225
II.III.2. Etude de l'exocytose des cellules BON par le couplage de l'ampérométrie sur UME d'ITO et de la microscopie TIRF	p.227
II.IV. Mesures du stress oxydant dans un microsysteme	p.229
<u>III. Culture cellulaire et préparation des solutions</u>	p.229
III.I. Culture cellulaire	p.229
III.I.1. Culture des cellules BON	p.229
III.I.2. Culture des macrophages RAW 264.7	p.230
III.I.3. Congélation et décongélation des cellules	p.231
III.II. Solutions et Milieux de cultures	p.231
III.II.1. Milieux de culture des cellules BON	p.231
III.II.2. Milieu de culture des macrophages	p.232
III.II.3. Tampons physiologiques	p.232
III.II.4. Solutions utilisées lors des expériences <i>in vitro</i>	p.233
III.II.5. Solutions de stimulation	p.233
Références bibliographiques	p.235

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

ATP : Adénosine triphosphate

cGMP : Guanilate monophosphate cyclique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

DsRed : Discosoma red fluorescent protein

ECSS : Electrode au calomel saturé en sodium

EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique

eGFP : Enhanced green fluorescent protein

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GFP : Green fluorescent protein

GTP : Guanosine triphosphate

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion disulfure

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

IFN- γ : Interféron- γ

ITO : Indium Tin oxide, Oxyde d'indium dopé à l'étain

LPC : Lysophosphatidylcholine

LPS : Lipopolysaccharide

mRFP : Monometric red fluorescent protein

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate réduit

NFS : N-ethylmaleimide-sensitive factor

NO[•] : Monoxyde d'azote

NO₂⁻ : Anion nitrite

NPY : Neuropeptide Y

ONOO⁻ : Peroxynitrite

PBS : Phosphate buffered saline, tampon phosphate salin

PC12 : Pheochromocytoma 12, lignée de cellules chromaffines

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PGMEA : Propylene glycol methyl ether acetate, Acétate de 2-méthoxy-1-méthyléthyle

PHGPx : Phospholipides-hydroperoxyde glutathion peroxydase

PMA : Phorbol 12-myristate-13-acétate

RNS : Reactive nitrogen species, espèces réactives de l'azote

ROS : Reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène

SNAP 25 : Synaptosomal associated protein of 25 kDa

SNARE : Soluble NFS attachment protein receptor

SOD : Superoxyde dismutase

TIRF : Total internal reflexion fluorescence

TMCS : Trimethylchlorosilane

TPMD : Tétraméthyl-p-phénylènediamine

UME : Ultramicroélectrode

VAMP-2 : Vesicle associated membrane protein

VMAT : Vesicular monoamine transporter

Liste des figures

Figure A-1 : Double couche électrochimique à l'interface électrode/solution lors de l'application d'un potentiel positif à l'électrode.	p.22
Figure A-2 : Schéma électrique d'une cellule électrochimique.	p.23
Figure A-3 : Schéma des couches de diffusion pour des électrodes millimétriques et des ultramicroélectrodes de type disque et sphère.	p.25
Figure A-4 : Schéma d'une synapse chimique entre deux neurones.	p.32
Figure A-5 : Schéma de la configuration synapse « semi-artificielle ».	p.33
Figure A-6 : Dispositif expérimental dans une cage de Faraday et position des électrodes.	p.35
Figure A-7 : Oxydation biélectronique de la sérotonine.	p.36
Figure A-8 : Ampérogramme d'une cellule BON (stimulation pendant 30 secondes par de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) obtenu avec une UME de carbone $10 \mu\text{m}$ de diamètre polarisée à $+650 \text{ mV vs Ag/AgCl}$.	p.36
Figure A-9 : Dispositif expérimental dans une cage de Faraday et position des électrodes.	p.37
Figure A-10 : Photo en microscopie électronique à balayage d'une UME de carbone ($\varnothing = 10 \mu\text{m}$) platiné.	p.37
Figure A-11 : Pic ampérométrique correspondant à la libération des ROS/RNS lors du stress oxydant.	p.38
Figure A-12 : Exemples de réponses ampérométriques obtenues sur UME de carbone platiné ($\varnothing = 10 \mu\text{m}$) suite à la stimulation biochimique (INF- γ /LPS) d'un macrophage RAW 264.7.	p.39
Figure B-1 : Biogénèse et maturation des granules de sécrétion.	p.44
Figure B-2 : Déplacement des granules de sécrétion le long des microtubules.	p.45
Figure B-3 : Modèle du cycle de fusion des vésicules synaptiques.	p.46
Figure B-4 : Association des protéines du complexe SNARE des vésicules synaptiques.	p.47
Figure B-5 : Formation du pore de fusion lipidique.	p.48
Figure B-6 : Formation du pore de fusion protéique.	p.49
Figure B-7 : Photographie en microscopie électronique à balayage d'un granule de cellule chromaffine à l'approche de la membrane cellulaire et lors de sa sécrétion.	p.50
Figure B-8 : Différentes configurations utilisées en patch clamp.	p.52
Figure B-9 : A gauche, mastocyte sécrétant de l'histamine. A droite, exemple de changement de capacité électrique membranaire résultant de la fusion d'un granule avec la membrane plasmique.	p.53
Figure B-10 : Exemple d'un signal ampérométrique.	p.57
Figure B-11 : Etapes successives de la libération du contenu vésiculaire.	p.58
Figure B-12 : Pic ampérométrique correspondant à la libération de molécules électroactives par une vésicule de sécrétion lors de l'exocytose et dont les caractéristiques (I_{max} , Q , t_1 , t_2 , $t_{1/2}$ et t_{20-90}) sont représentées graphiquement.	p.59
Figure B-13 : Représentation bimodale de la racine cubique de charge des pics ampérométriques obtenus lors de la sécrétion de cellules chromaffines de souris.	p.60
Figure B-14 : Image obtenue en microscopie à force atomique d'un dispositif électrochimique à quatre électrodes de platine.	p.62
Figure B-15 : Rôle de la synaptotagmine dans la fusion membranaire.	p.67
Figure B-16 : Pic ampérométrique présentant un pied.	p.69
Figure B-17 : Schéma des trois principaux types de pics ampérométriques.	p.70
Figure B-18 : Exemple d'image obtenue sur cellule BON BC21 en microscopie TIRF.	p.75
Figure B-19 : Les deux types de montages utilisés en microscopie TIRF.	p.76

Figure B-20 : Schéma de la section transversale du dispositif microfluidique pour le suivi combiné de l'exocytose par électrochimie et fluorescence.	p.81
Figure B-21 : Epaisseur de la couche d'ITO déposée sur la lamelle de verre, obtenue par profilométrie mécanique.	p.82
Figure B-22 : Schéma du dispositif de principe pour le couplage de l'ampérométrie et de la microscopie TIRF.	p.83
Figure B-23 : Photo en microscopie électronique à balayage de l'UME d'ITO.	p.83
Figure B-24 : Observation d'une cellule chromaffine déposée sur ITO et marquée avec de l'acridine orange en microscopie de fluorescence.	p.83
Figure B-25 : Détection ampérométrique de la sécrétion d'une cellule chromaffine stimulée par une solution de barium (2.10^{-3} mol.L ⁻¹) sur ITO (E = + 650 mV V vs Ag/AgCl).	p.83
Figure B-26 : Masque utilisé pour obtenir les motifs des électrodes d'ITO.	p.84
Figure B-27 : Première étape de la fabrication des dispositifs : création des électrodes d'ITO.	p.85
Figure B-28 : Deuxième étape de la fabrication des dispositifs : isolation d'une partie des électrodes.	p.85
Figure B-29 : Masque utilisé pour isoler partiellement les électrodes d'ITO.	p.86
Figure B-30 : Schéma du dispositif.	p.86
Figure B-31 : Photo en microscopie électronique à balayage du dispositif à quatre électrodes d'ITO.	p.86
Figure B-32 : Masques utilisés pour isoler partiellement les électrodes d'ITO ; Schémas et photos des dispositifs.	p.87
Figure B-33 : Dispositif de couplage collé à la boîte de Petri TIRFM.	p.87
Figure B-34 : Voltamogramme d'une solution de Locke x 1 obtenu sur électrodes d'ITO ; v = 20 mV.s ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.89
Figure B-35 : Voltamogramme d'une solution de sérotonine (C = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹) obtenu sur électrode d'ITO ; v = 20 mV.s ⁻¹ , référence Ag/AgCl.	p.90
Figure B-36 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur électrode d'ITO ; C _{Ru} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 20 mV.s ⁻¹ , référence Ag/AgCl, C _{collagène} = 5 µg.mL ⁻¹ .	p.91
Figure B-37 : Réduction du Ru (III) en Fe (II) sur électrode d'ITO ; C _{Fe} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 20 mV.s ⁻¹ , référence Ag/AgCl, C _{collagène} = 5 µg.mL ⁻¹ .	p.91
Figure B-38 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; C _{Ru} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 20 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 2,5 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.92
Figure B-39 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; C _{Fe} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 20 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 2,5 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.92
Figure B-40 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; C _{Ru} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 20 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 50 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.93
Figure B-41 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; C _{Fe} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 20 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 50 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.93
Figure B-42 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; C _{Ru} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 20 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 100 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.93
Figure B-43 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; C _{Fe} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 20 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 100 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.93
Figure B-44 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; C _{Ru} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 10 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 5 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.95
Figure B-45 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; C _{Fe} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 10 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 5 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.95
Figure B-46 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; C _{Ru} = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; v = 50 mV.s ⁻¹ ; C _{collagène} = 5 µg.mL ⁻¹ ; référence Ag/AgCl.	p.95

Figure B-47 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{\text{collagène}} = 5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.	p.95
Figure B-48 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{\text{collagène}} = 5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.	p.96
Figure B-49 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{\text{collagène}} = 5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.	p.96
Figure B-50 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 500 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{\text{collagène}} = 5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.	p.96
Figure B-51 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO, $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 500 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{\text{collagène}} = 5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.	p.96
Figure B-52 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur UME de carbone et bande d'ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$; référence Ag/AgCl.	p.98
Figure B-53 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur UME de carbone et bande d'ITO ; $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$; référence Ag/AgCl.	p.98
Figure B-54 : Cinétique des événements d'exocytose des N13 non modifiées.	p.105
Figure B-55 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 non modifiées.	p.105
Figure B-56 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 non modifiées.	p.105
Figure B-57 : Extrait d'un suivi ampérométrique de la sécrétion d'une cellule BON N13 ; incubation 24h avec $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sérotonine ; stimulation ionomycine ($C = 5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) pendant les 30 premières secondes ; électrode polarisée à + 650 mV vs Ag/AgCl.	p.106
Figure B-58 : Cinétique des événements d'exocytose des BC21 et N13.	p.107
Figure B-59 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21.	p.108
Figure B-60 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21.	p.109
Figure B-61 : Cinétique des événements d'exocytose des cellules BON BC21 et N13 transfectées avec VMAT1.	p.110
Figure B-62 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 transfectées avec VMAT1.	p.110
Figure B-63 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 transfectées avec VMAT1.	p.110
Figure B-64 : Cinétique des événements d'exocytose des cellules BON BC21 et N13 transfectées avec de la sérotonine.	p.112
Figure B-65 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 électroporées avec de la sérotonine.	p.113
Figure B-66 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 électroporées avec de la sérotonine.	p.113
Figure B-67 : Cinétique des événements d'exocytose des BC21/5-HT détectés sur électrodes de carbone et d'ITO.	p.114
Figure B-68 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON BC21/5-HT détectées sur électrodes de carbone et d'ITO.	p.116
Figure B-69 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON BC21/5-HT détectées sur électrodes de carbone et d'ITO.	p.116
Figure B-70 : Oxydation biélectronique de l'adrénaline.	p.118
Figure B-71 : Géométrie du système considéré dans les simulations basées sur l'émission de protons.	p.119
Figure B-72 : Représentation des trois évolutions possibles d'un proton généré électrochimiquement entre l'électrode et la membrane cellulaire.	p.119
Figure B-73 : Evolution du pH moyen pendant les 15 premières secondes de sécrétion dans la bande électrode/cellule.	p.121

Figure B-74 : Représentation spatiale du pH aux temps courts au sein de la bande électrode/cellule.	p.121
Figure B-75 : Evolution de la valeur du pH de relaxation pour différents rayons d'électrode.	p.122
Figure B-76 : Evolution du temps mis par le système à relaxer en fonction du rayon de l'électrode.	p.122
Figure B-77 : Evolution du temps mis par le système à relaxer en fonction de la fréquence de sécrétion.	p.123
Figure B-78 : Evolution du temps mis par le système à relaxer en fonction de la fréquence de sécrétion.	p.123
Figure B-79 : Evolution de la valeur du pH de relaxation pour différents rayons d'électrode.	p.125
Figure B-80 : Relation entre fréquence de sécrétion et pH stationnaire dans la bande cellule/électrode.	p.126
Figure B-81 : Evolution du pH moyen pendant les 10 premières secondes de sécrétion au sein de la bande électrode/cellule.	p.127
Figure B-82 : Zoom de la figure B-81 aux temps courts.	p.127
Figure B-83 : Evolution du pH moyen pendant les 3 premières secondes de sécrétion au sein de la bande électrode/cellule.	p.128
Figure B-84 : Représentation spatiale du pH au cours du temps au sein de la bande électrode/cellule.	p.129
Figure B-85 : Photo d'une électrode d'ITO partiellement isolée.	p.131
Figure B-86 : Bruit électrique des électrodes d'ITO en fonction de la surface de l'électrode.	p.132
Figure B-87 à B-90 : Exemples d'événement couplé.	p.134
Figure B-91 : Relation entre fréquence de sécrétion et pH stationnaire dans la bande cellule/électrode.	p.138
Figure B-92 : Relation entre fréquence de sécrétion et pH stationnaire dans la bande cellule/électrode.	p.139
Figure C-1 : Mécanisme de peroxydation lipidique.	p.153
Figure C-2 : Evolution de C/C^0 de l'anion superoxyde en fonction de la distance par rapport au point d'émission pour une réaction catalysée.	p.166
Figure C-3 : Electrode spécifique au NO^* de type Clark, présentée par K. Shibuki.	p.168
Figure C-4 : Comparaison du voltamogramme reconstruit à partir du flux maximal d'espèces détecté à différents potentiel et des voltamogrammes obtenus pour H_2O_2 ($1,4 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹), $ONOO^-$ ($1,7 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹), NO_2^- ($4 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹) et NO^* ($19 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹).	p.172
Figure C-5 : Voltamogrammes stationnaires normalisés des différentes espèces produites lors d'une réponse cellulaire de stress oxydant ou nitrant.	p.174
Figure C-6 : Courant mesuré en fonction du temps par une UME de carbone platiné lors de l'imposition successive de plusieurs sauts de potentiel.	p.178
Figure C-7 : Exemples d'ampérogrammes reconstitués pour $E = + 300$ mV ; + 450 mV et + 650 mV vs ECSS obtenus lors de la libération de ROS/RNS par un macrophage immunostimulé par $IFN-\gamma/LPS/PMA$ ou non.	p.180
Figure C-8 : Schéma du premier dispositif pour la détection du stress oxydant.	p.184
Figure C-9 : Réponse ampérométrique détectée à + 890 mV vs Ag/AgCl d'une population de macrophages (environ 20 cellules) déposé dans microsysteme et stimulés par une solution de calcium ionophore ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$).	p.185
Figure C-10 : Superposition des trois masques utilisés pour réaliser les dispositifs.	p.186
Figure C-11 : Masque utilisé pour fabriquer les électrodes de travail et auxiliaire en platine.	p.187
Figure C-12 : Première étape de la fabrication des dispositifs : motif des électrodes.	p.187
Figure C-13 : Schématisation du procédé de « lift-off ».	p.188
Figure C-14 : Masque utilisé pour fabriquer les électrodes de référence en argent.	p.188
Figure C-15 : Photo du dispositif final et zoom sur les électrodes dans le puits de PDMS utilisé pour les mesures.	p.189
Figure C-16 : Masque utilisé pour la fabrication du moule en SU8 pour obtenir les canalisations en PDMS.	p.189
Figure C-17 : Chambre microfluidique en PDMS contenant les trois électrodes.	p.190
Figure C-18 : Oxydation de H_2O_2 sur UME de platine platiné.	p.191

Figure C-19 : Oxydation de NO_2^- sur UME de platine.	p.191
Figure C-20 : Oxydation de H_2O_2 sur UME de platine nu.	p.191
Figure C-21 : Oxydation de NO_2^- sur UME de platine nu.	p.191
Figure C-22 : Superposition des voltammogrammes correspondants à l'oxydation de H_2O_2 et NO_2^- , seuls ou mélangés dans le PBS.	p.193
Figure C-23 : Détection ampérométrique à + 400 mV vs Ag/AgCl de la réponse de 200 à 300 macrophages stimulés avec du calcium ionophore ($2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).	p.196
Figure C-24 : Détection ampérométrique à + 850 mV vs Ag/AgCl de la réponse de 200 à 300 macrophages stimulés avec du calcium ionophore ($2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).	p.196
Figure D-1 : Bobine de fibres de carbone de diamètre 10 μm .	p.207
Figure D-2 : Microétreuse pendant l'étirage d'un capillaire contenant une fibre de carbone.	p.209
Figure D-3 : Photo en microscopie électronique à balayage d'une UME à fibre de carbone de ($\varnothing = 10 \mu\text{m}$).	p.210
Figure D-4 : Photo en microscopie électronique à balayage d'une UME à fibre de carbone platiné.	p.211
Figure D-5 : Création du motif des électrodes d'ITO : photolithographie et gravure chimique.	p.213
Figure D-6 : Isolation électrique d'une partie des électrodes d'ITO.	p.214
Figure D-7 : Schéma du dispositif de couplage.	p.215
Figure D-8 : Création du motif des électrodes par photolithographie.	p.216
Figure D-9 : Métallisation et « lift-off ».	p.217
Figure D-10 : Configuration finale d'un dispositif.	p.217
Figure D-11 : Préparation du moule en SU8 3050.	p.219
Figure D-12 : Préparation des canalisations en PDMS.	p.220
Figure D-13 : Schéma du montage expérimental utilisé lors des analyses en microscopie TIRF.	p.224

Liste des tableaux

Tableau A-1 : Caractéristiques analytiques des UME en fonction de leur géométrie.	p.30
Tableau B-1 : Gamme de concentrations du collagène.	p.92
Tableau B-2 : Comparaison des paramètres des pics ampérométriques obtenus lors de la sécrétion de mastocytes, de cellules chromaffines, de PC12 et de cellules β pancréatiques.	p.103
Tableau B-3 : Bruit électrique des électrodes d'ITO en fonction de la surface de l'électrode.	p.132
Tableau B-4 : Valeurs moyennes des paramètres caractéristiques des pics ampérométriques des événements couplés.	p.136
Tableau C-1 : Distance pour laquelle 50 % de l'anion superoxyde est décomposé par rapport à son point d'émission pour une réaction catalysée ou non.	p.167
Tableau D-I : Volumes des composants de la solution de polymérisation à prélever.	p.209
Tableau D-2 : Solutions étudiées in vitro ; concentration et tampon utilisé.	p.233

Introduction générale

Introduction générale

Les « ultramicroélectrodes » constituent une classe spécifique d'électrodes. Elles correspondent à des outils de géométries diverses (disque, sphère, bande...) mais dont au moins une de leurs dimensions caractéristiques est de l'ordre du micron ou inférieure. C'est justement cette spécificité qui, en rendant leurs propriétés physico-chimiques différentes de celles des électrodes millimétriques classiques, en font des instruments particuliers. Ainsi, elles sont caractérisées par une diminution de la chute ohmique, des constantes de temps (de l'ordre de la milliseconde) et l'existence d'un régime de diffusion stationnaire. L'apparition des ultramicroélectrodes a donc révolutionné l'électrochimie analytique en repoussant les limites des méthodes classiques et en ouvrant de nouveaux domaines d'application aux méthodes électrochimiques d'analyse.

Elles permettent par exemple d'étudier des milieux jusque-là inexplorés car trop résistants comme les solutions aqueuses très diluées. Leur temps de réponse exceptionnel permet l'analyse de cinétiques de réactions extrêmement rapides. Leur excellente résolution spatiale, comparable à leur taille, permet de détecter localement des quantités infinitésimales de molécules électroactives. Cette détection est rendue possible dès lors que ces espèces sont libérées dans des volumes très restreints. L'utilisation des ultramicroélectrodes a alors pu être élargie au monde du vivant et en particulier aux études à l'échelle de la cellule unique. Dans ces conditions, la faible distance qui sépare la cellule (émetteur) et l'électrode (collecteur) permet la concentration des espèces libérées. Ainsi, la libération de quelques milliers de molécules dans un volume de l'ordre du femtolitre conduit à des concentrations de quelques $\mu\text{mol.L}^{-1}$, aisément détectables par électrochimie. Il est alors possible de suivre en temps réel la libération de molécules électroactives par une cellule unique vivante, généralement sous forme d'un courant d'oxydation avec un rapport signal sur bruit élevé.

Les ultramicroélectrodes constituent donc des outils de choix pour l'étude de mécanismes biologiques de sécrétion à l'échelle de la cellule unique. C'est dans cette thématique que s'ancrent les travaux présentés dans ce manuscrit. Dans le cadre de cette thèse, cette technique analytique a été adaptée ou complétée en fonction du phénomène étudié, à savoir l'exocytose et le stress oxydant.

Le **premier chapitre** de ce manuscrit (*Partie A : Utilisation des ultramicroélectrodes pour la détection de molécules libérées par une cellule unique*) a été consacré à la présentation des propriétés fondamentales de ces outils, leur utilisation pour l'application des mécanismes biologiques étudiés ainsi que la nature des signaux détectés. Les deux chapitres suivants seront dévolus aux deux thématiques biologiques étudiées et seront détaillées par la suite. Dans l'optique d'une future utilisation de ce manuscrit par des doctorants pour poursuivre les travaux présentés, ces deux chapitres débiteront par une partie détaillée expliquant les mécanismes respectifs mis en jeu dans les processus biologiques étudiés et présentant un état de l'art des différentes détections mises en place pour leur étude.

Le **deuxième chapitre** de ce manuscrit (*Partie B : Mise au point du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie de fluorescence pour l'étude de l'exocytose*) concerne l'étude du phénomène d'exocytose, mécanisme fondamental impliqué dans la communication cellulaire (neurotransmission). Son principe repose sur la fusion d'organites cellulaires (vésicules) contenant des molécules informatives (neurotransmetteurs ou hormones), avec la membrane cellulaire afin de libérer leur contenu dans la fente synaptique ou dans le flux sanguin. La première partie de ce chapitre décrira le phénomène d'exocytose ainsi que les principales techniques analytiques utilisées pour l'étudier. L'utilisation d'une ultramicroélectrode, placée au contact de la membrane d'une cellule unique permet la détection en temps réel des molécules libérées au cours du mécanisme et donc de caractériser la sécrétion d'une cellule d'un point de vue cinétique et quantitatif. Cependant, à elle seule, l'électrochimie ne peut répondre à toutes les questions inhérentes à ce domaine de la biologie. Nous avons donc choisi, dans le cadre de cette thèse, de compléter les informations apportées par l'ampérométrie par l'intermédiaire d'un couplage avec la microscopie optique (microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente) qui permet, quant à elle, de visualiser les vésicules avant la libération proprement dite. Afin de répondre aux exigences des deux techniques analytiques, impliquant une détection de l'exocytose au même pôle de la cellule, nous avons développé, par des procédés de microtechnologie (photolithographie, gravure, métallisation), un microsystème constitué de quatre électrodes d'ITO (transparent et conducteur en couche mince) sur lesquelles les cellules étudiées sont déposées. Par ailleurs, le modèle cellulaire doit également répondre à des contraintes analytiques : les cellules doivent être visibles en microscopie TIRF (vésicules fluorescentes) et libérer des molécules détectables en électrochimie (molécules électroactives). Après une étude ampérométrique détaillée, présentée dans la partie suivante, nous avons choisi de travailler avec le clone BC21 de la lignée des cellules BON (cellules entérochromaffines). Enfin, les résultats expérimentaux, permettant de suivre, pour la première fois à notre connaissance, un événement exocytotique dans sa globalité avec les deux techniques couplées, seront présentés dans la dernière partie.

Le **troisième chapitre** de ce manuscrit (*Partie C : Mise au point d'un microsysteme pour la mesure du stress oxydant*) porte sur l'étude du phénomène de stress oxydant, un mécanisme par lequel les cellules, en produisant des espèces dites réactives de l'oxygène et de l'azote, se défendent contre une agression externe ou attaquent d'autres cellules. La présentation générale du mécanisme, son origine, ses effets, sa régulation et les différentes techniques utilisées pour la détection des espèces impliquées seront détaillées dans la première partie de ce chapitre. Grâce à leur très bonne sensibilité et à leur excellente résolution temporelle les ultramicroélectrodes permettent la détection en temps réel des espèces libérées par une cellule unique. La technique utilisée au laboratoire, l'ampérométrie à potentiel constant permet de détecter les espèces produites (H_2O_2 , $ONOO^-$, NO^\bullet , NO_2^-) par un macrophage, cellule du système immunitaire, et de quantifier leur participation respective à la réponse en fixant le potentiel d'une ultramicroélectrode de carbone platiné à + 300, + 450, + 650 et + 850 mV vs ECSS. En contrepartie, cette méthode, de par la forte variabilité cellulaire et les éventuelles différences de sensibilité des électrodes utilisées nécessite un nombre considérable de mesures et donc un temps d'expérience colossal. La deuxième partie de ce chapitre présente alors les différentes stratégies envisagées pour pallier ces inconvénients. La chronoampérométrie à saut de potentiel présente l'avantage de permettre les mesures aux quatre potentiels sur une même cellule avec la même ultramicroélectrode et donc la comparaison directe de la production de ROS/RNS sans tenir compte des variations cellulaire ou expérimentales. Cependant, sa faible résolution temporelle limite la visualisation des variations de production au cours du temps. Nous avons alors choisi d'élaborer un microsysteme intégré permettant la mesure simultanée des différentes espèces libérées. Ces dispositifs, constitués de quatre chambres de mesures contenant chacune trois électrodes (travail et auxiliaire en platine et référence en argent chloruré), permettent de mesurer la production des quatre espèces étudiées en fixant le potentiel de chaque chambre de mesure au potentiel adéquat. Ainsi, quatre mesures simultanées peuvent être réalisées. La troisième partie de ce chapitre est alors consacrée au développement technique de ces microsystemes. Enfin, la dernière partie présente leur caractérisation et les premiers résultats expérimentaux obtenus sur cellule (macrophage murin RAW 264.7).

Enfin, le **dernier chapitre** (*Partie D : Partie Expérimentale*) rassemble les différents protocoles expérimentaux et détaille les développements techniques utilisés dans le cadre de cette thèse.

Partie A

**Utilisation des ultramicroélectrodes pour la détection de
molécules libérées par une cellule unique**

PARTIE A : Utilisation des ultramicroélectrodes pour la détection de molécules libérées par une cellule unique

I. Généralités

Les études présentées dans ce manuscrit reposent en partie sur l'utilisation d'ultramicroélectrodes (UME) pour la détection de flux d'espèces émis par une cellule unique. La compatibilité des dimensions (rayon de l'ordre de quelques microns) entre la cellule et une ultramicroélectrode est un point clé dans ce type d'investigations. Cependant, ne considérer les ultramicroélectrodes que pour leur taille n'est pas correct. C'est pourquoi ce chapitre sera dévolu à la présentation des propriétés particulières des ultramicroélectrodes qui ne découlent qu'indirectement de leurs dimensions.

Les termes « microélectrode » et « ultramicroélectrode », respectivement introduits dans les années 40 et 70-80, peuvent rester encore ambigus aujourd'hui. A cet égard, ils sont souvent confondus alors qu'ils peuvent dépendre du domaine d'étude. Ainsi, en électrochimie dite analytique, les électrodes de taille millimétrique représentent les outils de mesure usuels. Dans ce contexte, les « microélectrodes » sont des électrodes de dimensions micrométriques ou inférieures. Une telle classification, simplement basée sur la surface des électrodes, ne semble pas distinguer « microélectrode » et « ultramicroélectrode », et ne rend pas compte de leurs propriétés particulières.

Le domaine de l'électrochimie moléculaire, quant à lui, repose sur deux types d'expériences distinctes. Le premier type, analytique, n'affecte pas les concentrations en espèces électroactives au sein de la solution. L'électrode de travail n'y intervient alors qu'en tant que sonde. Le second, préparatif, implique la consommation des espèces en solution par électrolyse. Une manière de scinder ces deux cas repose sur la comparaison de l'aire A de l'électrode et du volume V de la solution. Dans cette classification, les électrodes utilisées en électrolyse doivent correspondre à un rapport A/V le plus grand possible afin de minimiser la durée de l'expérience. Pour atteindre ces conditions, des électrodes de taille au moins centimétriques sont généralement utilisées dans des volumes de plusieurs dizaines de millilitres. Inversement, les « microélectrodes » sont celles utilisées dans les cellules d'analyse et correspondent à un faible rapport A/V . Usuellement ces cellules électrochimiques contiennent quelques millilitres de solution. Les « microélectrodes » sont alors de tailles millimétriques et le terme « ultramicroélectrode » est alors dédié aux électrodes encore plus petites,^{1,2} c'est-à-dire avec au moins une dimension micrométrique ou submicrométrique.

Il ressort néanmoins de ces deux points de vue une définition opérative pour les ultramicroélectrodes, c'est-à-dire des électrodes de dimensions micrométriques ou inférieures. Les paragraphes qui suivent viseront à compléter et améliorer cette définition.

II. Propriétés des interfaces chargées et des méthodes faradiques, inconvénients des électrodes usuelles

Lors d'une expérience électrochimique, la solution est perturbée par l'intermédiaire d'une électrode fixée à un potentiel fixe ou variable avec le temps et alors parcourue par un courant. Ceci entraîne une polarisation de l'interface électrode/solution et une organisation particulière des charges dans la solution à proximité et à la surface de l'électrode. En présence d'espèces électroactives et si le potentiel de l'électrode est suffisant pour oxyder ou réduire ces espèces, le courant parcourant l'électrode est alors la somme de deux contributions à l'interface électrode/solution : le courant **faradique**, associé aux processus d'oxydoréduction, et le courant **capacitif**, lié à la structure de la solution à l'interface (double couche électrochimique).

II.1. Courant faradique

Considérons une cellule électrochimique composée de deux électrodes et d'un électrolyte contenant notamment une espèce oxydable notée R telle que $R = O + ne^-$. Le potentiel de l'électrode dite de travail est appliqué par rapport à l'électrode de référence et à une valeur suffisante pour oxyder R ($E \gg E^\circ_{(O/R)}$). Le passage du courant à travers l'interface électrode/solution correspond d'une part à des phénomènes réactifs, et d'autre part à des phénomènes d'accumulation. Le premier mécanisme implique un transfert direct d'électron par l'intermédiaire d'une réaction électrochimique (oxydation ou réduction) à l'électrode. Ce type de processus est qualifié de **faradique**.

A titre d'exemple, étudions le cas d'une électrode sphérique de rayon r_0 et une solution contenant l'espèce R à la concentration C_R^* . La polarisation de l'électrode et le processus faradique (consommation de R selon $R = O + ne^-$) qui en découle ont pour conséquence un transport de matière qu'on limitera à la diffusion (la migration n'est pas à considérer en présence d'un excès d'électrolyte support et la convection est généralement négligeable). La seconde loi de Fick donne alors (avec D_R , le coefficient de diffusion de R) :

$$\frac{\partial C_R(r,t)}{\partial t} = D_R \Delta C_R = D_R \left[\frac{\partial^2 C_R(r,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_R(r,t)}{\partial r} \right] \quad \text{Equation A-1}$$

Sa résolution permet d'accéder au courant faradique d'oxydation de R :

$$i = nFAD_R \times \left[\frac{\partial C_R(r,t)}{\partial r} \right]_{r=r_0} = \frac{nFAD_R C_R^*}{r_0} \times \left[1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D_R t}} \right] \quad \text{Equation A-2}$$

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les électrodes classiquement utilisées en électrochimie analytique sont millimétriques. Pour des expériences de l'ordre de quelques dizaines de secondes on a alors (pour $D_R \approx 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $r_0 \approx 1 \text{ mm}$ et $t = 10 \text{ s}$) : $\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_R t}} \gg 1$.

Les effets de bords sont négligeables et le régime de diffusion est donc de type **linéaire**.

En conséquence :
$$i = \frac{nFAD_R C_R^*}{\sqrt{\pi D_R t}} \quad \text{Equation A-3}$$

Il s'agit de la loi de Cottrell, que l'on retrouve également pour tout type d'électrode aux temps courts. Inversement, aux temps longs, $i = \frac{nFAD_R C_R^*}{r_0}$, pour une électrode sphérique, montrant qu'un état stationnaire est atteint.

On notera que la résolution de la loi de Fick permet également d'accéder aux profils de concentration de R, c'est-à-dire à sa concentration en fonction de sa position et du temps. On peut alors mettre en évidence l'existence d'une zone de solution au voisinage de l'électrode où $C_R(r,t) \neq C_R^*$, dite couche de diffusion, d'épaisseur micrométrique.

II.II. Processus non faradiques

Cependant, l'existence d'une différence de potentiel entre l'électrode et la solution n'entraîne pas nécessairement de transformation électrochimique. Lorsqu'un potentiel est appliqué à l'électrode, une accumulation de charges de part et d'autre de l'interface électrode/solution se produit.

Différents modèles présentent la répartition des charges à l'interface en fonction de la différence de potentiel interfacial. Dans la représentation initiale, proposée par H. Von Helmholtz en 1879,^{3, 4} une couche d'ions de la solution est adsorbée à la surface de l'électrode de façon compacte. L'interface peut alors être assimilée à un condensateur plan et le potentiel au voisinage de l'électrode décroît linéairement. Plus tard, L. G. Gouy et D. L. Chapman ont séparément, en 1910 et 1913,³ amélioré ce modèle en développant la théorie de la couche diffuse. L'excès de charges dans la solution est réparti dans une zone d'épaisseur caractéristique (l_D : longueur de Debye) et le potentiel de surface de l'électrode décroît de façon exponentielle

avec la distance à l'électrode. Le schéma actuel, celui de Gouy-Chapman-Stern (*Figure A-1*), proposé en 1924,⁵ est une juxtaposition de la couche dense de Helmholtz et de la couche diffuse du modèle Gouy-Chapman. La composition de cette couche peut être très différente de celle au sein de la solution. Par exemple, dès l'application d'un potentiel positif à l'électrode, on constate l'apparition d'une impulsion de courant qui tend rapidement vers zéro quand il n'y a pas d'espèce chimique réactive au voisinage immédiat de la surface de l'électrode. Ce courant est produit par un déplacement des charges à la surface de l'électrode. En raison de la mobilité des ions et du principe d'électroneutralité, les couches de solutions à proximité de l'électrode acquièrent une charge de signe contraire. Une tension positive appliquée à l'électrode conduit à un excès de charges positives à sa surface. La couche de solution adjacente, se charge alors négativement en deux parties : une couche interne compacte où le potentiel électrique décroît linéairement avec la distance à la surface de l'électrode, et une couche diffuse dans laquelle la variation du potentiel est de type exponentiel. Cette distribution de charges à la surface de l'électrode et dans son voisinage est appelée **double couche électrique**. Elle se comporte comme un condensateur, et induit alors un courant **capacitif** de la forme :

$$i = \frac{\Delta E}{R_s} \times e^{-\frac{t}{R_s C_d}} \quad \text{Equation A-4}$$

où ΔE est la différence de potentiel appliquée, R_s la résistance de la solution et C_d la capacité de la double couche.

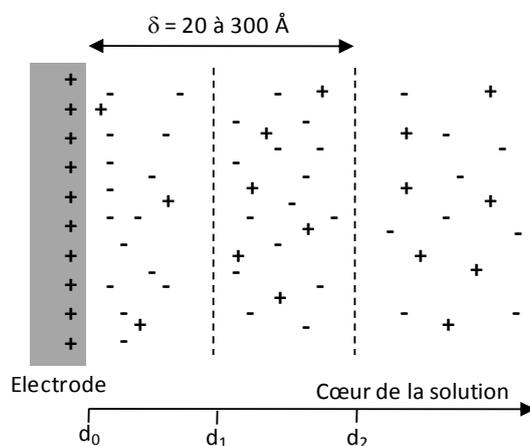


Figure A-1 : Double couche électrochimique à l'interface électrode/solution lors de l'application d'un potentiel positif à l'électrode.

Au bilan, la capacité de l'interface électrode/solution, liée uniquement à la réorganisation de la solution au voisinage de l'électrode, a une double conséquence. D'une part, elle introduit un bruit dans la mesure électrochimique (proportionnel à C_d) et d'autre part, elle constitue un filtre de constante de temps τ , égale à $R_s \times C_d$, qui limite les variations de potentiel de l'électrode ou les mesures aux temps courts.

II.III. La chute ohmique

La solution ionique étudiée, est un milieu plus ou moins résistif, de résistance R_s . Ainsi, d'après la loi d'Ohm, le passage du courant d'origine faradique et/ou capacitif s'accompagne d'une chute de potentiel. Lors de la mesure ou de l'établissement du potentiel d'une électrode par rapport à une électrode de référence, une chute de tension égale à $i \times R_s$ est donc toujours incluse dans le potentiel mesuré. Le terme $i \times R_s$, correspondant à la **chute ohmique** dans la solution, introduit alors un décalage entre le potentiel réel de l'électrode et sa valeur mesurée ou imposée. En pratique, la chute ohmique peut être minimisée mais non annulée (résistance dite non compensée) en introduisant dans le montage une troisième électrode, la contre-électrode ou électrode auxiliaire.

II.IV. Bilan

Suite aux considérations précédentes, le schéma électrique équivalent d'une cellule électrochimique est le suivant :

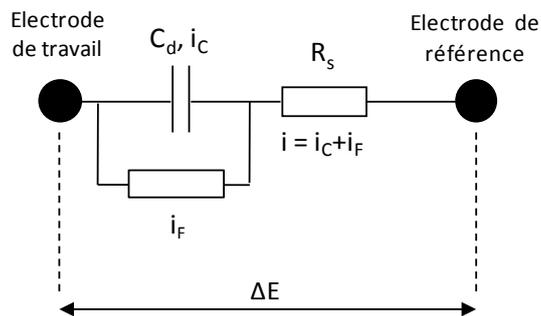


Figure A-2 : Schéma électrique d'une cellule électrochimique.

D'un point de vue analytique, le courant faradique, directement proportionnel à l'aire de l'électrode, transcrit sous forme électrique une information chimique (la concentration de l'espèce électroactive en solution C_R^*). La loi de Cottrell montre que même à potentiel constant, le courant faradique reste variable et peut être par ailleurs pollué par un courant capacitif qui ne peut être négligé tant que $t < \tau$.

Pour une **électrode sphérique**, la résistance de la solution est inversement proportionnelle au rayon de l'électrode. En général, en électrochimie analytique, la surface de la contre-électrode est supérieure à la surface de l'électrode de travail. De ce fait, les lignes de courant sont contenues dans un volume conique délimité par la surface de l'électrode et l'équipotentielle passant par la pointe de l'électrode de référence située à une distance d .

Ainsi, l'expression de la résistance de la solution pour un système de symétrie sphérique est :

$$R_s = \frac{\rho}{4\pi r_0} \times \left(\frac{d}{d + r_0} \right) \quad \text{Equation A-5}$$

Pour une électrode de quelques millimètres ou moins, cette équipotentielle peut être considérée comme étant à l'infini. Il est donc possible de négliger le rayon de l'électrode par rapport à cette distance.

L'expression de la résistance de la solution devient alors :

$$R_s = \frac{\rho}{4\pi r_0} \quad \text{Equation A-6}$$

Enfin, la capacité d'une électrode est telle que $C_d = A \times C_d^\circ$ (avec C_d° ne dépendant que de la solution et de la nature de l'électrode). Elle est donc proportionnelle à r_0^2 . Ainsi la constante de temps $\tau = R_s \times C_d$ et la chute ohmique $R_s \times (i_F + i_C)$ dépendent de r_0 . Bien que le rapport signal sur bruit, défini comme le rapport entre courants faradique et capacitif, reste alors indépendant de la dimension de l'électrode, diminuer la taille de l'électrode de travail semble indiqué pour s'affranchir des problèmes liés à la chute ohmique ou aux phénomènes capacitifs et permettre **l'étude de phénomènes rapides**.

III. Propriétés des ultramicroélectrodes

La diminution de la taille de l'électrode est donc un atout analytique évident. Nous allons montrer qu'elle s'accompagne, à l'échelle micrométrique, d'un changement de régime de diffusion.

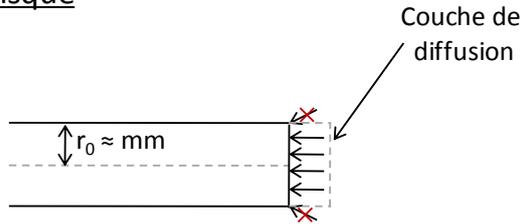
III.I. Régime de diffusion d'une UME

Comme nous l'avons vu précédemment, dans le cas d'une électrode millimétrique, l'épaisseur de la couche de diffusion (μm) est très faible devant la taille de l'électrode ($r_0 \approx \text{mm}$). La diffusion est donc **linéaire semi-infinie**. Dans le cas des ultramicroélectrodes, l'épaisseur micrométrique de la couche de diffusion et la taille de l'électrode sont du même ordre de grandeur. Les effets de bords ne peuvent plus être négligés. La diffusion devient alors **sphérique et convergente** (Figure A-3).

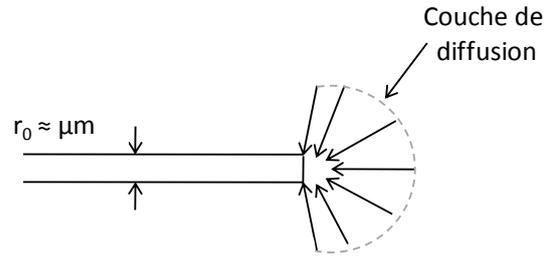
Electrodes millimétriques

Ultramicroélectrodes

Disque

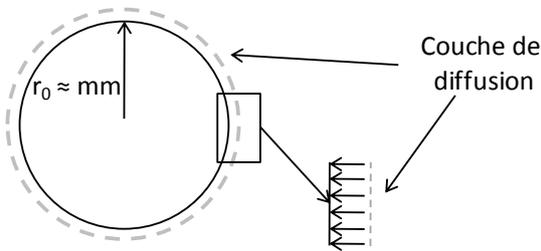


Effets de bords négligés
Diffusion LINEAIRE

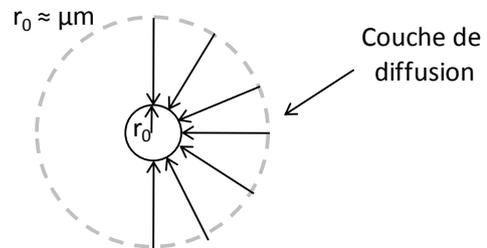


Effets de bords non négligés
Diffusion SPHERIQUE

Sphère



Pas de perception de la courbure
Diffusion LINEAIRE



Perception de la courbure
Diffusion SPHERIQUE

Figure A-3 : Schéma des couches de diffusion pour des électrodes millimétriques et des ultramicroélectrodes de type disque et sphère.

Les mêmes conclusions peuvent être retrouvées mathématiquement en considérant le cas d'une UME sphérique de rayon r_0 , et une espèce R oxydée à sa surface. En effet, nous avons vu qu'en régime de diffusion pur :

$$i = \frac{nFAD_R C_R^*}{r_0} \times \left[1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D_R t}} \right] \tag{Equation A-7}$$

D'après cette équation, il est possible de considérer deux types de régimes de diffusion en fonction du temps.

Au temps courts, quand $t \ll \frac{r_0^2}{D_R}$ alors $\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_R t}} \gg 1$ et l'équation du courant devient :

$$i_{trans} = \frac{nFAD_R C_R^*}{\sqrt{\pi D_R t}} \tag{Equation A-8}$$

Cette expression correspond à l'équation de Cottrell pour une électrode « plane ». L'épaisseur de la couche de diffusion ($\delta = \sqrt{\pi D_R t}$) est suffisamment faible par rapport au rayon de l'électrode pour que les effets de bords soient négligeables et que le régime de diffusion soit plan. Dans ce cas, l'épaisseur de la couche de diffusion et le courant varient en fonction du temps, le régime est donc **transitoire**.

Un second régime est envisageable dès lors que $\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_R t}} \ll 1$. Il est impossible à atteindre pour des électrodes millimétriques ($\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_R t}} \approx 20$ pour $r_0 \approx 3$ mm et $t = 10$ s) mais est par contre accessible pour des dimensions micrométriques ($\frac{r_0}{\sqrt{\pi D_R t}} \approx 5 \cdot 10^{-3}$ pour $r_0 \approx 1$ μ m et $t = 10$ s).

Pour ces temps dits longs, quand $t \gg \frac{r_0^2}{D_R}$ le courant devient :

$$i_{\text{stat}} = \frac{n F A D_R C_R^*}{r_0} \quad \text{Equation A-9}$$

L'épaisseur de la couche de diffusion est alors bien plus grande que le rayon de l'électrode ($\delta = \sqrt{\pi D_R t} > r_0$). Les effets de bords ne sont plus négligeables et la diffusion devient sphérique et convergente. Le courant tend vers une valeur limite, le régime est alors **stationnaire**. Pour des distances $r \ll 2 r_0$, le régime stationnaire est rapidement atteint (en quelques millisecondes ou quelques secondes). Ainsi, l'utilisation de ces électrodes offre la possibilité de travailler en régime de diffusion stationnaire.⁶ L'épaisseur de la couche de diffusion est alors de quelques fois la valeur de r_0 . L'électrode n'est sensible qu'aux changements de concentration à proximité de sa surface active. Elle n'est donc pas affectée par les événements se produisant au-delà, dans la solution. Les UME sont donc d'excellents **capteurs locaux de concentration**.

Un régime stationnaire de diffusion sphérique ne peut être atteint que lorsque la convection peut être négligée. Dans les conditions usuelles, on ne peut pas éviter les phénomènes de convection naturelle, mais ils n'interviennent qu'à des distances de l'ordre de la centaine de microns. L'épaisseur de la couche de diffusion des UME étant comparable au rayon de l'électrode, il est possible d'atteindre un régime de diffusion sphérique, pour des coefficients de diffusion classiques (de l'ordre de 10^{-5} $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), après seulement quelques secondes si une dimension au moins est inférieure à 25 μ m.¹

C'est cette particularité, de pouvoir atteindre ce régime de diffusion sphérique, qui définit les UME et qui ne découle qu'indirectement de leur taille.

Il est cependant vrai que le premier avantage des UME est directement lié à leur taille micrométrique. Leur **résolution spatiale** offre la possibilité d'étudier les changements de

concentration dans un volume de taille comparable à leur dimension.^{6, 7} Elles autorisent ainsi l'observation de processus biologiques à l'échelle de la cellule unique (diamètre de l'ordre de quelques microns) comme nous le verrons plus tard.

III.II. Effets sur la constante de temps, la chute ohmique et le rapport signal sur bruit

Comme déjà mentionné plus haut, trois grandeurs se relèvent déterminantes pour les analyses électrochimiques.

La **résistance** R_s de la solution correspond au volume de solution limitée par les surfaces des électrodes de travail et de référence. Lorsqu'un courant faradique et/ou capacitif traverse la cellule, elle est responsable du phénomène de chute ohmique. Dans l'expression de la chute ohmique (*Equation I-10*), i_C et i_F sont les composantes capacitive et faradique du courant.

$$\text{Chute ohmique} = (i_C + i_F) \times R_s \quad \text{Equation A-10}$$

La **capacité** de la double couche électrochimique C_d est aussi à l'origine du bruit électrique, proportionnel à C_d , et constitue un filtre de constante de temps τ qui limite la vitesse des variations de potentiel de l'électrode.

$$\tau = R_s \times C_d \quad \text{Equation A-11}$$

Le **rapport signal sur bruit** S/N est proportionnel au rapport du courant faradique sur le courant capacitif.

$$S/N = \frac{i_F}{i_C} \quad \text{Equation A-12}$$

Nous allons détailler comment le passage d'une électrode millimétrique à une ultramicroélectrode modifie ces trois composantes.

III.II.1. Cas d'une ultramicroélectrode sphérique

Lors de l'utilisation d'une ultramicroélectrode sphérique, la taille de la contre-électrode reste supérieure à celle de l'électrode de travail. Les lignes de courants entre les deux électrodes sont donc toujours contenues dans un volume conique.

On a donc toujours une résistance inversement proportionnelle au rayon r_0 de l'électrode ($R_s = \frac{\rho}{4\pi r_0}$). De plus, la capacité de la double couche reste proportionnelle à la surface de l'électrode. Ainsi, la constante de temps τ de la cellule électrochimique est toujours proportionnelle au rayon de l'électrode et diminue avec la taille de l'électrode. Ces UME permettent donc la détection de changements rapides de concentration. Plus l'électrode est petite, plus des signaux rapides peuvent lui être appliqués.⁶ Les UME sont donc des outils de choix pour étudier en temps réel⁸ des phénomènes rapides jusqu'à des gammes de temps de l'ordre de la nanoseconde.⁹ A cet égard, leurs performances dans le cadre de la voltammétrie à haute vitesse de balayage (supérieure à 1 MV.s^{-1}) sont remarquables. Le second avantage des UME est donc leur excellente résolution temporelle (de l'ordre de la milliseconde ou inférieure).

En régime stationnaire, l'expression du courant pour une UME sphérique ($A = 4\pi r_0^2$) est :

$$i_{\text{stat}} = \frac{nFAD_R C_R^*}{r_0} = 4\pi nFD_R C_R^* \times r_0 \quad \text{Equation A-13}$$

D'après cette équation i_{stat} est proportionnel à r_0 . Le rapport signal sur bruit, proportionnel au rapport du courant faradique sur la capacité de l'interface, varie donc de façon inversement proportionnelle au rayon de l'électrode, contrairement au cas d'une électrode millimétrique. Les ultramicroélectrodes permettent alors la détection de très faibles courants (jusqu'à 100 fA)⁷ avec un rapport signal sur bruit supérieur à celui obtenu avec des électrodes millimétriques dans les mêmes conditions.⁶ Enfin, les courants détectés étant très faibles, la chute ohmique devient minimale et indépendante des dimensions de l'électrode.⁶

Enfin, un autre avantage de l'utilisation des ultramicroélectrodes est la simplification du montage expérimental. Nous avons vu que la présence de la chute ohmique nécessite l'utilisation d'une contre-électrode afin de faire circuler le courant entre l'électrode de travail et cette dernière. Dans le cas des ultramicroélectrodes, les courants étudiés sont très faibles (de l'ordre du pA) et la chute ohmique, très limitée. Les UME permettent donc de travailler dans des milieux très résistifs sans perte de sensibilité ou dans les milieux usuels sans utiliser de contre-électrode.⁷

Les caractéristiques fondamentales des ultramicroélectrodes ont été présentées dans le paragraphe précédent à partir de la géométrie sphérique (cas mathématique le plus simple). Le travail de cette thèse a été réalisé à partir d'UME de type disque et bande. Nous allons donc montrer que les avantages mis en avant précédemment lors de l'utilisation d'électrodes sphériques sont également valables pour ces deux géométries.¹⁰

III.II.2. Cas d'une ultramicroélectrode de type disque

Pour une électrode de type disque de rayon r_0 , la résolution de la seconde loi de Fick montre également qu'il est possible d'obtenir deux régimes de diffusion différents, à savoir linéaire puis sphérique.

Pour $t \gg \frac{r_0^2}{D_R}$, l'expression du courant stationnaire est la suivante (pour un disque de rayon r_0) :

$$i_{\text{stat}} = 4nFD_R C_R^* \times r_0 \quad \text{Equation A-14}$$

Le courant est donc proportionnel au rayon r_0 de l'électrode. De plus, la résistance de la solution varie de façon inversement proportionnelle au rayon r_0 de l'électrode et la capacité de la double couche est proportionnelle à l'aire de l'électrode (r_0^2). Ainsi, la constante de temps est proportionnelle au rayon de l'électrode, le rapport signal sur bruit est inversement proportionnel au rayon de l'électrode et la chute ohmique est minimale et indépendante de la taille de l'électrode. Ainsi, plus la taille de l'électrode diminue, plus la constante de temps est faible et plus le rapport signal sur bruit est élevé.

III.II.3. Cas d'une ultramicroélectrode de type bande

Pour une électrode de type bande caractérisée par sa longueur L et sa largeur w , le courant devient quasi-stationnaire et proportionnel à la longueur de la bande.

$$i = \frac{2nFA\pi D_R C_R^*}{w \times \ln\left(64 \times \frac{D_R t}{w^2}\right)} = \frac{2nF\pi D_R C_R^*}{\ln\left(64 \times \frac{D_R t}{w^2}\right)} \times L \quad \text{Equation A-15}$$

Dans le cas des bandes, la résistance de la solution est inversement proportionnelle à la longueur de la bande et la capacité de la double couche proportionnelle à la surface de l'électrode. La constante de temps est donc proportionnelle à la largeur de la bande, le rapport signal sur bruit inversement proportionnel à la largeur de la bande et la chute ohmique minimale et indépendante de la taille de l'électrode. Ainsi, plus la largeur de la bande diminue, plus la constante de temps diminue et plus le rapport signal sur bruit augmente, ces deux termes étant par ailleurs indépendants de la longueur de la bande.

III.III. Bilan

Le tableau A-1 rassemble les caractéristiques des trois types d'UME présentés précédemment.

	UME sphère (rayon r_0)	UME disque (rayon r_0)	UME bande (Longueur L, largeur w)
Courant stationnaire i_{stat}	$i_{\text{stat}} \propto r_0$	$i_{\text{stat}} \propto r_0$	$i_{\text{stat}} \propto L$
Résistance de la solution R_s	$R_s \propto \frac{1}{r_0}$	$R_s \propto \frac{1}{r_0}$	$R_s \propto \frac{1}{L}$
Capacité de la double couche C_d	$C_d \propto r_0^2$	$C_d \propto r_0^2$	$C_d \propto L \times w$
Chute Ohmique $R_s \times i_{\text{stat}}$	indépendante de la taille de l'électrode	indépendante de la taille de l'électrode	indépendante de la taille de l'électrode
Constante de temps $\tau = R_s \times C_d$	$\tau \propto r_0$	$\tau \propto r_0$	$\tau \propto w$
Rapport signal sur bruit $S/N = \frac{i_{\text{stat}}}{C_d}$	$S/N \propto \frac{1}{r_0}$	$S/N \propto \frac{1}{r_0}$	$S/N \propto \frac{1}{w}$

Tableau A-1 : Caractéristiques analytiques des UME en fonction de leur géométrie.

Ce tableau met en évidence le fait que quelle que soit la géométrie de l'UME, on retrouve les mêmes caractéristiques particulières. Tout d'abord, plus la taille de l'électrode diminue, plus la constante de temps est faible. Cette caractéristique permet alors à l'électrode de détecter des changements rapides de concentration et de lui appliquer des signaux rapides. Ensuite, lorsque la taille de l'électrode est micrométrique ou inférieure, le rapport signal sur bruit est amélioré. Cette propriété rend donc les UME capables de détecter de très faibles courants avec une excellente sensibilité. De plus, lors de l'utilisation de ces UME en régime stationnaire, la chute ohmique devient minimale et indépendante de la taille de l'électrode. Il est donc possible de travailler avec un montage à seulement deux électrodes sans dérive du potentiel si l'électrode de référence est stable. Enfin, travailler avec des outils de tailles micrométriques permet d'atteindre une résolution spatiale excellente, adaptée aux dimensions des cellules que nous voulons étudier. En conclusion, la taille de ces électrodes, associée à leurs propriétés physicochimiques particulières, en fait des capteurs permettant de détecter localement des quantités infinitésimales de molécules électroactives et d'observer des processus fondamentaux de la biologie cellulaire.

IV. Détection de biomolécules électroactives libérées par une cellule unique : configuration synapse « semi-artificielle »

Les phénomènes biologiques étudiés et présentés dans cette thèse sont relatifs à la libération (exocytose vésiculaire) ou à la production (stress oxydant cellulaire) de molécules d'intérêt biologique par une cellule, vers le milieu extracellulaire. Quel que soit le mécanisme impliqué, les quantités de molécules libérées sont faibles, de l'ordre de la femtomole voire de l'attomole. Le but étant de détecter ces molécules au niveau de la cellule unique, il est nécessaire que le capteur utilisé, une UME, ait une taille adaptée et soit positionné de façon à collecter un maximum de l'information chimique libérée avec une résolution de quelques attomoles et ce, sans altérer la cinétique de libération. En d'autres termes, la distance électrode/cellule doit être la plus faible possible. En conséquence, les quantités de matière émises, bien que faibles, le seront dans un volume qui l'est tout autant, générant alors des concentrations suffisantes pour être détectées. La configuration utilisée pour ces mesures s'inspire d'un exemple de la Nature : la synapse chimique.

IV.I. Synapse chimique

Pour maintenir leur fonctionnement, les organismes ont recours à la communication cellulaire assurée par deux grands systèmes : le système hormonal et le système nerveux. Lors de la transmission hormonale, les glandes endocrines libèrent des hormones dans le sang. Elles sont alors transportées et agissent sur des organes cibles à distance. Lors de la transmission nerveuse, la libération de molécules messagers, les neurotransmetteurs, est localisée au niveau des synapses.

Les synapses électriques sont constituées d'un élément émetteur et d'un élément récepteur en contact. L'information de nature électrique est alors transmise de manière continue et réciproque. Ce type de synapses constitue un mode de communication minoritaire par rapport aux synapses chimiques. La synapse chimique est également constituée d'un élément émetteur (la terminaison pré-synaptique) et d'un élément récepteur (la terminaison post-synaptique), mais les deux extrémités de ces éléments sont séparées de quelques dizaines de nanomètres. Cet espace est appelé fente synaptique (*Figure A-4*). Le transfert d'information peut avoir lieu entre deux neurones ou un neurone et une cellule réceptrice ou émettrice.

Un neurone est constitué d'un corps cellulaire et de deux types de prolongement : les axones et les dendrites. Au niveau de sa terminaison, l'axone contient des vésicules synaptiques (petits organites entourés d'une membrane), remplies de neurotransmetteurs.

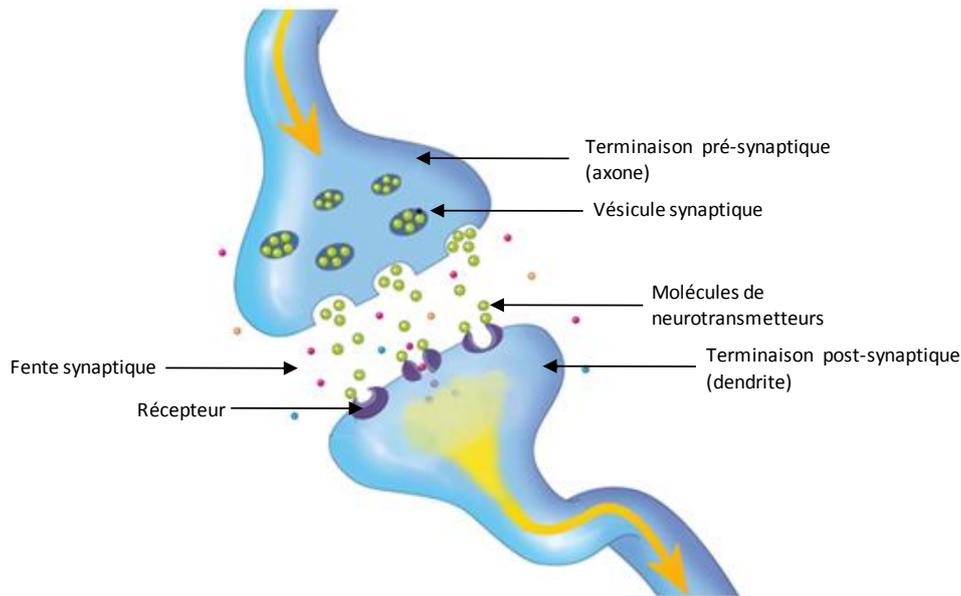


Figure A-4 : Schéma d'une synapse chimique entre deux neurones.

Adapté de : http://www.lecorpshumain.fr/corpshumain/img_fiches/fonctionnement/transmission_influx_3.jpg

Un potentiel d'action est d'abord généré par le neurone à la base de son corps cellulaire. Ce potentiel d'action se propage le long de l'axone du neurone émetteur. Une fois arrivé à la terminaison pré-synaptique, le signal électrique est converti en signal chimique : l'arrivée du potentiel d'action entraîne l'entrée d'ions calcium à l'intérieur du neurone. Cette augmentation de la concentration en calcium est alors responsable de la fusion de vésicules synaptiques avec la membrane de la terminaison pré-synaptique. Les neurotransmetteurs sont alors libérés dans la fente synaptique et se fixent aux récepteurs situés sur la dendrite du neurone post-synaptique. Une variation du potentiel local de la dendrite du neurone post-synaptique apparaît et entraîne la stimulation du corps cellulaire de ce neurone créant ainsi un nouveau potentiel d'action. L'information est donc transmise grâce à la libération de quelques milliers à quelques millions de molécules au maximum dans la fente synaptique.

La fiabilité de la communication cellulaire repose sur une reconnaissance parfaite de l'information avec un rapport signal sur bruit élevé. Ceci est possible car même si un très petit nombre de molécules est libéré (quelques femto à quelques attomoles), ces espèces sont émises dans un volume très restreint. Ceci correspond alors à des changements de concentration suffisamment importants pour permettre une détection rapide et précise de l'information. Lors de nos expériences électrochimiques, nous souhaitons détecter des quantités de molécules très faibles émises par une cellule. **Mimer la configuration utilisée dans les synapses chimiques permet donc de concentrer dans un petit volume les molécules libérées.**

IV.II. Synapse « semi-artificielle »

Inspirée de la synapse chimique, la configuration synapse « semi-artificielle » (Figure A-5) a été adaptée au laboratoire pour détecter des signaux chimiques émis par une cellule vivante.^{11, 12} Le neurone émetteur est remplacé par l'objet à étudier (dans ce travail, il s'agit d'une cellule isolée) et le neurone récepteur, par l'électrode.

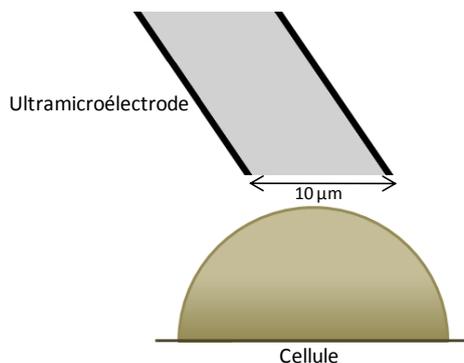


Figure A-5 : Schéma de la configuration synapse « semi-artificielle ».

Le courant faradique détecté par une microélectrode est proportionnel à la concentration des molécules électroactives au voisinage de l'électrode (cf. Equation A-9). Comme nous l'avons vu, minimiser la distance entre la cellule émettrice et l'électrode permet de concentrer les molécules libérées. En pratique, à l'aide de micromanipulateurs, on atteint une distance de 50 à 100 nm en plaçant l'électrode au contact de la cellule. Le volume équivalent à la fente synaptique est alors de l'ordre du femtolitre. Si par exemple, 1000 molécules sont libérées par la cellule émettrice ($1,66 \cdot 10^{-21}$ moles), la concentration correspondante dans la fente synaptique est de l'ordre de $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Cette gamme de concentration est alors détectable avec les UME. Utilisées dans cette configuration, les ultramicroélectrodes sont donc particulièrement bien adaptées à la détection de quantités infinitésimales de molécules libérées à l'échelle de la cellule unique, et ont permis, dans le cadre de cette thèse, l'étude de deux processus biologiques : l'exocytose et le stress oxydant.

Comme décrit précédemment, leur taille, du même ordre de grandeur que celle des cellules étudiées offre une **résolution spatiale** assez précise pour détecter les molécules libérées par les vésicules sous l'électrode. On remarquera qu'en utilisant des électrodes de plus faibles dimensions, il est possible d'améliorer cette résolution et de sonder la surface de la cellule à différents endroits. Par consommation de la fibre de carbone d'une électrode dans une flamme (« etched-electrode »), il est possible d'atteindre des diamètres de $2 \mu\text{m}^{13}$ à 100-300 nm.¹⁴ En utilisant ces électrodes dans le cadre de l'étude de l'exocytose, l'existence de zones actives et non actives de sécrétion a été mise en évidence à la surface des cellules chromaffines.

La **résolution temporelle** des UME, bien supérieure la milliseconde, convient très bien à la cinétique des événements étudiés et permet alors la détection en temps réel des mécanismes biologiques. En effet, lors de l'exocytose, la durée de libération des molécules s'étend sur quelques dizaines de millisecondes (en moyenne 100 ms par événement d'exocytose). Par ailleurs, grâce à l'excellente résolution temporelle du patch-clamp, R. Chow et al. (*Univ So Calif, Dept Physiol & Biophys, Los Angeles*) ont montré que contrairement aux jonctions neuromusculaires ou aux neurones, pour lesquels les événements d'exocytose ont lieu environ une milliseconde après la stimulation, il existe un temps de latence chez les cellules chromaffines d'environ 50 ms.¹⁵ La charge de la double couche pour une électrode de carbone étant de quelques dizaines de millisecondes, les premiers événements peuvent être détectés. Dans les cas du stress oxydant, la cinétique des événements, bien supérieure à la seule diffusion des espèces vers l'électrode, est limitée par la production des espèces par la cellule.¹⁶ La durée de cette libération est très différente d'un modèle cellulaire à l'autre, mais s'échelonne de quelques minutes à plusieurs dizaines de minutes. Il est alors possible de détecter ces événements sur UME.

La **sensibilité** de ces électrodes permet la détection de courant de l'ordre du picoampère.⁷ De plus, leur utilisation offre également une excellente **sélectivité**. En choisissant le potentiel de l'électrode de travail, il est possible d'oxyder tout ou une partie du matériel biologique libéré. Par exemple, dans le cadre de la détection des espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive oxygen species) et de l'azote (RNS, Reactive Nitrogen Species) pendant le stress oxydant, il est possible de détecter spécifiquement certaines espèces. En effet, des études voltamétriques de solutions de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxydite ($ONOO^-$), monoxyde d'azote (NO^*) et nitrite (NO_2^-), quatre espèces, dont les travaux antérieurs du groupe montrent qu'elles sont impliquées dans le stress oxydant, ont mis en évidence que leurs vagues d'oxydation sont relativement bien séparées. Il est donc possible, en fixant le potentiel de l'électrode de travail à + 850, + 650, + 450 ou + 300 mV vs ECSS (Electrode au calomel saturé au chlorure de sodium) de détecter spécifiquement une ou plusieurs de ces espèces.¹⁷ De la même façon, seulement une partie des espèces libérées par exocytose peut être détectée. Par exemple, en fixant le potentiel de l'électrode de travail (électrode de carbone modifiée au Nafion) à + 400 mV vs Ag/AgCl, il est possible de ne détecter que la sérotonine et les catécholamines libérées par des cellules entérochromaffines de cochon d'inde. La mélatonine, s'oxydant à + 550 mV vs Ag/AgCl, n'est pas détectée.¹⁸ De manière générale, des traitements de surface de l'électrode sont utilisés pour induire une sélectivité vis-à-vis de certaines espèces soit en modifiant leur potentiel d'oxydation soit en bloquant l'accès de certaines d'entre elles à l'électrode en fonction de leur taille ou leur charge.

IV.III. L'exocytose vésiculaire : nature des signaux et objectifs

L'utilisation des UME pour l'étude de l'exocytose a d'abord été développée, au laboratoire, sur les cellules chromaffines. Dans le cadre des travaux présentés dans cette thèse, les cellules étudiées appartiennent à la lignée BON, dérivée d'une tumeur carcinoïde du pancréas.¹⁹ Lors de l'analyse, ces cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri placées sur la plateforme d'un microscope inversé au sein d'une cage de Faraday (*Figure A-6*). Le milieu de culture est remplacé par un tampon isotonique (315 mOsm, pH 7,4, $\theta = 22 \pm 1$ °C) afin d'éviter tout problème de passivation lié aux espèces contenues dans le milieu de culture. Les molécules de sérotonine libérées lors de l'exocytose après stimulation des cellules BON sont détectées par ampérométrie à potentiel constant sur UME à fibre de carbone de diamètre 10 μm . La référence utilisée est une électrode Ag/AgCl et le potentiel appliqué à l'électrode de travail, correspondant au plateau de la vague d'oxydation de la sérotonine, est + 650 mV vs Ag/AgCl.

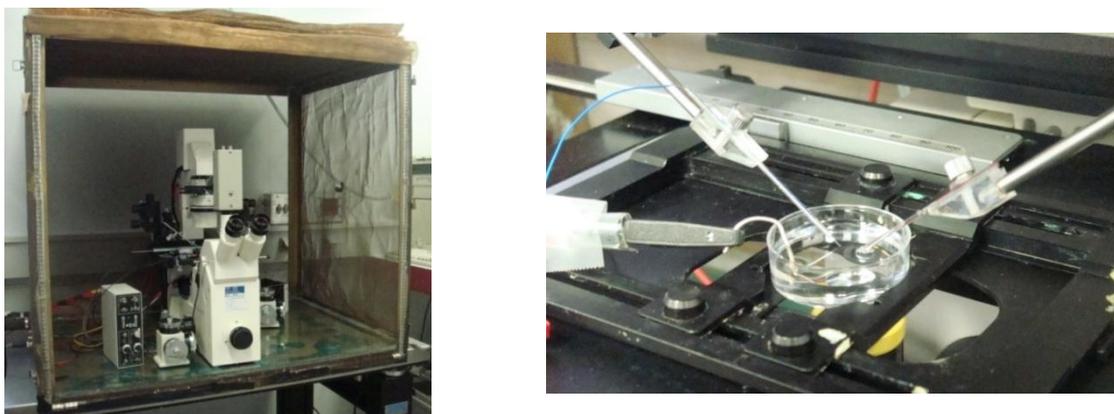


Figure A-6 : A gauche : dispositif expérimental dans une cage de Faraday : microscope inversé, micromanipulateurs et potentiostat ; A droite : position des électrodes de travail (au fond à gauche) et de référence (devant à gauche) et du capillaire de stimulation (à droite).

La stimulation de la sécrétion est réalisée à l'aide d'un capillaire contenant une solution d'ionomycine injectée au voisinage de la cellule. L'ionomycine est un ionophore qui va entraîner une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire : sa présence entraîne l'ouverture de canaux calciques de la membrane cellulaire. La concentration en calcium du tampon extracellulaire étant très supérieure à la concentration intracellulaire, le calcium va entrer dans la cellule et déclencher la sécrétion dépendante du calcium.²⁰ L'UME et la micropipette de verre sont positionnées avec une précision inférieure au micromètre à l'aide de macro- puis de micromanipulateurs. Suite à la stimulation, les molécules de sérotonine contenues dans les vésicules sont libérées par la cellule BON dans la fente « synaptique semi-artificielle » créée entre la cellule et l'UME, et sont ensuite oxydées à la surface de l'électrode (*Figure A-7*).

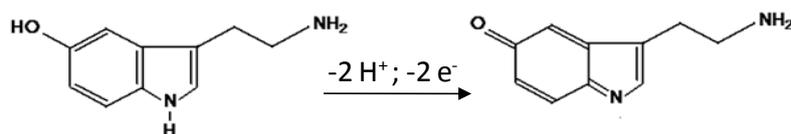


Figure A-7 : Oxydation biélectronique de la sérotonine.

Expérimentalement, la succession d'événements individuels d'exocytose se présente sous la forme d'une suite de pics ampérométriques (Figure A-8) dont chacun correspond à l'ouverture d'une vésicule exocytotique et à la détection de son contenu. La durée de l'ampérogramme enregistré est de l'ordre de cinq minutes et dépend principalement de l'état cellulaire.

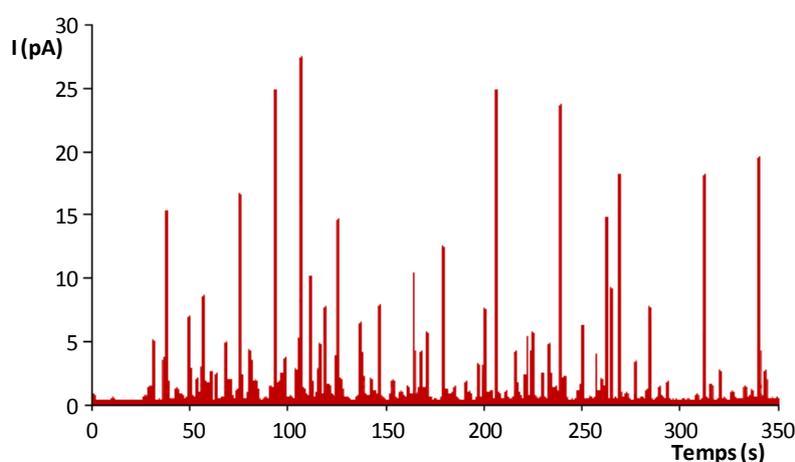


Figure A-8 : Ampérogramme d'une cellule BON (stimulation pendant les premières 30 secondes par de l'ionomycine $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) obtenu avec une UME de carbone $10 \mu\text{m}$ de diamètre polarisée à $+650 \text{ mV vs Ag/AgCl}$.

Pour éviter toute ambiguïté lors du traitement des données, les pics obtenus ne se sont pris en compte qu'à deux conditions : chaque pic doit être parfaitement isolé du suivant et du précédent, et son amplitude doit être au moins trois fois supérieure à l'amplitude du bruit (de l'ordre de 0,3 à 0,6 pA). Une fois les pics ampérométriques isolés manuellement par l'expérimentateur, les paramètres les caractérisant sont déterminés par un logiciel élaboré au laboratoire. Chaque pic correspond à la libération d'une seule vésicule.^{21, 22} L'allure de ces pics permet alors de commenter la dynamique du phénomène d'exocytose.

IV.IV. Le stress oxydant : nature des signaux et objectifs

Dans le cadre des travaux effectués au laboratoire pour détecter les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, plusieurs modèles cellulaires ont été étudiés : les kératinocytes (cellules

de la peau),²³ les fibroblastes (cellules des tissus conjonctifs),²⁴ les macrophages et les lymphocytes (cellules sanguines du système immunitaire)¹⁷... Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxyde nitrite ($ONOO^-$), le nitrite (NO_2^-) et le monoxyde d'azote (NO^*) sont détectables électrochimiquement par ampérométrie stationnaire sur UME de carbone platiné à + 300, + 450, + 650 et + 850 mV vs ECSS, respectivement. Lors des expériences, les cellules adhèrent au fond d'une boîte de Petri placée sur la plateforme d'un microscope inversé au sein d'une cage de Faraday (Figure A-9).

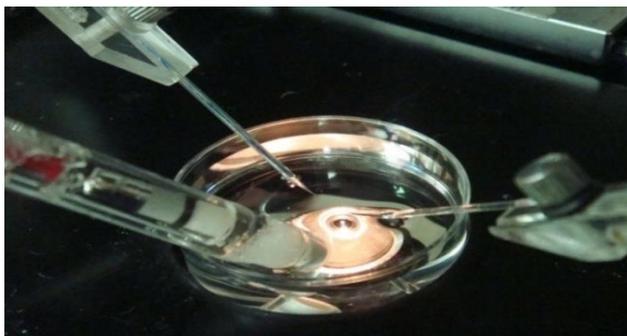


Figure A-9 : Dispositif expérimental dans une cage de Faraday : microscope inversé, micromanipulateurs et potentiostat ; A droite : position des électrodes de travail (au fond à gauche) et de référence (devant à gauche) et du capillaire de stimulation (à droite).

Le milieu de culture est remplacé par un tampon isotonique (315 mOsm, pH 7,4, $\theta = 22 \pm 1^\circ C$) pour les mêmes raisons que dans le cas de l'exocytose. Les espèces sont détectées sur une UME de carbone platiné. L'électrodéposition de noir de platine conduit à un dépôt dendritique à la surface de carbone de 10 μm de diamètre, ce qui permet d'améliorer la sensibilité électrochimique de l'électrode (Figure A-10), en particulier vis-à-vis de la détection du monoxyde d'azote tout en augmentant sa surface active.²⁵

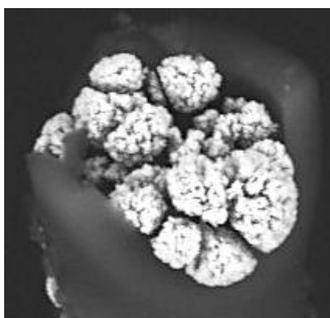


Figure A-10 : Photo en microscopie électronique à balayage d'une UME de carbone (diamètre 10 μm) platiné.

La référence utilisée est une électrode au calomel saturée en chlorure de sodium (ECSS) car celle au calomel saturé par du chlorure de potassium ne convient pas du fait de la contamination du milieu par les ions potassium (dépolarisant membranaire). Le potentiel appliqué à l'électrode de

travail dépend de la nature des espèces à détecter. L'activation de la réponse cellulaire peut être induite de deux façons : la stimulation mécanique ou la stimulation biochimique.

IV.IV.1. Stimulation mécanique

Les cellules sont stimulées à l'aide d'un microcapillaire de verre provoquant une microperforation de la membrane cellulaire. Cette perforation des bicouches provoque la dépolarisation de la membrane et la modification de l'équilibre osmotique. L'entrée d'ions, en particulier les ions calcium, va activer les pools enzymatiques (NADPH oxydase et NO synthase) responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS).²⁶ On peut imaginer que cette stimulation mime l'agression subie par les cellules lors de l'entrée de virus, bactéries ou particules. Suite à la stimulation, les espèces sont libérées dans la fente « synaptique semi-artificielle » créée entre la cellule et l'UME, et sont ensuite détectées par oxydation à la surface de l'électrode. Les mesures sont effectuées en oxydation car l'oxygène dissous dans le milieu rend difficile l'analyse en réduction. L'UME et la micropipette de verre sont positionnées avec une précision inférieure au micromètre à l'aide de macro- puis de micromanipulateurs.

Expérimentalement, le signal détecté se présente sous la forme d'un pic ampérométrique unique mais de très longue durée (supérieur à 30 secondes en général) (Figure A-11).

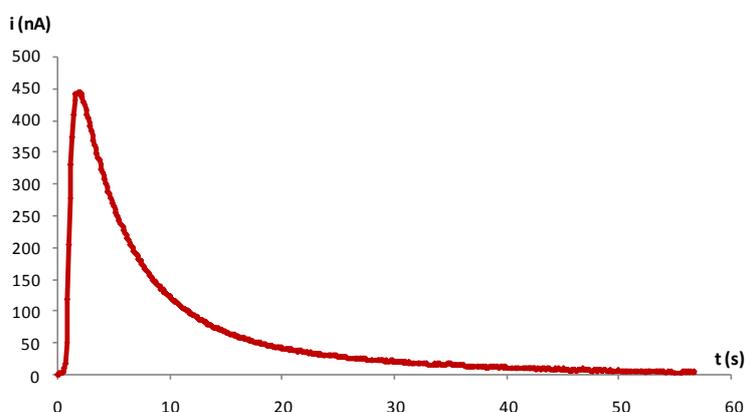


Figure A-11 : Pic ampérométrique correspondant à la libération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote lors du stress oxydant.

Leur forme dissymétrique est la même quel que soit le modèle cellulaire étudié. L'intensité maximale est de quelques dizaines voire de quelques centaines de picoampères, et les paramètres caractéristiques de la cinétique de l'événement sont globalement les mêmes : la montée du signal est très rapide (de l'ordre de la seconde) alors que la décroissance est plus lente et s'étale sur plusieurs dizaines de secondes voire quelques minutes.

IV.IV.2. Stimulation biochimique

Cette stimulation consiste à déclencher la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) en plaçant les cellules en présence de composés chimiques agissant directement sur les enzymes responsables du stress oxydant. Ces eliciteurs sont le calcium ionophore (A23187), l'ester de phorbol PMA (Phorbol 12-myristate-13-acétate), responsable de l'activation de la NADPH oxydase,¹ ou encore l'interféron- γ (IFN- γ) en combinaison avec le lipopolysaccharide (LPS) qui provoque l'expression des isoformes inductibles de la NO synthase.²⁷

L'injection de calcium ionophore au voisinage de la cellule provoque une rapide modification de la membrane cellulaire et sa dépolarisation. Suite à cette modification de l'équilibre osmotique, le calcium extracellulaire entre dans la cellule et active des pools enzymatiques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, les NADPH oxydases et NO synthases, enzymes dépendantes du calcium. Typiquement, la réponse des macrophages suite à cette stimulation commence quelques minutes après l'injection et ne s'arrête qu'après une vingtaine de minutes.²⁸ Dans le cas du PMA, les cellules sont incubées entre 18 et 24 heures en présence de celui-ci. Lors de l'analyse ampérométrique, le milieu de culture est remplacé par du PBS contenant du PMA. Une légère augmentation du courant apparaît environ 10 minutes après le changement de milieu. Lors de la stimulation avec INF- γ /LPS, les cellules sont incubées pendant 18 à 24 heures en présence de ces deux composés. Cette stimulation conduit à une grande production de ROS et de RNS sur une période de temps prolongée.

Les réponses cellulaires obtenues lors d'une stimulation biochimique sont très différentes de celles obtenues suite à la dépolarisation mécanique de la membrane cellulaire (*Figure A-12*).

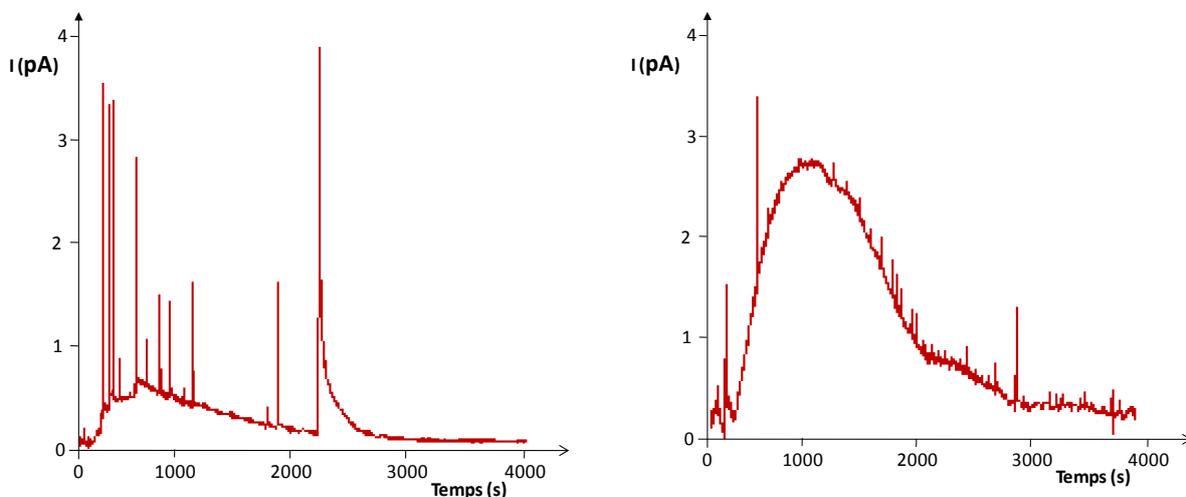


Figure A-12 : Exemples de réponses ampérométriques obtenues sur UME de carbone platiné (diamètre 10 μm) suite à la stimulation biochimique (INF- γ /LPS) d'un macrophage RAW 264.7.

La réponse globale peut être considérée comme la somme de deux types de signaux superposés. Le premier, un pic très large et de faible intensité (environ 1 pA), s'étend sur plusieurs dizaines de minutes. Le second, seulement présent chez certaines cellules, est composé de pics fins d'intensité de quelques picoampères superposés au premier signal. Ces pics ampérométriques durent quelques centaines de millisecondes, et moins fréquemment, plusieurs dizaines de secondes.

Chaque réponse ampérométrique est ensuite traitée à l'aide d'un logiciel développé au laboratoire, qui permet de simuler la décroissance exponentielle de la ligne de base avant et après stimulation et de la soustraire au signal global. En effet, dans le cas des UME de carbone platiné, la charge de la double couche est plus longue (environ 20 minutes). Les cellules n'étant viables qu'environ 45 minutes dans le tampon physiologique, et l'analyse durant 1 heure, il n'est alors pas possible d'attendre le retour à la ligne du courant de base avant de déclencher la réponse cellulaire.

IV.V. Conclusion

Grâce à leurs propriétés spécifiques (diminution de la chute ohmique et de la constante de temps, amélioration du rapport signal sur bruit et régime stationnaire de diffusion atteint en quelques millisecondes) les ultramicroélectrodes permettent de réduire dramatiquement l'ensemble des contraintes inhérentes à l'électrochimie classique. De plus, de par leur taille micrométrique, elles offrent une résolution spatiale excellente et, utilisées en configuration « synapse semi-artificielle », elles permettent la détection de quantités infinitésimales (attomoles à femtomoles) d'espèces libérées par une cellule unique stimulée avec une précision cinétique adéquate pour l'étude de phénomènes cellulaires.

Même si elles constituent des outils de choix pour l'étude de mécanismes biologiques de sécrétion à l'échelle de la cellule unique, les UME utilisées en configuration « synapse semi-artificielle » ne peuvent à elles seules répondre à toutes les attentes et questions inhérentes à ce domaine de la biologie. Elles nécessitent alors d'être adaptées en fonction du phénomène étudié (exocytose ou stress oxydant). C'est donc l'objet de cette thèse de permettre leur évolution ou leur couplage avec d'autres techniques analytiques afin d'améliorer la compréhension de ces mécanismes de libération fondamentaux.

Partie B

**Mise au point du couplage de l'ampérométrie et de la
microscopie de fluorescence pour l'étude de l'exocytose**

PARTIE B : Mise au point du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie de fluorescence pour l'étude de l'exocytose

I. L'exocytose vésiculaire

I.I. Mécanisme de l'exocytose

I.I.1. Généralités

L'exocytose est un mécanisme par lequel les cellules eucaryotes sécrètent des molécules actives dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme est la base de nombreux processus physiologiques comme la communication intracellulaire dans le système nerveux, la défense immunitaire et la régulation hormonale. Les molécules libérées sont initialement contenues dans des vésicules synaptiques (dans le cas des neurotransmetteurs) ou, des granules ou vésicules de sécrétion (pour ce qui est des hormones) qui fusionnent avec la membrane plasmique pour déverser leur contenu dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme peut se dérouler selon deux voies : la voie constitutive ou la voie régulée.

La **sécrétion constitutive** ne dépend pas d'un signal spécifique. Un flux constant de granules part du réseau trans-golgien pour atteindre la membrane plasmique et fusionner par exocytose. Les membranes vésiculaires s'incorporant alors à la membrane plasmique lui apportent de nouveaux constituants protéiques et lipidiques. Le contenu granulaire, constitué de protéines solubles, d'enzymes et de molécules de signalisation telles que les cytokines et les facteurs de croissance, est déversé dans le milieu extracellulaire de façon continue.

La **sécrétion régulée**, déclenchée par un signal chimique, permet de contrôler le moment et le taux de libération du contenu vésiculaire dans l'espace extracellulaire. Le signal, en général une hormone ou un neurotransmetteur, génère un potentiel d'action qui, arrivant au niveau de la membrane plasmique, entraîne sa dépolarisation. Ce phénomène conduit alors à l'ouverture des canaux membranaires dépendant du potentiel et perméables au calcium. L'influx de calcium qui en résulte déclenche alors l'exocytose. Si l'entrée du calcium dans le cytosol s'effectue généralement par l'intermédiaire des canaux calciques, il peut également provenir des stocks internes après stimulation de la protéine G (molécule de transduction du signal) située à la surface de la cellule. L'application d'un de ces deux stimuli entraîne donc l'augmentation de la concentration en calcium libre intracellulaire et déclenche alors la fusion des granules arrimés à la membrane plasmique.²⁹

I.1.2. Biogénèse et maturation des granules de sécrétion

La formation initiale des vésicules ou granules immatures a lieu dans l'appareil de Golgi.³⁰ La face cis de l'appareil de Golgi est la zone d'entrée de protéines synthétisées au sein du réticulum endoplasmique qui constitueront l'intérieur des granules de sécrétion (*Figure B-1, étape a*). La face trans est la zone de sortie des vésicules. Chez les cellules neuroendocrines, les propriétés agrégatives des protéines destinées à se retrouver au sein des granules (comme la chromogranine A ou B), ainsi que leur propension à interagir avec les membranes du réseau trans-golgien entraînent la formation de bourgeons³¹ (*Figure B-1, étape b*). Ces bourgeons sont ensuite fermés pour créer les granules de sécrétions immatures.³⁰ Lors de la phase de maturation (*Figure B-1, étape c*), les granules de sécrétion sont remplis d'hormones, synthétisées dans le cytoplasme, telles que les monoamines (adrénaline, sérotonine, ...), de molécules d'ATP, d'acide ascorbique et d'ions calcium. Ce remplissage se fait par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques situés sur la membrane granulaire³² qui déplacent les espèces contre le gradient de concentration en utilisant de l'énergie sous la forme d'ATP. Suite à un processus de condensation, le contenu vésiculaire, constitué d'une matrice à cœur protéique devient extrêmement dense et assure la cohésion des plus petites molécules.^{33, 34} En effet, dans les conditions de pH intravésiculaire (environ 5,5), les neurotransmetteurs de types monoamines (catécholamines, sérotonine, histamine, acide γ -aminobutyrique (GABA) ...) se trouvent sous forme protonée et compensent les charges négatives des protéines de la matrice. Des liaisons électrostatiques et hydrogène³⁵ permettent d'assurer la cohésion de l'ensemble en équilibre osmotique. C'est cette condensation qui permet de stocker ces molécules à haute concentration (par exemple, chez les cellules chromaffines, les catécholamines sont stockées à environ 550 mmol.L^{-1} , l'ATP à 120 mmol.L^{-1} , les ions calcium à environ 25 mmol.L^{-1} ...).³⁶

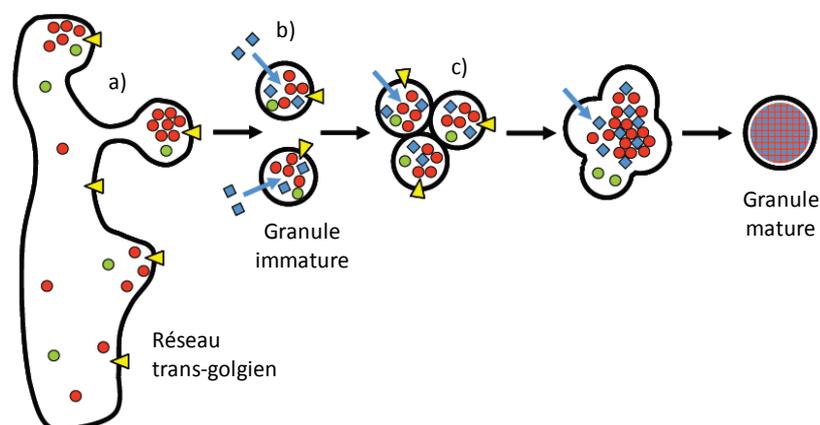


Figure B-1 : Biogénèse et maturation des granules de sécrétion. a) Agrégation des protéines destinées à se retrouver au sein des granules, au niveau du réseau trans-golgien. b) Formation des granules immatures par bourgeonnement. c) Maturation des granules de sécrétion : fusion de granules immatures et accumulation de molécules à travers la membrane.³¹

I.1.3. Migration des granules de sécrétion vers la membrane plasmique

Afin d'être rapidement mobilisables, les granules de sécrétion sont accumulés au voisinage de la membrane plasmique. Leur transport de l'appareil de Golgi à la périphérie de la cellule ainsi que leur rétention se fait par l'intermédiaire de nanomoteurs à kinésine suivant le cytosquelette, lui-même constitué de microtubules et de filaments d'actine.

Les microtubules, formés de filaments protéiques sont responsables du mouvement des granules au sein de la cellule. Par exemple, la kinectine, une protéine membranaire du réticulum endoplasmique, fixe les granules à une protéine motrice nommée kinésine. Celle-ci entraîne alors les granules le long des microtubules en direction de la périphérie de la cellule (*Figure B-2*). Une fois au voisinage de la surface cellulaire, les filaments d'actine, particulièrement denses dans cette zone,³⁷ permettent la rétention des vésicules à proximité de la membrane.³⁸ Le transport des granules de sécrétion se produit alors que ceux-ci semblent encore immatures,³⁸ la maturation ayant lieu par la suite lors du parcours sur le réseau d'actine.

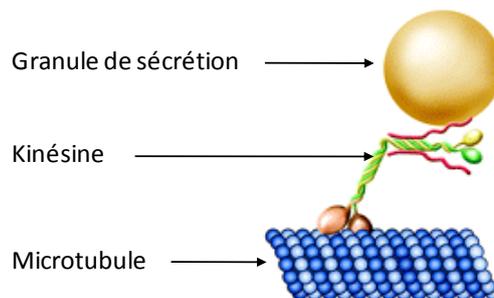


Figure B-2 : Déplacement des granules de sécrétion le long des microtubules.³⁹

I.1.4. Accrochage des granules de sécrétion à la membrane plasmique

Les membranes biologiques ne fusionnent pas spontanément. En effet, toutes deux constituées de bicouches lipidiques chargées négativement, les membranes granulaires et plasmiques ont tendance à se repousser. Leur fusion exige donc l'annulation, tout au moins la minimisation de ces forces de répulsion, et pour cela, plusieurs familles de protéines semblent être mises en jeu.

La première étape de ce mécanisme, l'**arrimage**, fait notamment intervenir les protéines Rab, petites GTPases qui, en se liant avec du GTP, viennent s'ancrer à la membrane granulaire. L'association Rab/GTP permet alors à la vésicule de se fixer spécifiquement à la membrane cible (*Figure B-3, étape a*). Cependant, le mécanisme de cette association relativement lâche (tethering) est encore mal compris.³⁰

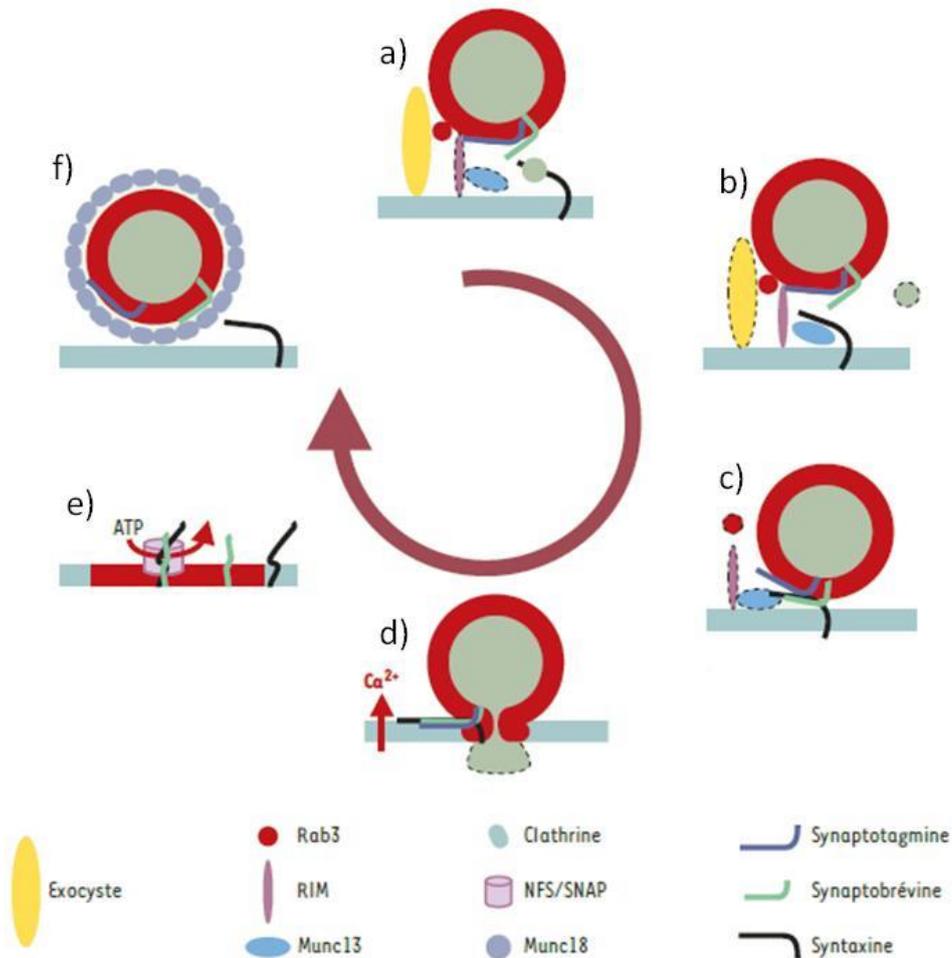


Figure B-3 : Modèle du cycle de fusion des vésicules synaptiques. a) Arrimage ; b) Amorçage ; c) Assemblage du complexe SNARE ; d) Fusion des membranes ; e) Dissociation du complexe SNARE ; f) recyclage par endocytose.⁴⁰

Les protéines clés participant à la deuxième étape, l'**amorçage** (Figure B-3, étape b), sont appelées protéines SNAREs (pour Soluble NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) Attachment Protein Receptor). Parmi elles, les v-SNAREs (v pour vesicle) s'incorporent aux membranes vésiculaires pendant le bourgeonnement des granules et les t-SNAREs (t pour target) sont localisées dans la membrane plasmique. Les SNAREs les mieux caractérisées sont celles intervenant dans l'amorçage des vésicules synaptiques à la membrane pré-synaptique lors de la libération des neurotransmetteurs.⁴¹ Dans ce cas, la membrane plasmique de la cellule nerveuse contient deux t-SNAREs : la syntaxine et SNAP 25 (Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa) alors que la membrane vésiculaire ne contient qu'un seul v-SNARE, la synaptobrévine (ou VAMP-2 : Vesicle Associated Membrane Protein) (Figure B-4).

Ces protéines sont capables de s'associer au sein d'un complexe protéique appelé complexe SNARE (Figure B-3, étape c). La mise en place de ce complexe implique des motifs particuliers,

appelés motifs SNAREs, présents sur chacune de ces trois protéines. C'est en effet l'association des motifs SNAREs, initialement peu structurés, pour former un complexe très stable de quatre hélices parallèles, qui permet le rapprochement des membranes.⁴²

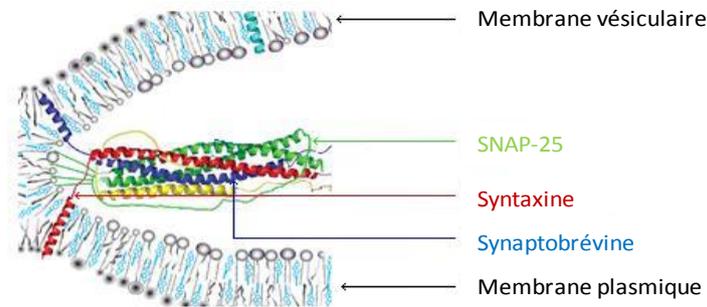


Figure B-4 : Association des protéines du complexe SNARE des vésicules synaptiques.

Après la fusion des membranes et la libération du contenu vésiculaire (*Figure B-3, étape d*), le complexe SNARE devient le récepteur des protéines NSF et SNAP qui entraîne sa dissociation (*Figure B-3, étape e*). Enfin, l'endocytose est déclenchée pour recycler les vésicules synaptiques et leurs constituants membranaires (*Figure B-3, étape f*).

I.1.5. Fusion membranaire

Comme mentionné précédemment, la fusion membranaire, déclenchée par une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, est un phénomène finement contrôlé. Cependant, son déroulement exact ainsi que les paramètres qui le gouvernent sont aujourd'hui encore sujets à controverse. Par exemple, deux hypothèses ont été proposées pour décrire la fusion entre les membranes vésiculaires et cellulaires mettant en jeu un pore de fusion lipidique ou protéique.

a) Pore de fusion lipidique

Dans cette hypothèse, la structure intermédiaire de fusion, de nature lipidique, serait le « stalk » ou pédoncule⁴³ (*Figure B-5*). La première étape de ce mécanisme consisterait à rapprocher les membranes destinées à fusionner jusqu'à des distances de l'ordre de quelques nanomètres entre les deux feuilletts lipidiques proximaux (ceux tournés vers le cytoplasme). En raison de la répulsion électrostatique des deux membranes due aux têtes polaires des lipides, il est possible que cette étape de rapprochement fasse intervenir le complexe SNARE, capable de tirer les deux

membranes l'une vers l'autre. Les deux feuilletts entrant alors en contact, forment un pédoncule lipidique^{44, 45} qui, en s'étirant conduit à un état d'hémifusion.⁴⁶⁻⁴⁸ A ce stade, les feuilletts distaux sont toujours disjoints et par conséquent, les échanges entre le compartiment intragranulaire et le milieu extracellulaire sont bloqués. Un pore de fusion de diamètre de l'ordre de quelques nanomètres est ensuite créé, permettant la communication entre les deux compartiments.⁴⁹

Même si le complexe SNARE semble être nécessaire au rapprochement des membranes et donc être un acteur majeur du processus d'ouverture du pore, d'autres protéines pourraient également favoriser cette ouverture. Par exemple, la synaptotagmine, protéine transmembranaire des vésicules synaptiques, semble être l'une des protéines sensibles au calcium impliquées dans cette régulation. En effet, l'augmentation de calcium stimule l'interaction de la synaptotagmine avec le complexe SNARE, déclenchant ainsi la fusion des membranes.⁵⁰

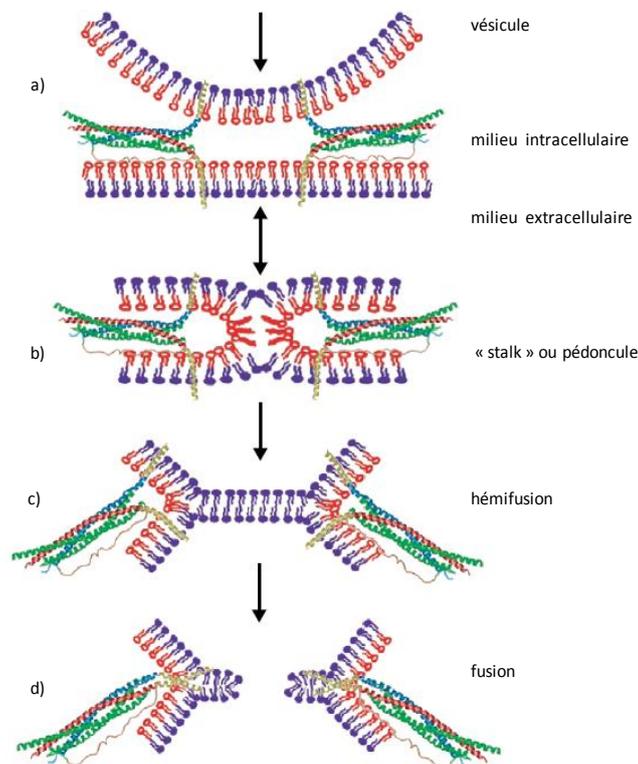


Figure B-5 : Formation du pore de fusion lipidique. a) Rapprochement des deux membranes ; b) Formation du pédoncule lipidique ; c) Hémifusion ; d) Formation d'un pore de fusion lipidique.

b) Pore de fusion protéique

Un mécanisme faisant intervenir un pore de nature protéique a également été suggéré à la suite des travaux réalisés dans le groupe de A. Mayer (*Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Allemagne*) sur la fusion vacuolaire dans la levure. Dans ce modèle, le

complexe SNARE joue un rôle lors du rapprochement des deux membranes. Il permet alors l'assemblage des vecteurs V_0 de l'ATPase vacuolaire positionnés sur chacune des membranes destinées à fusionner (*Figure B-6*).

C'est alors le complexe V_0 - V_0 qui entraîne la création d'un canal protéique traversant les deux membranes. Un flux de calcium peut ensuite déclencher un changement de conformation des protéines de ce complexe et ouvrir le pore. L'expansion de ce pore se fait alors par séparation latérale de ses sous-unités par l'intermédiaire de l'invasion des lipides membranaires.⁵¹

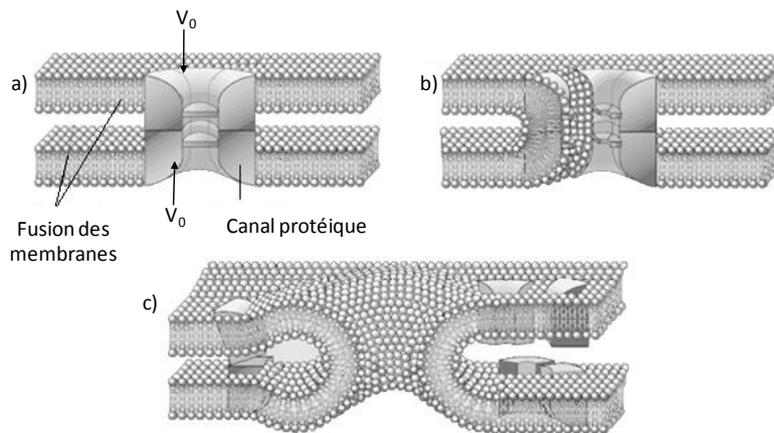


Figure B-6: Formation du pore de fusion protéique. a) Formation d'un canal protéique ; b) Insertion des lipides au sein du canal ; c) Ouverture du pore de fusion.

Adapté de : Biochimie, D. Voet, J. G. Voet, Edition De Boeck

Chez la plupart des modèles cellulaires utilisés pour l'étude de l'exocytose, une matrice polyelectrolytique, au sein des granules de sécrétion, permet de stocker les monoamines à haute concentration (environ $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$). Même si cette matrice diffère selon les modèles cellulaires (chromogranine chez les cellules chromaffines, protéoglycane chez les mastocytes, complexe de zinc chez les cellules β pancréatiques...), sa structure est très compacte et les granules sont alors appelés « dense core » ou à cœur dense. Quelle que soit la nature du pore de fusion, la libération du contenu vésiculaire est accélérée par le gonflement de cette matrice. Par exemple, chez les cellules chromaffines, une fois le milieu intravésiculaire et le milieu extracellulaire en contact, l'entrée d'eau, accompagnée d'échanges d'ions (protons, ions calcium ou ions sodium viennent remplacer les catécholamines) entraîne le gonflement de la matrice interne et l'expansion du pore de fusion (*Figure B-7*). De manière générale, soit l'ouverture du pore exacerbée par le gonflement de la matrice permet la libération de la totalité du contenu du granule de sécrétion dans le milieu extracellulaire, la membrane granulaire fusionnant alors complètement avec la membrane plasmique (**fusion totale**), soit l'ouverture du pore n'est que transitoire et le pore se referme après que le granule a libéré seulement une partie de son

contenu (**fusion partielle**). Parmi les fusions partielles, on peut différencier la cavapture,^{22,52} au cours de laquelle le pore de fusion peut s'ouvrir et se fermer plusieurs fois avant de se refermer définitivement (« flickering »), le mécanisme de « kiss-and-run » au cours duquel le pore de fusion se referme rapidement après avoir libéré une petite quantité de molécules^{53, 7, 54} ou encore, le « kiss-and-stay » ou « kiss-and-hold » pendant lequel le pore de fusion reste stable plus longtemps et fini par se refermer.^{55,56}

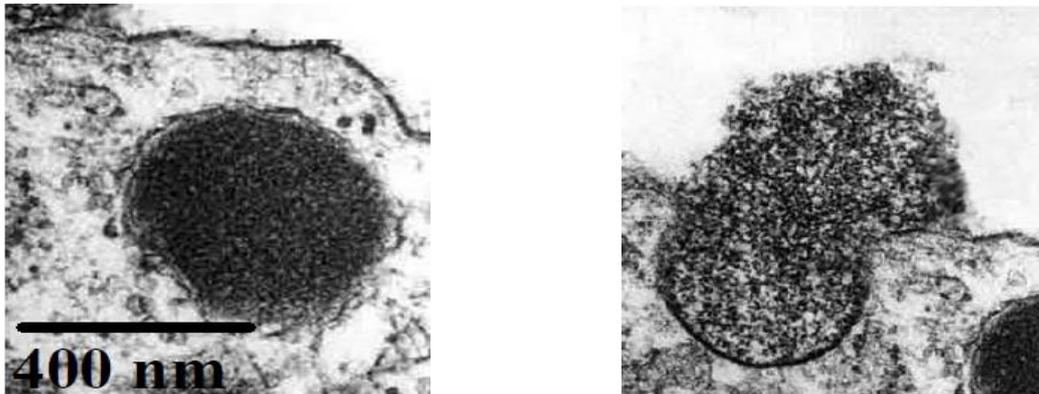


Figure B-7 : A gauche, photographie en microscopie électronique à balayage d'un granule de cellule chromaffine à l'approche de la membrane cellulaire. La matrice interne apparaît dense aux électrons. A droite, sécrétion d'un granule. La matrice apparaît comme gonflée et déstructurée.

Le schéma global de ce mécanisme a bien été identifié, mais de nombreuses questions restent en suspens. Par exemple :

- Comment le taux de molécules libérées est-il contrôlé ?
- Les concentrations intragranulaires sont-elles constantes ?
- La fusion est-elle partielle ou totale ?
- Comment la stabilité du pore de fusion est-elle régulée ?
- Quels sont les facteurs de contrôle prédominants ? Sont-ils d'origine biologique et/ou physicochimique ?
- Peut-on et comment détecter le « kiss-and-run » avec fiabilité ?

Pour répondre à ces questions, trois grandes classes de techniques analytiques sont classiquement utilisées : l'électrophysiologie, l'électrochimie et la microscopie.

I.II. Techniques analytiques utilisées : avantages et inconvénients

Il existe de nombreuses techniques permettant l'étude de la sécrétion (chromatographie, électrophorèse capillaire, spectrométrie de masse...). Parmi ces techniques, les méthodes

électriques et optiques sont utilisées pour des analyses à l'échelle de la cellule unique et offrent la possibilité de mesurer la sécrétion en temps réel avec une excellente résolution : inférieure à la milliseconde en électrophysiologie et en ampérométrie et de l'ordre de la dizaine de millisecondes pour les méthodes optiques.^{22, 54, 57} Les modèles cellulaires classiquement utilisés pour ces études sont les neurones géants,⁵⁸ les cellules chromaffines,²² les mastocytes,⁵⁹ les PC12⁶⁰ et les cellules β du pancréas.⁶¹

I.II.1. Technique électrophysiologique : le patch-clamp

La technique du patch-clamp a été introduite par Erwin Neher et Bert Sakmann (prix Nobel en 1991) en 1976 pour l'étude électrophysiologique des canaux ioniques.⁶² Elle a depuis connu de nombreuses évolutions permettant de comprendre comment les canaux ioniques modifient le potentiel transmembranaire (la différence de potentiel entre la face interne et la face externe de la membrane plasmique), et comment ils gouvernent certaines activités cellulaires telles que l'exocytose vésiculaire.

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, la membrane cellulaire agit comme une barrière sélective dans le maintien de l'équilibre entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. Elle est constituée de phospholipides assemblés en double feuillet. La tête polaire hydrophile des lipides est orientée vers l'extérieur de la membrane et leur queue, hydrophobe est orientée vers l'intérieur. Cette association rend la membrane imperméable aux molécules chargées. Cependant, des protéines, encastrées au sein de la membrane, constituent des canaux ioniques qui permettent aux ions de la traverser. Chaque canal peut être traversé par un flux ionique élevé, de l'ordre de 10^6 ions par seconde, générant alors un courant électrique. Ce courant, de faible intensité (environ 1 pA) ne peut être mesuré s'il reste noyé dans le bruit lié à l'activité globale de la cellule, et en particulier celui lié aux variations de charges au voisinage de la membrane. C'est sur ce principe que repose le patch clamp. **Cette technique consiste en effet à enregistrer l'activité électrique d'un fragment de membrane cellulaire isolée électriquement de la surface cellulaire.**

a) Les différentes configurations de mesure

Expérimentalement, une micropipette de verre de diamètre de l'ordre de quelques microns est placée en contact avec la membrane cellulaire. Le capillaire de verre est ensuite scellé à la membrane en imposant une dépression en son sein. La légère aspiration permet d'augmenter la résistance de la jonction pipette/cellule jusqu'au gigaohm (ce scellement pipette/cellule est

couramment nommé « gigaseal ») et ainsi isoler électriquement le fragment de la membrane contenu dans la pipette. Cette forte résistance permet d'améliorer le rapport signal sur bruit et d'alors enregistrer des courants de l'ordre du picoampère. Cette configuration, appelée « cellule attachée » permet l'enregistrement de l'activité de seulement quelques canaux ioniques contenus dans la partie de membrane isolée. L'étude des propriétés chimiques et électriques de ces canaux est alors possible. La mesure de courant à potentiel fixé permet de détecter la conductance du canal ainsi que sa sélectivité ionique.

La technique du patch-clamp sert non seulement à étudier le fonctionnement des canaux membranaires, mais une évolution de la technique permet l'analyse de la transmission des signaux à l'échelle cellulaire. Pour cette application, d'autres configurations, dérivées de la « cellule attachée » sont utilisées (Figure B-8). La configuration « cellule entière » permet d'étudier la totalité de la surface cellulaire. A partir de la configuration « cellule attachée », le morceau de membrane contenu dans le capillaire de verre (« patch ») est aspiré et rompu mécaniquement. Il est également possible, pour se rapprocher des conditions physiologiques et éviter la dialyse de la cellule, de seulement perforer la membrane (par ajout d'un antibiotique par exemple) en configuration « cellule attachée ». ⁶³ La configuration « patch excisé » s'obtient en séparant la cellule de la pipette. Le patch de membrane reste fixé à la pipette et sa face intracellulaire est dirigée vers l'extérieur. Cette configuration est appelée « inside-out ». Enfin, la configuration « outside-out » s'obtient à partir de la configuration « patch excisé » en éloignant la pipette et en incisant la membrane qui, en se rabattant, referme l'orifice de la pipette en orientant sa face extracellulaire vers l'extérieur. Dans ces deux dernières configurations, « inside-out » et « outside-out », l'expérimentateur a ainsi accès au fonctionnement des canaux membranaires depuis le cytoplasme ou le milieu cellulaire.

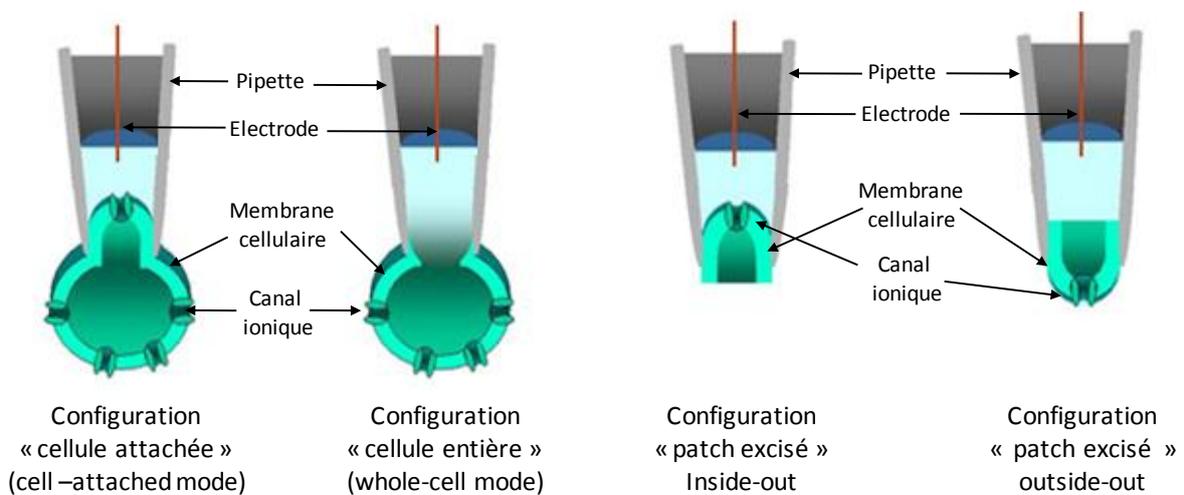


Figure B-8 : Différentes configurations utilisées en patch clamp.

Adapté de : <http://research.nki.nl/jalinklab/Homepage%20Phys&ImgGrp%20Patchclamp.htm>

De par sa structure et l'existence d'un gradient de concentration ionique de part et d'autre de la membrane, cette dernière possède une capacité dite capacité membranaire. De plus, la bicouche lipidique, relativement imperméable, présente une grande résistance. En tenant compte de la résistance de la solution, l'ensemble est alors assimilé à un circuit équivalent de type RC (la disposition des éléments du circuit dépend de la configuration expérimentale choisie). Lors des mesures, il est alimenté par une tension le plus souvent sinusoïdale. Le courant mesuré est alors également de forme sinusoïdale, de même fréquence, mais d'amplitude et de phase différentes. Basées sur les techniques d'impédances, les expériences consistent donc à déterminer les valeurs de résistance (donc de conductance) et de capacité du circuit équivalent correspondant au signal recueilli. La capacité déterminée, proportionnelle à la surface cellulaire, apporte des informations sur l'évolution de cette surface et, la conductance mesurée reflète la facilité avec laquelle les ions traversent les canaux. Comme nous le verrons plus bas, ces deux informations permettront de détecter des événements d'exocytose isolés ainsi que les pores de fusion.

b) Etude du mécanisme d'exocytose par patch-clamp

La résolution temporelle de la technique, de l'ordre de la milliseconde, est compatible avec la mesure en temps réel du mécanisme d'exocytose.⁶⁴ Lors d'un événement exocytotique, la membrane granulaire est incorporée totalement ou en partie à la membrane cellulaire. Il en résulte une augmentation de la surface cellulaire totale qui se traduit par une augmentation de la capacité sous forme d'une marche (*Figure B-9*) (facteur de conversion capacité/surface : $10 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$).

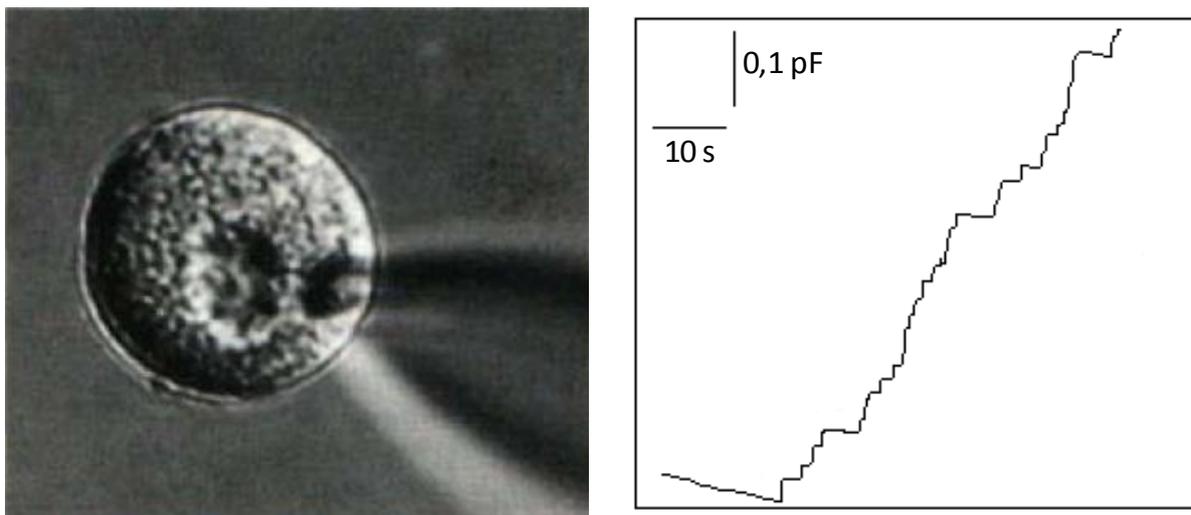


Figure B-9 : A gauche, mastocyte sécrétant de l'histamine. A droite, exemple de changement de capacité électrique membranaire résultant de la fusion d'un granule avec la membrane plasmique.

*Chaque fusion provoque une nouvelle marche de capacité membranaire.*⁵⁹

Cette technique, utilisée pour l'étude de l'exocytose des cellules chromaffines,^{64, 65} a ensuite été appliquée à de nombreux modèles cellulaires comme les cellules β du pancréas,⁶⁶ les neutrophiles,⁶⁷ les mastocytes^{59, 66, 68}... Lors de l'étude des cellules chromaffines en configuration « cellule entière », le patch clamp a permis de mettre en évidence une augmentation de la capacité membranaire globale (2,6 à 6 pF)⁶⁴ suite à la stimulation de la cellule. Cependant, dans la plupart des cas, une fréquence de sécrétion élevée et un rapport signal sur bruit moyen ne conduisent qu'à mesurer une augmentation globale de la capacité empêchant alors de discriminer les différents événements se produisant à la surface de la cellule. En effet, la taille des vésicules des cellules chromaffines (diamètre de l'ordre de 0,2 à 0,3 μm) n'est pas suffisamment élevée pour visualiser des « marches » de capacité. Par contre l'étude de la sécrétion des mastocytes, dont les granules géants ont un diamètre de l'ordre de 2,5 μm , a permis de visualiser facilement des « marches » de capacité de l'ordre de 0,1 à 0,8 pF.⁶⁸

Des avancées remarquables ont néanmoins été réalisées en étudiant la sécrétion des cellules chromaffines en configuration « cellule attachée ». Afin de bénéficier complètement de l'excellente résolution temporelle de la technique, la stimulation des cellules doit être correctement synchronisée avec la détection. Outre la stimulation électrique, l'utilisation de molécules capables d'emprisonner des molécules de calcium (« calcium cagé ») et de les libérer suite à un flash de lumière ultraviolette permet d'augmenter quasi-instantanément la concentration intracellulaire de calcium, déclenchant la sécrétion régulée des cellules endocrines.²⁹ L'utilisation de ce mode de stimulation a alors permis une étude fine de **l'influence de l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium** sur la sécrétion.^{69, 70}

Le patch-clamp a également permis de mettre en évidence l'existence de **deux phases de cinétique différente au cours de la sécrétion**.^{29, 71, 72} La libération du contenu vésiculaire est caractérisée par une première phase très courte, de quelques centaines de millisecondes à quelques secondes selon les modèles cellulaires, au cours de laquelle la fréquence de sécrétion est très élevée. Au contraire, au cours de la seconde phase, plus longue (de quelques dizaines de secondes à plusieurs minutes), la fréquence de sécrétion est plus faible. Néanmoins, vu sa durée, le nombre d'événements d'exocytose se déroulant lors de la seconde phase est cependant supérieur au nombre d'événements se déroulant lors de la première phase.

Bien que le patch-clamp permette de mesurer les changements de capacité correspondant à l'ensemble des événements se produisant sur la surface totale de la cellule, cette technique n'offre pas la possibilité de localiser les sites de libération. Ainsi, des mesures de capacitance couplées à une détection en microscopie électronique ont permis d'attribuer ces deux phases de cinétiques différentes à deux types de granules. Les granules fusionnant lors de la première phase sont ceux initialement accrochés à la membrane plasmique alors que ceux fusionnant lors

de la deuxième phase sont ceux qui ont une position plus reculée au sein du cytoplasme au moment de la stimulation.⁶⁸ Par la suite, la première phase a également été décomposée et interprétée plus finement comme étant la réponse de deux populations granulaires.⁷³ La première population correspond à une petite quantité de granules totalement prêtes pour l'exocytose (« Readily Releasable Pool ») suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, alors que la deuxième population est constituée de granules dont l'amorçage n'est pas terminé. La différence sur le statut de ces deux populations est encore controversée : elle pourrait être due au complexe SNARE plus ou moins fermé^{74, 75} ou à différents isoformes de la synaptotagmine, protéine du complexe SNARE, plus ou moins sensibles au calcium.⁷⁶

D'autre part, la technique de « **patch-ampérométrie** » combine les mesures de capacité en configuration « cellule attachée » et la détection ampérométrique en introduisant une électrode de carbone au sein de la pipette de patch même si la distance électrode/membrane est alors grande et difficilement contrôlable, d'où une perte de résolution cinétique. Il est alors possible de détecter des « marches » de capacité chez les petites cellules comme les cellules chromaffines (« marches » de 0,3 à 12 fF).⁵⁷ Il a ainsi été montré que l'augmentation de la capacité, signe de la création du pore, pouvait ne correspondre à aucun courant ampérométrique, signe de l'absence de sécrétion. Il est donc possible que le pore se referme (diminution de la capacité) avant la libération du contenu vésiculaire (fusion partielle ou « kiss-and-run »).^{57, 63} Ce phénomène a également été observé en couplant les mesures de capacité à la microscopie optique. Dans la majorité des cas, une fois le pore créé, il s'élargit rapidement (< 10 ms). Il a cependant été remarqué que le pore peut s'ouvrir et se fermer plusieurs fois avant de se refermer définitivement (« flickering »). Dans un premier temps, la fusion semble donc réversible. D'autre part, le couplage de ces deux techniques (patch-clamp et microscopie optique) a également montré que le gonflement de la matrice vésiculaire se produit après l'augmentation de capacité et n'est donc pas responsable de la formation du pore initial de fusion. Ce gonflement serait ainsi déclenché par l'entrée de solutés à travers le pore de fusion déjà ouvert qui entrainerait son expansion.⁷⁷

Enfin, une fois le pore de fusion créé, la connexion entre le milieu intragranulaire et le milieu extracellulaire est établie et la surface de membrane granulaire incorporée contribue à la mesure de capacité. Il est alors possible d'estimer la taille du granule ayant fusionné. Cette donnée, ajoutée à la mesure de la conductance du pore de fusion, a permis d'estimer la taille du pore de fusion. Chez les mastocytes de souris beiges⁶⁸ et chez les cellules chromaffines,⁵⁷ la conductance moyenne est de 300-400 pS, ce qui correspond à un **pore de fusion initial de l'ordre de 1 à 2 nm de diamètre.**

c) Conclusion

Le patch-clamp, grâce à son excellente résolution, a apporté de nombreux renseignements, en particulier sur le rôle du calcium dans la régulation de la fusion. Couplée à l'ampérométrie, cette technique a également permis la mise en évidence du pore de fusion, l'observation de sa dynamique et la détermination de sa taille (quelques nanomètres). Enfin, combinée à la microscopie de fluorescence, elle a également permis de distinguer différentes populations granulaires différenciées par leur cinétique de fusion. Cependant, au-delà du stress mécanique qu'il impose à la cellule étudiée, les principales limitations du patch-clamp sont liées à l'absence d'informations sur le contenu granulaire libéré et sur la localisation des événements. Ainsi, dans le cadre de l'étude de l'exocytose, le patch-clamp ne permet pas d'étudier un événement dans sa globalité, d'où la nécessité de le coupler, comme nous l'avons présenté précédemment à l'ampérométrie⁵⁷ ou à la microscopie de fluorescence.⁷⁸ Par ailleurs, à travers l'évaluation de la surface cellulaire, cette technique est également sensible aux événements d'endocytose.⁶³ L'étude de ce phénomène d'internalisation de la membrane est particulièrement utile pour peu qu'il se produise à des cinétiques plus lentes que l'exocytose. C'est généralement le cas (supérieur à 1 seconde) même si la superposition des signaux endo- et exocytotiques peut alors engendrer la sous-estimation de la contribution de l'exocytose. On notera que l'association du patch-clamp à d'autres analyses en temps réel n'est pas qu'une question de suivi de la totalité d'un événement mais permet également de vérifier que la marche de capacité correspond bien à un événement exocytotique. En effet, les modifications de la surface membranaire ne sont pas réduites à l'exocytose ou à l'endocytose mais peuvent impliquer simultanément d'autres processus (capacité des canaux ioniques).⁷⁹

I.II.2. L'ampérométrie

L'ampérométrie sur UME à fibre de carbone est une **technique électrochimique basée sur l'oxydation à la surface de l'électrode des molécules libérées par une cellule unique**. Elle consiste à fixer le potentiel de l'électrode de travail à une valeur pour laquelle la molécule à détecter est oxydée et à approcher cette dernière de la cellule émettrice. Cette technique, mise au point par R. M. Wightman et C. Amatore,^{21, 22} permet la détection de quelques milliers de molécules par seconde avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde à condition que les espèces libérées par la cellule soient électroactives. Les modèles les plus étudiés sont les cellules chromaffines,^{22, 80-83} qui libèrent des catécholamines telles que la noradrénaline et l'adrénaline, les PC12,^{81, 84, 85} dont les vésicules contiennent de la dopamine, les mastocytes,^{83, 86, 87} libérant de l'histamine et de la sérotonine, les cellules β du pancréas⁸⁸⁻⁹⁰ qui sécrètent de l'insuline, les neurones dopaminergiques⁵⁸... Cette technique, plus facile à mettre

en œuvre expérimentalement que le patch-clamp, permet d'étudier la cinétique des événements de libération car chaque pic ampérométrique détecté correspond à la libération en temps réel d'une vésicule unique.^{21,22}

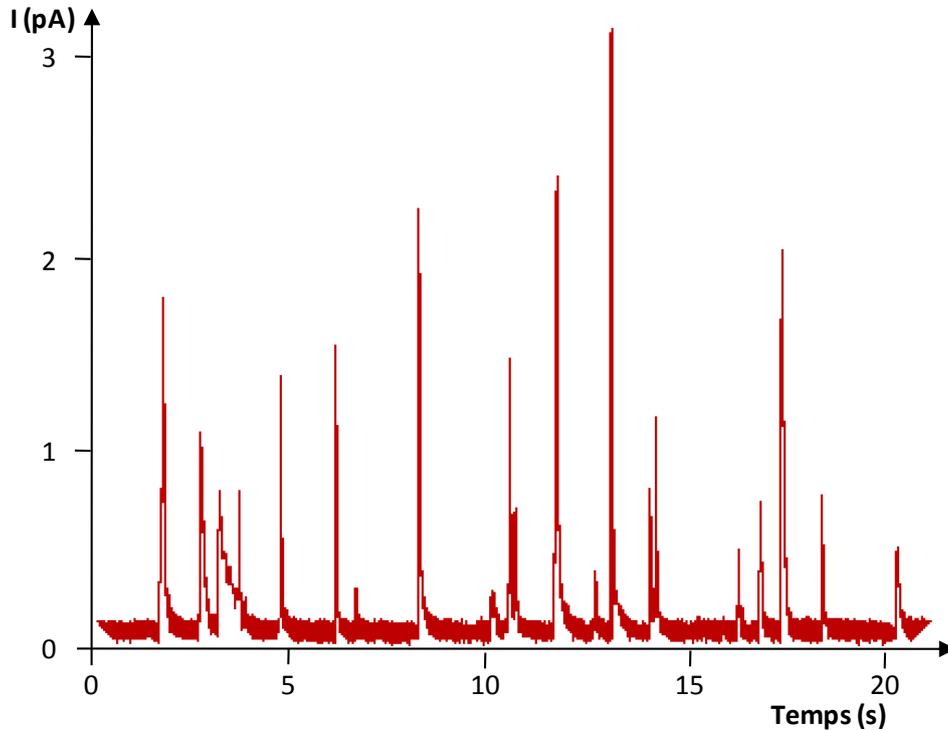


Figure B-10 : Exemple d'un signal ampérométrique. Chaque pic correspond à la fusion d'un granule de sécrétion.

a) L'exocytose vue par ampérométrie

La forme du pic reflète la cinétique de libération des molécules d'une vésicule unique et permet d'étudier les étapes successives de la libération du contenu intravésiculaire (*Figure B-11*).

Comme cela a été décrit plus haut, le granule vient, dans un premier temps, s'arrimer à la membrane cellulaire (*Figure B-11, étape a*) et entraîne la formation d'un pore de fusion (*Figure B-11, étape b*) à travers lequel les molécules commencent à diffuser. Dans certains cas, cette étape se traduit par la présence d'un plateau ou d'une rampe de courant dit « pied de pic ». L'expansion du pore (*Figure B-11, étape c*) (exacerbée par l'altération puis le gonflement de la matrice intragranulaire pour les granules à cœur dense) se reflète sous la forme du pic ampérométrique proprement dit. La montée du pic (*Figure B-11, étape d*) est directement liée à l'ouverture du pore de fusion. La décroissance du courant, plus lente, est limitée par la diffusion des espèces dans la matrice en expansion (*Figure B-11, étape e*).³⁵

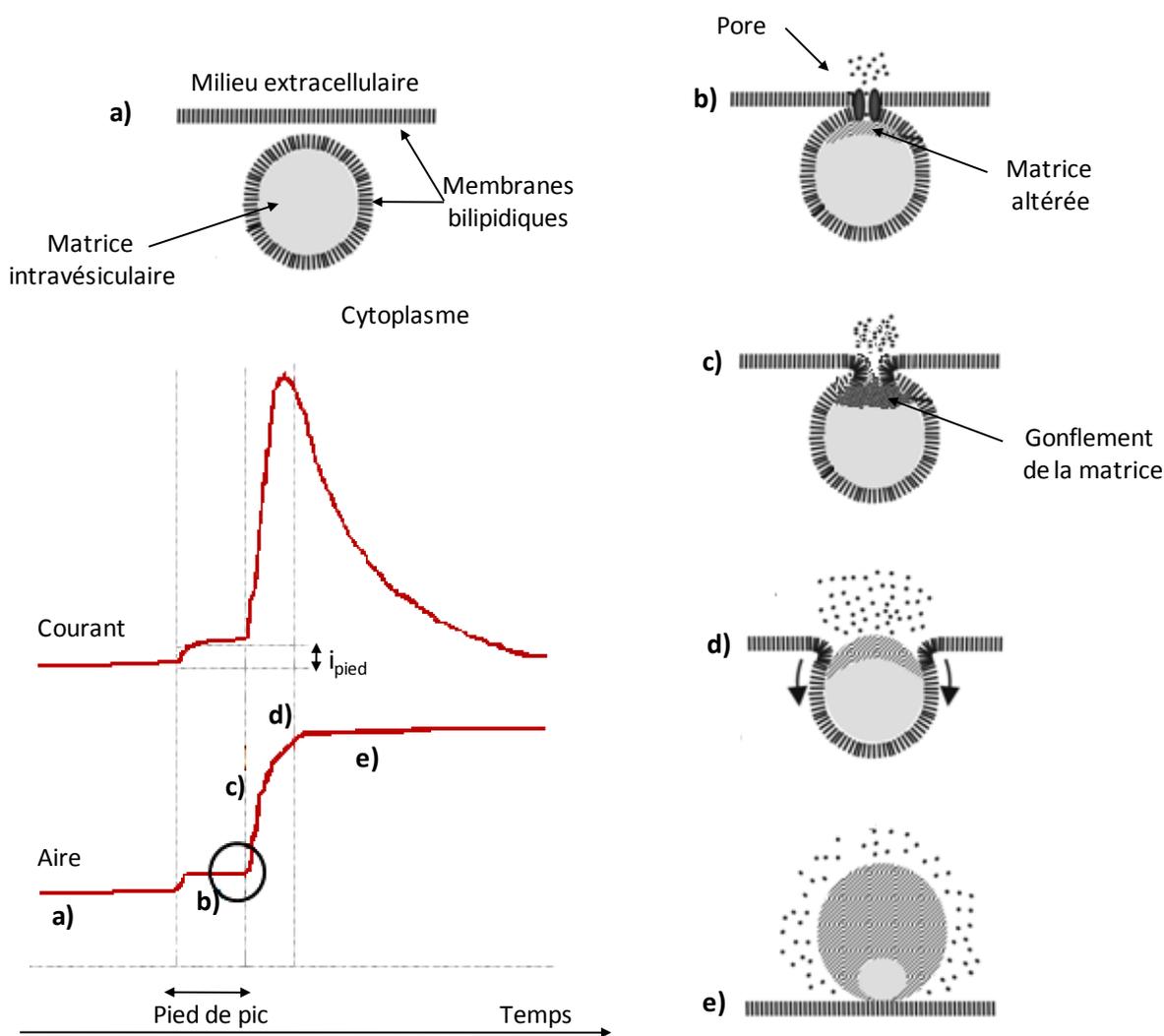


Figure B-11 : Etapes successives de la libération du contenu vésiculaire.³⁵

Outre sa cinétique, donnée par celle du courant, la dynamique du phénomène d'exocytose est caractérisée quantitativement à l'aide des paramètres suivants¹² (Figure B-12) :

- L'aire du pic (Q), représentant la charge coulométrique des espèces oxydées à l'électrode, est proportionnelle à la quantité de molécules libérées d'après la loi de Faraday.
- L'intensité maximale du pic (I_{\max}) représente le flux maximal de molécules sécrétées lors d'un événement.
- La largeur du pic à mi-hauteur ($t_{1/2}$), qui peut être décomposée en t_1 et t_2 , renseigne sur la cinétique globale du phénomène.
- Le temps de montée de pic ($t_{20/90}$) est relié à l'ouverture du pore et au temps de découverte de la matrice intragranulaire.

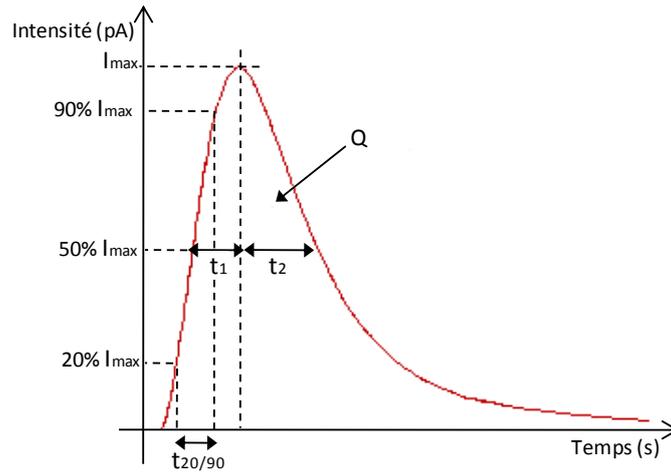


Figure B-12: Pic ampérométrique correspondant à la libération de molécules électroactives par une vésicule de sécrétion lors de l'exocytose et dont les caractéristiques (I_{max} , Q , t_1 , t_2 , $t_{1/2}$ et t_{20-90}) sont représentées graphiquement.

b) Etude globale du mécanisme : contribution de l'analyse ampérométrique

L'ampérométrie sur UME permet l'étude des variations temporelles du courant, directement liées à la mesure du flux de molécules libérées. Dans ce contexte, un nombre conséquent d'études a été mis en œuvre dans le but d'améliorer la compréhension de l'exocytose. Bien que non exhaustive, cette section recense les résultats les plus marquants.

Mise en évidence de plusieurs populations vésiculaires

L'ampérométrie sur UME a contribué à mettre en évidence l'existence de **plusieurs populations vésiculaires**. Si on estime la concentration granulaire constante,^{91, 92} la charge ampérométrique détectée pour chaque événement d'exocytose est alors corrélée à la taille de la vésicule. En effet, en associant la définition de la concentration à la loi de Faraday, on peut montrer que le rayon de la vésicule est proportionnel à la racine cubique de la charge (*Equation B-1*).²² Ainsi, l'analyse de la distribution de la racine cubique des charges permet d'évaluer la distribution de la taille des vésicules.

$$r = \sqrt[3]{\frac{3Q}{8\pi FC_{ves}}} \quad \text{Equation B-1}$$

La distribution bimodale des charges ($Q^{1/3} = 0,4 \text{ pC}^{1/3}$ et $Q^{1/3} = 0,7 \text{ pC}^{1/3}$)⁹² suggère alors l'existence d'au moins deux populations granulaires chez les cellules chromaffines de souris (*Figure B-13*).

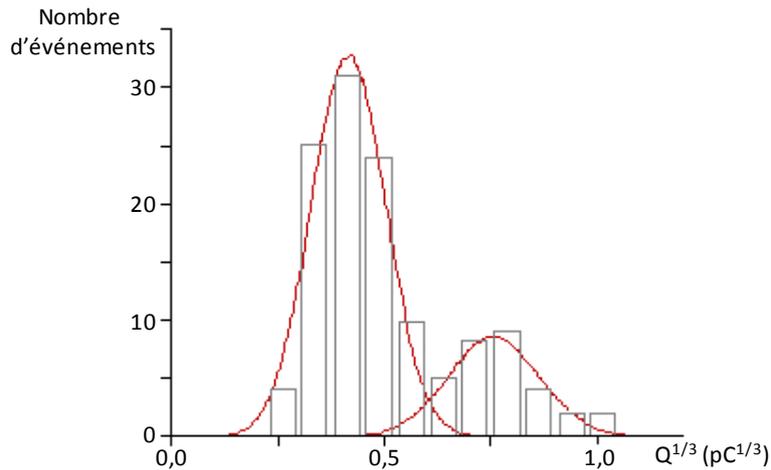


Figure B-13 : Représentation bimodale de la racine cubique de charge des pics ampérométriques obtenus lors de la sécrétion de cellules chromaffines de souris.⁹²

Cette distribution a pu être corrélée à celle des tailles vésiculaires obtenues par microscopie électronique. Ce résultat confirme que la concentration vésiculaire varie bien moins que le rayon vésiculaire, en accord avec d'autres études ampérométriques effectuées sur PC12⁸⁴ ou sur cellules chromaffines bovines,³⁵ ce qui justifie l'hypothèse faite.

En modifiant l'osmolarité du milieu extracellulaire, la morphologie de distribution des charges est modifiée. Les deux populations initialement observées restent centrées sur les mêmes valeurs de charge, mais la proportion de chaque population est altérée. Il semble alors que la fusion des granules plus petits soit favorisée en conditions isotoniques alors que les granules plus gros semble fusionner préférentiellement en conditions hypotoniques.⁹³ L'existence de deux populations n'est cependant pas limitée aux cellules chromaffines et a également été observée chez les neurones d'escargots (*Planorbis corneus*) libérant de la dopamine. L'étude ampérométrique de leur sécrétion a montré que la concentration en amphétamines avait un effet sur le type de vésicules fusionnant. A concentration en amphétamine faible, la fusion des plus grosses vésicules est favorisée.⁹⁴ De même, la détection de l'exocytose dans des neurones de type Retzius montre une distribution bimodale de $Q^{1/3}$ représentant deux populations.⁹⁵ Actuellement, la présence d'une troisième population est même suspectée.^{56, 96}

Cartographie cellulaire

Grâce à leurs faibles dimensions, les UME permettent une **détection spatiale** de l'exocytose sur différentes zones de la surface cellulaire. En effet, en positionnant l'électrode au contact de la cellule étudiée, la perte d'information par diffusion (déformation du signal, événements non

déTECTÉS) est minimisée et la surface de la cellule analysée est déterminée par la surface active de l'électrode. Les UME généralement utilisées, dont les diamètres sont de l'ordre de 7 à 10 microns, ont une taille comparable à la taille de la cellule et apportent des informations sur l'ensemble des événements se produisant dans la zone étudiée. En réduisant la taille de l'électrode, la surface sondée de la cellule et donc le nombre d'événements détectés à la surface de l'électrode diminuent. Par ailleurs, une étude réalisée au laboratoire a montré que la taille de l'électrode ne modifiait pas significativement le signal recueilli⁹⁷ et qu'en positionnant l'UME à une distance de 5 µm de la cellule, le facteur de collecte était encore de 100%. Ainsi, il est possible d'ajuster la taille de l'électrode à la taille de la zone à examiner sans perdre d'information.

Les premières tentatives pour obtenir des informations spatiales lors de l'exocytose ont consisté à placer deux électrodes à fibre de carbone de diamètre de l'ordre du micron à différents endroits de la surface cellulaire. L'existence de zones plus ou moins actives de sécrétion a ainsi pu être mise en évidence chez les cellules chromaffines.¹³ Chez les cellules β du pancréas, la présence de zones préférentielles d'exocytose a été démontrée suivant le même principe. Par ailleurs des expériences complémentaires de microscopie de fluorescence suggèrent l'existence de fusions multiples ou d'exocytose composée.

La mise en évidence de zones plus ou moins actives d'exocytose chez les PC12 a également été réalisée à l'aide de réseau d'électrodes de carbone. L'association de sept UME de carbone permet d'obtenir un réseau d'environ 10-20 microns de diamètre, comparable à la taille des cellules étudiées et d'ainsi séparer la détection de la sécrétion en sept zones distinctes. Il a été montré que la réponse moyenne de plusieurs cellules n'est pas significativement différente pour chaque électrode, mais que lors de l'étude de chaque cellule unique, des **zones actives de sécrétion sont clairement présentes**.^{98, 99}

Par ailleurs, des UME de carbone nanométriques, (diamètre de l'ordre de 100 nm), ont été développées pour le suivi de la libération cellulaire (PC 12) avec une forte résolution spatiale. Elles permettent ainsi la mesure directe d'événements uniques d'exocytose à l'échelle d'une vésicule.¹⁴ Compte tenu du positionnement aléatoire de la nanoélectrode à la surface de la cellule, aucune détection n'est recensée dans 70 % des cas.

Une autre possibilité envisagée pour cartographier les zones d'exocytose est le couplage de la détection ampérométrique avec la microscopie de fluorescence, en particulier la fluorimétrie. Ainsi, il a été montré que chez les cellules chromaffines, les zones actives d'exocytose sont colocalisées avec les zones d'entrée du calcium.¹⁰⁰ De même chez les cellules β du pancréas, les

principaux sites de libération sont localisés dans les zones où la concentration granulaire est élevée.¹⁰¹

Afin d'encore améliorer la résolution spatiale, des électrodes sous forme de film métallique, tel que le platine ou l'ITO (Indium Tin Oxide, oxyde d'indium dopé à l'étain) ont été développées. Par exemple, un dispositif constitué de quatre électrodes de platine sur lesquelles une cellule chromaffine a été déposée a permis de localiser les zones de sécrétion, en considérant que les différences de charge observées pour un pic obtenu simultanément sur plusieurs électrodes sont dues à l'éloignement plus ou moins grand de la zone de libération par rapport aux électrodes.¹⁰²

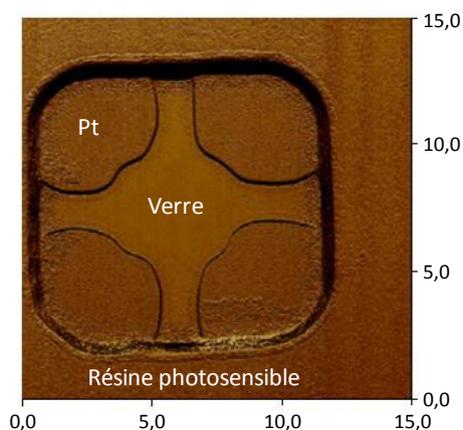


Figure B-14 : Image obtenue en microscopie à force atomique d'un dispositif électrochimique à quatre électrodes de platine. Les dimensions sont en micromètre.¹⁰²

L'observation simultanée de la cellule en microscopie de fluorescence confirme en effet la localisation des événements détectés par ampérométrie.¹⁰³ On notera que le caractère opaque du platine rend difficile la corrélation entre événements optique et électrochimique, nécessitant alors des simulations pour assigner ces derniers. Par ailleurs, l'étude ampérométrique de la sécrétion des cellules chromaffines déposées sur une électrode plane d'ITO peut également être combinée à une détection par fluorimétrie pour corréler les événements d'exocytose à des pulses de calcium.¹⁰⁴

Bien que les étapes du mécanisme d'exocytose soient bien connues, les paramètres qui le gouvernent ne sont pas toujours bien identifiés. L'ampérométrie est alors un outil de choix pour suivre et évaluer l'effet des paramètres physicochimiques et biologiques sur la dynamique de sécrétion et la quantité de molécules libérées apportant ainsi de nouvelles informations pour améliorer la compréhension du mécanisme.

Influences des paramètres physico-chimiques sur l'exocytose

- Gonflement de la matrice intragranulaire

La forme des pics ampérométriques dépend de deux facteurs : la dynamique d'ouverture du pore et la vitesse de diffusion des cations dans la matrice. Des études ampérométriques sur cellules chromaffines, mastocytes et cellules β pancréatiques ont montré que ces deux processus sont gouvernés par le gonflement de la matrice.⁹³ Par exemple, chez les cellules chromaffines, avant l'ouverture du pore, la cohésion de la matrice est assurée par des interactions entre les protéines négatives et leurs contre-ions, les monoamines, et des interactions par liaison hydrogène. Une fois le pore de fusion créé, les monoamines commencent à diffuser vers le milieu extracellulaire et sont remplacées au sein de la vésicule par des ions sodium et des protons initialement présents dans le milieu extracellulaire. Cet échange d'ions entraîne une désorganisation et la perte de cohésion de la matrice. Il en résulte un déséquilibre osmotique qui conduit au gonflement de la matrice^{35, 77, 83} qui serait responsable de l'expansion du pore de fusion et la libération du contenu granulaire.⁵⁴ La libération des monoamines serait alors contrôlée par le gonflement de la matrice, lui-même régulé par la composition du milieu extracellulaire.⁹³ Ces hypothèses ont été confirmées en étudiant la libération en présence d'ions monovalents (Cs^+),⁸³ divalents (Zn^{2+})^{83, 105} ou trivalents (Al^{3+} , La^{3+}).¹⁰⁶ Globalement, les ions monovalents facilitent l'exocytose tandis que les ions divalents et trivalents, en assurant la compacité de la matrice, inhibent la libération.⁹³

- Influence de la température sur le mécanisme d'exocytose

L'influence de la **température** sur l'exocytose a été évaluée à partir de plusieurs modèles cellulaires. Chez les cellules chromaffines et chez les mastocytes, l'augmentation de la température jusqu'à la température physiologique (37 °C) est accompagnée d'une augmentation de la fréquence des événements d'exocytose, de la quantité de molécules libérées par vésicules et d'une accélération de la cinétique de libération.^{83, 91, 107-109} Par contre, dans le cas des plaquettes, la fréquence des événements augmente mais la quantité de molécules libérées par événement n'est pas modifiée lorsque la température augmente.⁸³ La température altère donc la cinétique du mécanisme d'exocytose, mais peut aussi influencer directement la quantité de molécules libérées. On notera que l'analyse de plusieurs paramètres (fréquence, temps de montée des pics...) en fonction de la température permet d'extraire des valeurs d'énergie d'activation pour les différentes étapes d'un événement.⁹⁸ Quoiqu'il en soit, l'origine de ces modifications est complexe. Du point de vue de la physicochimie, une hausse de température accentuerait le gonflement de la matrice mais diminuerait aussi la viscosité de la membrane,

conditions qui favoriseraient la réalisation des événements d'exocytose. Un effet de la température sur la biosynthèse des vésicules n'est pas à exclure, même s'il est peu probable, considérant les faibles temps d'exposition (quelques minutes).

- Rôle du pH dans la régulation de l'exocytose

Le **gradient de pH** entre le milieu intragranulaire et le milieu extracellulaire joue également un rôle important dans la régulation de l'exocytose. En réalité, l'impact du pH sur l'exocytose n'est pas toujours simple à expliquer et dépend notamment du modèle cellulaire. Selon ces derniers, le stockage des espèces est différent et l'effet du pH varie. Ainsi, chez les cellules chromaffines, la conformation de la chromogranine intravésiculaire dépend du pH. Dans les conditions physiologiques, le milieu intragranulaire acide permet de stocker les catécholamines à forte concentration en cohésion avec la matrice. En l'occurrence, à pH 5,5, la matrice se trouve sous la forme d'un tétramère. Lors de la fusion, elle entre en contact avec le milieu extracellulaire à pH 7,4, et change alors de conformation. Elle se trouve sous la forme d'un dimère moins agrégé, affaiblissant ainsi l'association des catécholamines avec la matrice. L'analyse ampérométrique de la diminution du pH extracellulaire de 7,4 à 5,5 montre que la cinétique de libération est ralentie¹¹⁰⁻¹¹² et la quantité de molécules libérées est réduite,^{113, 114} en accord avec une déstructuration de la matrice moins marquée. De même en diminuant le pH intravésiculaire, le gradient de pH est amplifié et la quantité de molécules libérées augmente. Inversement, en inhibant les pompes à protons pour augmenter le pH intragranulaire, la cinétique de libération et la quantité de molécules libérées diminuent.¹¹⁵ Chez les cellules β du pancréas, l'insuline et la sérotonine sont stockées de façon différente au sein de la matrice intravésiculaire. La sérotonine, soluble, est située dans la partie liquide du granule alors que l'insuline forme un complexe avec les ions Zn^{2+} . Les études ampérométriques montrent que le pH extracellulaire ne modifie pas la libération de sérotonine. Seule la libération d'insuline, qui nécessite la dissolution de la matrice, est affectée. En effet, à pH faible, l'insuline n'est pas libérée et, lorsque le pH extracellulaire augmente, sa cinétique de libération augmente.⁸⁹ D'autre part, chez les PC12, la diminution du pH de 7,4 à 6,8 déclenche l'exocytose sans nécessiter la présence de sécrétagogue.¹¹⁶ Dans ce cas, l'impact du pH sur la matrice intravésiculaire n'est pas avéré.

- Influence de l'osmolarité sur le mécanisme d'exocytose

La perturbation de l'**équilibre osmotique** entre les milieux intra- et extracellulaires permet également de réguler la fusion membranaire. Ainsi, un milieu extracellulaire hypotonique a pour conséquence l'entrée d'eau dans la cellule afin de restaurer l'équilibre. Ceci induit le gonflement

de la matrice et indirectement l'augmentation de la tension de la membrane et la diminution de sa viscosité. L'effet inverse est attendu en conditions hypertoniques. Les données ampérométriques sont en accord avec ces hypothèses puisqu'un milieu extracellulaire hyperosmotique (630 mOsm) entraîne une diminution de la fréquence des événements chez les cellules chromaffines.^{55, 83} On remarque que la cinétique et la quantité de molécules libérées sont plus faibles qu'en conditions isotoniques.¹¹⁷ Inversement, en conditions hypotoniques (200 mOsm), la fréquence de sécrétion et la quantité de molécules libérées par les cellules chromaffines sont plus élevées qu'en conditions isotoniques.⁹³ Il n'est par ailleurs pas exclu que l'osmolarité du milieu extérieur joue un rôle sur le gonflement de la matrice, favorisant ainsi la fusion en conditions hypotoniques et l'inhibant en conditions hypertoniques. En conditions hypertoniques extrêmes (1000 mOsm), seuls quelques pics ampérométriques d'amplitude très faible sont détectés suggérant la caractérisation d'événements de libération cantonnés au stade de pore de fusion et nommés « kiss-and-hold ».⁵⁵

- Rôle des propriétés membranaires dans la régulation de l'exocytose

Le **cholestérol** est un constituant des membranes granulaire et cellulaire participant à la fusion membranaire. Il se lie à la syntaxine du complexe SNARE. La détection ampérométrique de la sécrétion de cellules chromaffines dont le taux de cholestérol membranaire a été modifié ne présente pas de variations de la fréquence des événements¹⁰⁶ mais, entraîne pourtant une diminution de leur cinétique^{74, 106} en accord avec une rigidification de la membrane cellulaire. Il a également été remarqué que chez les PC12, la diminution de cholestérol membranaire ne diminue pas seulement la fréquence des événements, mais réduit également la vitesse de libération et la quantité de molécules libérées.¹¹⁸ Par contre, lors de la diminution de la quantité de cholestérol, la fréquence de libération spontanée augmente chez les jonctions neuromusculaires d'écrevisses¹¹⁹ et les neurones de l'hippocampe.¹²⁰ Ces résultats mettent en évidence la versatilité et le rôle complexe du cholestérol dans l'exocytose puisque ce dernier semble être impliqué dans les étapes d'arrimage et de fusion, voire favoriser le bon déroulement de la libération en assurant à la membrane cellulaire une courbure adaptée.

D'autre part, la courbure membranaire est essentielle à la formation du pore, pourtant sa nature influence aussi la sécrétion. La distribution des **phospholipides** est asymétrique dans les feuillettes de la membrane, et ils se réorganisent au cours de l'exocytose. Il a été montré que cette asymétrie est nécessaire et contrôle la sécrétion.¹²¹ L'insertion de lipides exogènes au sein de la membrane plasmique peut donc favoriser ou non la fusion membranaire. Chez les cellules chromaffines, l'ajout de lysophosphatidylcholine (LPC) dans la membrane des cellules augmente la fréquence des événements et accélère la cinétique de libération. L'ajout d'acide

arachidonique produit l'effet inverse.¹⁶ En effet, la forme conique inverse de LPC et la forme conique de l'acide arachidonique imposent des contraintes opposées au sein de la membrane (courbures positive et négative respectivement). Des résultats globalement similaires ont été observés chez les PC12, où l'ajout de phosphatidylsérine entraîne une augmentation de la fréquence des événements alors que l'ajout de phosphatidylcholine, de phosphatidyléthanolamine ou de sphingomyéline ne modifie pas la fréquence mais seulement la cinétique des événements.¹²² Enfin, une étude ampérométrique récente¹²³ a mis en évidence un effet antifusogène du LPC sur cellules PC12 et chromaffines. Cette donnée contradictoire ne remet pas en cause la technique analytique mais montre l'importance du modèle cellulaire et de la manipulation (concentration, nature, temps d'exposition...) des phospholipides.

Influence des paramètres biologiques sur l'exocytose

La première étape du mécanisme d'exocytose nécessite le transport des granules à proximité de la membrane plasmique. Le modelage des **filaments d'actine** du cytosquelette est une étape nécessaire à ce transport.¹²⁴ La modification du cytosquelette semble donc être un facteur de contrôle. Par exemple, la présence de latrunculine conduit à la dépolymérisation du réseau d'actine et, après quelques minutes à l'augmentation, en termes de charge et d'intensité de la libération de sérotonine chez les mastocytes de rat.¹²⁵ Cependant, après une heure de traitement, la libération est complètement inhibée.¹²⁵ Ceci est cohérent avec le double rôle du réseau d'actine qui aide à la fois au déplacement des vésicules dans le milieu intracellulaire et qui agit comme un contrôle de la libération à l'échelle d'un événement individuel. Ainsi, une dépolymérisation modérée facilite l'émission du contenu vésiculaire par événement quand un traitement plus marqué, en annihilant la capacité des vésicules à se déplacer, bloque l'ensemble de la réponse exocytotique. D'autre part, la ryanodine et la caféine, agissant sur les mêmes sites que la latrunculine, ont des effets similaires.¹²⁵

Une fois la vésicule de sécrétion arrivée à proximité de la périphérie de la cellule, la fusion des membranes nécessite la formation du **complexe SNARE**. Son rôle est notamment de compenser la répulsion électrostatique des membranes, toutes les deux globalement chargées négativement, et de les forcer à entrer en contact.¹²⁴ Le rôle et l'importance de ce complexe, formé par l'association de protéines vésiculaires (VAMP/synaptobrevine) et cellulaires (SNAP-25 et syntaxine) ont été confirmés par ampérométrie.⁴¹ Par exemple, les neurotoxines clostridiales tétaniques et botuliques clivant spécifiquement les protéines du complexe SNARE,¹²⁶ entraînent une diminution de la sécrétion des cellules chromaffines.^{41, 127}

Bien que ce complexe ne soit pas supposé jouer un rôle sur la dynamique de fusion après la phase d'arrimage, il peut néanmoins réguler la cinétique des événements d'exocytose en modifiant la viscosité et la courbure membranaire locale. D'autre part, les interactions des protéines du complexe SNARE et d'autres protéines peuvent également être déterminantes. C'est le cas, par exemple de **NSF** (N-ethylmaleimide-sensitive factor) qui, en se liant avec la protéine SNAP est responsable de l'activation du complexe SNARE, favorisant ainsi la fusion des membranes.⁴¹ Initialement, le complexe SNARE est en configuration dite cis (les protéines SNARES sont membranaires) et est alors inactif. En se liant au complexe SNARE, le NSF perturbe sa configuration. Le complexe devient trans (la synaptobrevine est localisée sur la membrane vésiculaire alors que SNAP 25 et Syntaxine 1 sont sur la membrane cellulaire) et permet aux membranes de s'approcher l'une vers l'autre.¹²⁸

La protéine membranaire **synaptotagmine** est également responsable de la régulation de l'exocytose. Sous l'action du calcium, elle s'ancre dans la membrane granulaire, induit la courbure positive de la membrane et favorise la fusion⁵⁰ (Figure B-15).

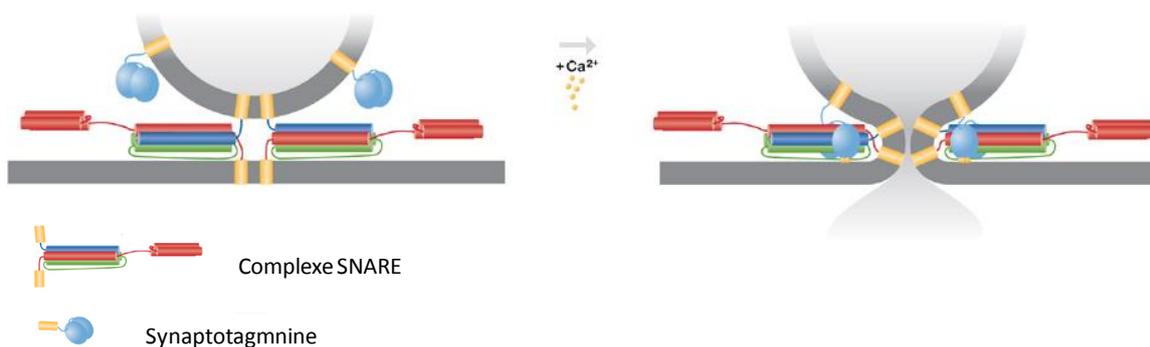


Figure B-15: Rôle de la synaptotagmine dans la fusion membranaire.¹²⁹

La compétition entre les protéines **Munc 13-1** et **Munc 18-1** est un autre exemple de paramètres biologiques. Les deux peuvent se lier au même domaine de la syntaxine, à la différence que Munc 18-1 impose à la syntaxine une conformation fermée empêchant la formation du complexe SNARE. Il semblerait que Munc 13-1 puisse déplacer Munc 18-1 et favoriser la formation de l'édifice SNARE. Contrairement aux neurones, le taux de Munc 13-1 est très bas chez les chromaffines, et son inhibition ne diminue pas la sécrétion. Cependant sa surexpression l'augmente significativement.⁴¹ D'autre part, les esters de phorbol, activateurs des récepteurs de Munc 13-1 dans leur membrane, conduisent à une augmentation de la fréquence de libération chez les neurones.⁵⁸

L'activité exocytotique peut également être modulée à travers l'interaction des molécules libérées avec des **autorécepteurs** de la membrane cellulaire. La nature et les effets de ces

interactions peuvent être différents suivant les modèles cellulaires. A titre d'exemple, chez les cellules chromaffines, l'autorécepteur membranaire D1 est sensible à l'adrénaline libérée. Il a été montré qu'en bloquant cet autorécepteur, la sécrétion détectée par ampérométrie diminuait drastiquement. Ainsi, en fonction de la quantité d'adrénaline libérée, les cellules chromaffines peuvent contrôler et adapter leur sécrétion.¹³⁰ Notons également que la membrane cellulaire des cellules chromaffines contient l'autorécepteur α_2 . De la même façon que pour les autorécepteurs D1, suite à la libération des catécholamines, ces autorécepteurs sont activés et entraînent l'inhibition de la sécrétion.¹³¹ Les mêmes effets ont été observés chez les PC12 où la dopamine libérée vient bloquer les autorécepteurs D2 et inhiber la sécrétion.¹³² Cependant, l'effet inverse a été observé chez les cellules β du pancréas. L'insuline libérée par exocytose semble, quant à elle, stimuler la sécrétion de ces cellules.^{133, 134}

Des espèces, autres que celles libérées par la cellule peuvent également entrer dans la régulation du mécanisme, en particulier lors de la biosynthèse des vésicules. Par exemple, l'incubation de cellules chromaffines ou PC12 avec de la **L-DOPA**, un précurseur de la dopamine, augmente la concentration vésiculaire en dopamine. Ceci a pu être mis en évidence par ampérométrie à travers la hausse de la quantité de molécules et de la fréquence de sécrétion. Inversement, un traitement avec de la **réserpine**, inhibiteur des transporteurs de monoamine (VMAT), nuit au remplissage des vésicules. Comme attendu la quantité de molécules libérées et la fréquence des événements sont alors significativement réduites.^{107, 135}

c) Etude du pore de fusion : le pied de pic

Chaque événement d'exocytose se traduit sous la forme d'un pic de courant ampérométrique. Comme nous l'avons brièvement mentionné, dans certains cas, un pied de courant apparaît au début des pics ampérométriques,^{15, 35, 107, 136} avant la montée rapide de courant liée à l'événement de libération proprement dit. L'existence de ces pieds de pics a été mise en évidence chez les cellules chromaffines,¹⁵ les mastocytes,¹³⁷ les PC12,¹³⁸ les cellules β du pancréas¹³⁹... Chez les cellules chromaffines, ce pied est détecté dans environ 30 % des cas.¹⁴⁰ La présence de ces pieds est attribuée à la détection d'une libération du contenu vésiculaire à travers le pore de fusion nanométrique dans ses premiers instants de vie, pendant sa période de stabilité, avant qu'il n'entre en expansion.⁷⁹ Le pied est donc la signature du pore initial de fusion s'il existe et n'est détectable que si celui-ci dure suffisamment longtemps par rapport à la résolution temporelle de la détection en ampérométrie (quelques millisecondes ou inférieure). Quatre paramètres sont étudiés, permettant de caractériser ce pied, et donc, les propriétés du pore de fusion avant son ouverture :

- t_{pied} correspond à la durée du pied ;
- Q_{pied} correspond à la quantité de molécules libérées pendant la durée du pied;
- i_{pied} est le courant maximal du pied, qui est corrélé au flux de molécules libérées ;
- $\%_{\text{pied}}$ est le taux de pics ampérométriques présentant un pied.

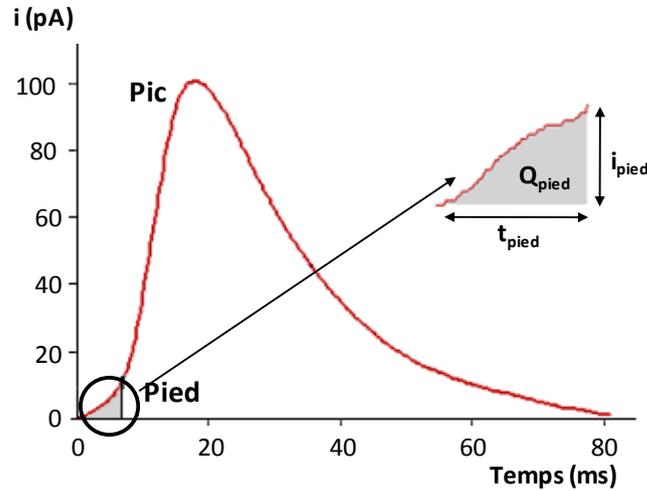


Figure B-16 : Pic ampérométrique présentant un pied.

Il est clair que la détection du pied de pic reflète la durée de vie du pore de fusion et sa stabilité avant la libération massive. Certaines études attribuent le pied de pic à la prédisso-ciation de la matrice^{112, 141} alors que d'autres corré-lent cette détection à la structure et à la taille de la vésicule.¹⁴² En effet, des études en microscopie électronique en transmission suggèrent l'existence d'un film liquide (halo) contenant quelques molécules dissoutes entourant un cœur plus dense au sein de certains granules des cellules chromaffines,¹⁴³ des PC12,¹⁴⁴ des cellules β pancréatiques¹⁴⁵... L'existence de ce halo est alors associée par ces auteurs à la présence du pied de pic, reflétant la libération des molécules y diffusant plus rapidement que dans la matrice. Des travaux au laboratoire ont mis en évidence que les événements de faible charge coulométrique présentaient rarement des pieds de pics en comparaison aux événements de charge élevée. Ceci suggère que les vésicules de petite taille conduisent à un pore de fusion instable, ce qui est en accord théorique avec une plus forte courbure membranaire.¹⁴² Une analyse des distributions de charge des pics avec et sans pieds suggère un lien entre pied, halo et exocytose composée.

Chez les cellules chromaffines, 70 % des pieds de pics observés sont des rampes de courant et 20%, des rampes suivies d'un plateau (Figure B-17).¹⁴⁰ Les 10 % restants ont une forme plus complexe et pourraient correspondre à la superposition de deux événements d'amplitude différente et ne correspondraient pas strictement à la définition du pied. L'existence de deux formes de pieds de pic différentes suggère une phase stationnaire plus ou moins longue du pore de fusion pendant laquelle des molécules sont libérées.

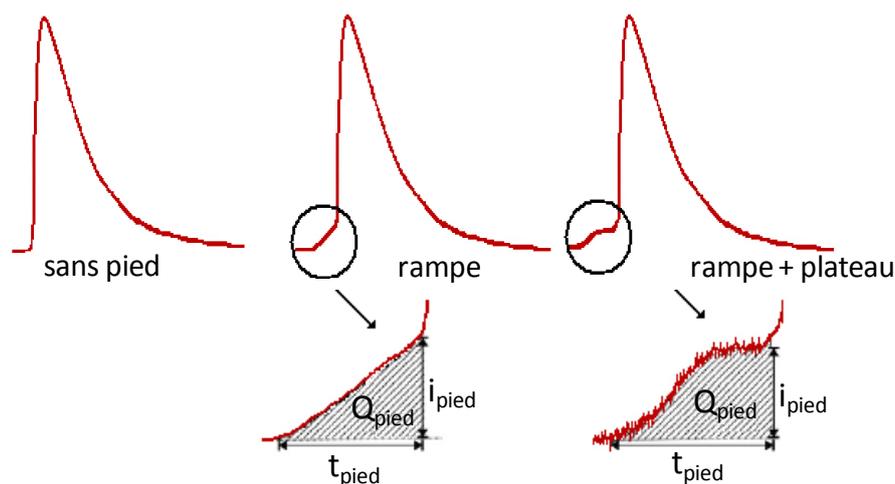


Figure B-17 : Trois principaux types de pics ampérométriques : à gauche, pic sans pied, au milieu : pic avec un pied en forme de rampe et à droite : pic avec un pied en forme de rampe suivie d'un plateau. En bas : zoom des pieds de pic et leur caractéristiques.¹⁴⁰

Chez les PC12 et chez les cellules chromaffines, une distribution trimodale de la quantité de molécules libérées avant l'expansion du pore (Q_{pied}) laisse supposer l'existence de trois populations granulaires basées sur la stabilité du pore de fusion.⁵⁶

Les paramètres physicochimiques influençant la cinétique globale ou modifiant la quantité de molécules libérées par événement peuvent également influencer la stabilité du pore de fusion. Par exemple, alors que les paramètres de pieds de pics sont différents lors de changements de **température**, le pourcentage des pieds de pics obtenus chez les cellules chromaffines reste constant.¹⁰⁷ La température semble alors réguler l'ouverture du pore de fusion. De plus, lors de l'étude des cellules chromaffines en modifiant l'**osmolarité**, le taux de pieds de pic reste le même qu'en conditions isotoniques. En conditions hypotoniques, l'intensité du pied augmente mais la charge reste constante. La cinétique de libération correspondant au pied est donc plus rapide. Les propriétés physicochimiques de la membrane jouent donc un rôle dynamique sur le pied mais ne changent pas sa probabilité d'apparition.^{93, 146} Ces résultats suggèrent donc que la présence et la forme du pied de pic sont essentiellement liées à la structure de la vésicule qui fusionne.

L'hypothèse du halo est aussi renforcée puisque la **L-DOPA** augmente le pourcentage de pied de pic, leur charge et leur intensité tandis que la **réserpine** conduit au résultat contraire. Rappelons que la L-DOPA entraîne l'augmentation du contenu granulaire et donc de la quantité de catécholamines au sein du halo, la réserpine ayant l'effet inverse. Les pieds de pic correspondraient donc à la libération des catécholamines du halo,^{107, 147} le traitement avec la L-DOPA induisant un nombre plus élevé de vésicules avec un halo contenant lui-même plus de catécholamines qu'en conditions contrôle.

Enfin, les propriétés des membranes influencent également la stabilité du pore de fusion. Lors de l'étude de l'exocytose des cellules chromaffines dont les membranes ont été modifiées par ajout de **LPC** ou d'**acide arachidonique**, le taux de pic présentant un pied n'est pas modifié, mais les caractéristiques de ces pieds changent : la cinétique et l'intensité des pics augmente avec LPC, et l'inverse est observé pour l'acide arachidonique. Ces résultats suggèrent à nouveau que l'existence de pieds de pic dépend de la structure des granules alors que les caractéristiques de ces pieds semblent plutôt liées à la stabilité du pore.¹⁰⁷

La relation halo/pied de pic reste cependant une hypothèse et d'autres études montrent que l'on peut modifier le pourcentage des pieds de pic avec des conditions expérimentales qui n'ont a priori rien à voir avec le halo (cholestérol,^{74, 106} modification du complexe SNARE,¹⁴⁸ sécrétagogue,¹⁴⁹ métabolite¹⁵⁰...). Au-delà de la problématique scientifique, ceci pose la question de la détermination et de la fiabilité du pied de pic. Même si des critères de bon sens pour reconnaître un pied de pic ont été publiés ces dernières années,¹⁵¹ un passage en revue de la littérature montre que la morphologie « typique » d'un pied dépend fortement du laboratoire d'où provient l'étude. Le principal risque est de confondre un événement composé d'un pic ampérométrique précédé d'un pied avec deux événements distincts partiellement superposés. On peut alors se demander si dans certains cas, le pied de pic n'est pas un artefact analytique plutôt qu'une réalité biologique. Des mesures de patch-ampérométrie montrent que ce n'est pas le cas.⁵⁷ Par ailleurs, l'étude de l'effet de la taille de l'électrode sur les propriétés des pics ampérométriques montrent que ces derniers ne sont pas affectés alors que le pourcentage de pics superposés diminue avec la dimension de l'UME.⁹⁷ Si l'on suit les recommandations de Mosharov et Sulzer (ligne de base, bruit, critères de superposition), le pourcentage de pieds de pic est alors indépendant de la surface de l'électrode, montrant que le pied de pic est bien lié au phénomène biologique précédant l'événement de libération global. Si l'on associe le doute sur la façon de définir un pied de pic au fait que le jeu des quatre paramètres de pied (fréquence, charge, intensité, durée) est rarement complet, on comprend à quel point la compréhension des phénomènes conduisant à l'observation d'un pore de fusion à travers son reflet ampérométrique est délicate.

d) Conclusion

L'ampérométrie sur UME permet donc de caractériser en temps réel l'activité sécrétrice d'une cellule isolée en apportant des informations sur la quantité de molécules libérées, la dynamique de libération et le pore de fusion. Contrairement au patch-clamp, elle n'induit aucun stress mécanique sur l'objet étudié. La technique ampérométrique n'est pourtant pas sans limitations. La détection d'un événement d'exocytose n'a lieu qu'à travers la libération du contenu

vésiculaire. L'ampérométrie est donc aveugle à tout phénomène intracellulaire affectant les vésicules. Par ailleurs la méthode requiert la présence de molécules électroactives et dont la détection à l'électrode est plus rapide que le phénomène de libération. L'utilisation de méthodes optiques d'analyse et la visualisation des granules avant la fusion devraient permettre de compléter l'ampérométrie et d'accéder à l'événement dans sa globalité.

I.II.3. La microscopie optique

La microscopie optique, grâce à l'observation des granules avant la fusion, permet d'apporter des informations sur la localisation des événements d'exocytose, voire leur dynamique. Comme nous le verrons, **elles sont principalement axées sur des études de fluorescence**, et les vésicules doivent souvent être modifiées pour permettre leur observation.

a) Réactions bioluminescentes

Il est possible d'observer les événements d'exocytose par l'intermédiaire de réactions bioluminescentes. Le composé chimique à l'origine de ces réactions le plus répandu est la luciférine. Son oxydation, par l'action enzymatique de la luciférase conduit à la production d'oxyluciférine et à l'émission de photons. Cette réaction nécessite de l'oxygène et de l'ATP et l'intensité lumineuse est proportionnelle à la concentration en ATP.⁵⁴ Les vésicules de sécrétion des cellules chromaffines contiennent, en plus des catécholamines et de la matrice, de l'ATP à forte concentration (0,12-0,25 mol.L⁻¹),¹⁵² rendant possible la visualisation de l'activité exocytotique. Ainsi, en stimulant la sécrétion de ces cellules dans un milieu contenant de la luciférine et de la luciférase, l'exocytose peut être mesurée en temps réel mais sans pouvoir différencier les événements de libération.

b) Microscopie de fluorescence

Le principe de cette méthode analytique repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes dont les propriétés dépendent du milieu où elles sont localisées. Il est alors possible d'élaborer de nombreuses stratégies pour étudier et visualiser la sécrétion d'une vésicule isolée. Ce type de microscopie repose sur la capacité qu'ont les sondes fluorescentes à émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. Une fois l'énergie du photon incident absorbée, la molécule se trouve dans un état électronique excité. Son retour à l'état fondamental se fait par émission d'un photon détecté par microscopie.

Les sondes fluorescentes

Parmi les **marqueurs membranaires** utilisés pour résoudre les mouvements des membranes, la sonde FM 1-43 est la plus commune. Elle présente l'avantage d'être peu fluorescente en milieu aqueux, mais son intensité augmente considérablement lorsqu'elle est liée aux membranes biologiques. Elle génère ainsi un rapport signal sur bruit très avantageux. De plus, étant chargée positivement, sa translocation à travers la bicouche lipidique est limitée voire impossible. Elle reste donc localisée sur le feuillet extérieur.⁵⁴

Elle est ainsi utilisée pour marquer les membranes cellulaires puis les vésicules de sécrétion, son incorporation au sein de la membrane vésiculaire étant réalisée par endocytose.¹⁵³ Ceci permet donc de visualiser les activités exocytotiques de la cellule.⁶³ On remarque que la quantité de sonde insérée dans la membrane cellulaire durant la sécrétion donne une information similaire à celle obtenue lors des mesures de capacitance en patch-clamp. Par comparaison avec cette technique, l'augmentation de la fluorescence ne reflète que les événements d'exocytose alors que les variations de capacitance peuvent être modifiées par les événements d'endocytose. Très utilisée pour les préparations neuronales qui recyclent leurs vésicules par endocytose, elle offre la possibilité de visualiser les cycles exocytose/endocytose en discriminant les deux mécanismes.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Du fait de son mode d'incorporation dans la membrane vésiculaire, la principale limitation de la sonde FM 1-43 est un emploi restreint aux cellules dont le recyclage des vésicules est rapide.

Les **marqueurs vésiculaires** présentent également d'excellentes propriétés pour l'étude de la sécrétion. Le principe de la détection d'un événement repose sur la différence de fluorescence de la sonde en fonction du pH qui passe d'un milieu acide (environ 5) à neutre (environ 7) au cours de la libération vésiculaire.

Par exemple l'acridine orange, un acide nucléique qui traverse facilement les membranes, entre dans les compartiments acides tels que les granules au sein desquels elle est protonnée et stockée. En milieu acide, elle est orange lorsqu'elle est excitée par un laser bleu. Les protéines modifiées constituent une autre classe de marqueurs vésiculaires. Ainsi, la GFP (Green Fluorescent Protein), intrinsèquement fluorescente, a été découverte en 1962 par O. Shimomura.¹⁵⁷ Le clonage de son gène codant a été réalisé par M. Chalfie en 1992 et elle a ensuite été insérée dans un organisme pour la première fois en 1994 par R. Tsien.¹⁵⁸ Ces trois chercheurs ont été récompensés par un prix Nobel de Chimie en 2008. Son gène, fusionné *in vitro* au gène de la protéine d'intérêt (dans le cas de l'étude de l'exocytose, il s'agit en général du neuropeptide Y (NPY) qui permet un marquage vésiculaire), est ensuite inséré dans les cellules à étudier par transfection.¹⁵⁸ Il existe différents dérivés de la GFP, comme par exemple, la eGFP

(enhanced Green Fluorescent Protein) ou la PHuorine dont les propriétés sont légèrement différentes (couleur de fluorescence ou sensibilité au pH). Il existe d'autres protéines fluorescentes basées sur ce principe. Nous pouvons citer par exemple, la DsRed (Discosoma Red Fluorescent Protein) et ses dérivées (comme la mRFP, monomeric Red Fluorescent Protein) mais leur rendement de transfection est plus faible et leur maturation est plus lente que ceux de la GFP et de ses dérivés. La GFP est donc très utilisée pour observer la localisation et suivre le mouvement des vésicules de sécrétion avant la fusion. On remarquera que des études avec un double marquage (milieu intravésiculaire/syntaxine) ont été mises en place afin de montrer le caractère réversible de la première étape de formation du complexe SNARE.¹⁵⁹

Les microscopies de fluorescence

La **microscopie de fluorescence classique** (dite fluorescence à champ large ou à épifluorescence) ne permet pas de visualiser individuellement le mouvement des granules de sécrétion. En effet, dans ce type de microscopie, l'ensemble du volume de la cellule est éclairé par une lumière blanche. Même si l'image obtenue au plan focal est nette, la fluorescence provenant des granules de sécrétion situés en dehors du plan focal vient parasiter cette image. Le rapport signal sur bruit devient donc insuffisant pour suivre un granule unique.

Ainsi, de nouvelles techniques optique de fluorescence, basées sur le principe de la section optique, ont été développées. La **microscopie confocale**¹⁶⁰ permet de réduire la profondeur de champ à environ 400 nm. La surface de l'échantillon est éclairée par un rayon laser, concentré par une lentille, qui balaye la surface en positionnant un sténopé devant le détecteur afin que seuls les photons provenant du plan focal passent le sténopé et participent à la formation de l'image. Cependant, malgré la réduction du volume d'excitation, une fluorescence parasite persiste. De plus, en raison de sa faible résolution temporelle, ce type de microscopie est peu utilisé pour l'étude de la sécrétion cellulaire.

La **microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente** (TIRFM : Total Internal Reflexion Fluorescence Microscopy) et la **microscopie biphotonique**¹⁶¹ possèdent un bien meilleur rapport signal sur bruit. En effet, elles limitent l'excitation des fluorophores au plan de focalisation. La longueur d'onde d'excitation de la microscopie biphotonique est située dans le proche infrarouge (800-1000 nm). Les photons IR diffusant peu, le faisceau excitateur est donc confiné dans le plan focal. Le signal fluorescent détecté n'est donc plus noyé dans le bruit de fond constitué de la fluorescence hors focus. Cependant, la microscopie biphotonique utilise le balayage d'un faisceau laser unique, trop lent par rapport à la cinétique de l'exocytose.

Pour étudier ce mécanisme, il est donc nécessaire d'utiliser une microscopie dont la profondeur de champ est suffisamment faible pour conserver une image nette du plan focal et dont la résolution temporelle est suffisamment rapide pour observer les événements de sécrétion à l'échelle de la cellule unique, c'est-à-dire plusieurs dizaines de millisecondes. La microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente permet de surmonter ces problèmes, son principe reposant sur la possibilité de n'exciter la fluorescence que sur une très faible profondeur (quelques centaines de nanomètres).

La microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente

Lorsqu'une onde lumineuse, se propageant dans un milieu d'indice de réfraction n_1 , arrive sur une interface avec un autre milieu d'indice de réfraction n_2 plus petit, cette onde est réfléchiée totalement si l'angle d'incidence est supérieur à un certain angle critique d'après la loi de Snell-Descartes. La lumière réfléchiée pénètre néanmoins sur une courte distance dans le milieu d'indice n_2 , générant une onde évanescente dont l'intensité diminue exponentiellement avec la distance à l'interface. Cette lumière va donc illuminer le milieu sur une profondeur de 50 à 300 nm et permettre ainsi l'excitation des granules de sécrétion marqués par une sonde fluorescente, localisés à proximité de l'interface. Cette technique permet donc de visualiser le statut des granules se rapprochant de la membrane plasmique et de suivre leur comportement avant et pendant la fusion (*Figure B-18*).

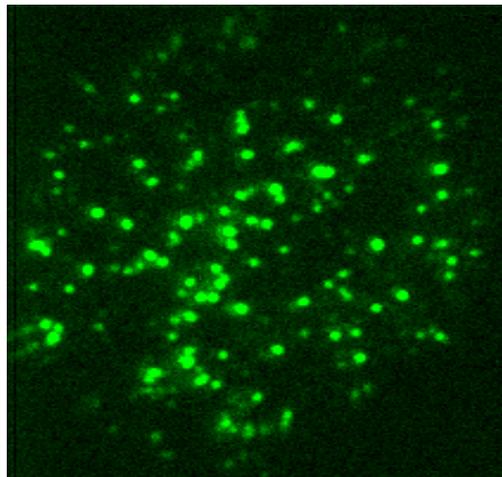


Figure B-18 : Exemple d'image obtenue sur une cellule BON BC21 en microscopie TIRF. En vert, les granules de sécrétion présents dans le champ évanescent.

Il existe deux grands types de montage de microscopie TIRF. Dans le premier type, à **prisme**, les voies d'excitation et de détection de fluorescence sont séparées. Le faisceau laser responsable

de la génération de l'onde évanescente vient frapper l'interface substrat/cellule après avoir traversé un prisme de verre. La détection de la fluorescence est réalisée du côté opposé, généralement par un objectif à immersion plongeant dans le milieu contenant les cellules observées (Figure B-19, droite). Le second type de montage utilise un **microscope inversé**. Dans ce cas, l'excitation et la détection de la fluorescence se fait à travers l'objectif. (Figure B-19, gauche).

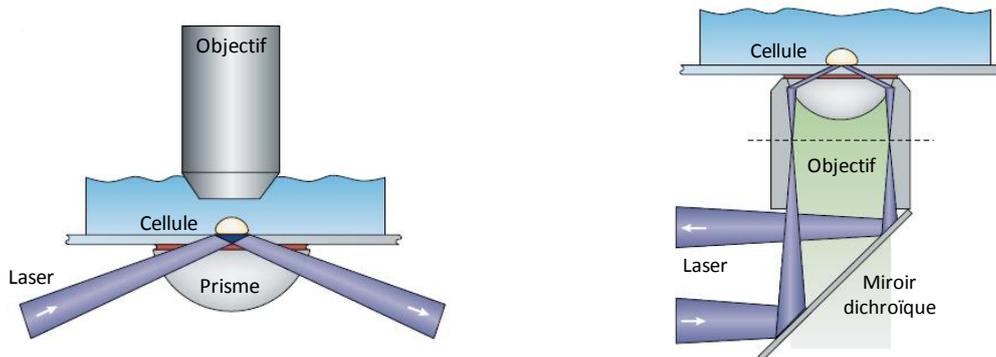


Figure B-19 : Les deux types de montages utilisés en microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente. A droite, montage à prisme, caractérisé par un découplage des voies d'excitation et de détection de la fluorescence. A gauche, Montage à excitation par l'objectif.¹⁶²

Alors que les montages à excitation par l'objectif facilitent la manipulation (couplage avec le patch-clamp, microinjection...), les montages à prismes assurent un meilleur contrôle de l'angle du faisceau laser incident. Il peut être ajusté simplement et précisément et la profondeur de pénétration est par conséquent mieux contrôlée qu'avec les montages à excitation par l'objectif. En pratique, bien que la majorité des équipes scientifiques réalisant des observations en microscopie TIRF pour des applications biologiques utilisent le système pour lequel l'excitation de la fluorescence se fait à travers l'objectif, le montage utilisé au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Sécrétion de l'IBPC (*Institut de Biologie Physico-Chimique*) de F. Darchen avec lequel nous avons collaboré, est un microscope droit à prisme de verre (Figure B-19), permettant un contrôle précis des caractéristiques de l'onde évanescente (angle critique = 64°).

c) Etude de l'exocytose par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente

La microscopie TIRF permet de **localiser** et de suivre les **mouvements des vésicules** proches de la membrane dans les trois dimensions de l'espace (suivi des trajectoires, mesure d'intensité de fluorescence). Dans la littérature, l'analyse des mouvements granulaires a été réalisée sur les modèles cellulaires classiquement étudiés pour l'exocytose : les cellules chromaffines,¹⁶³⁻¹⁶⁵ les

PC12,^{166, 167} les cellule β du pancréas,¹⁶⁸ les neurones¹⁶⁹ ... La visualisation du trafic des vésicules avant l'événement de libération proprement dit a mis en évidence certaines particularités.

Ainsi, avant de fusionner avec la membrane cellulaire, les vésicules des cellules chromaffines sont relativement immobiles. Elles se déplacent sur de petites distances axiales (en restant dans le champ évanescent) pendant une longue période (une dizaine de secondes) avant la fusion.¹⁷⁰ Par ailleurs, après une augmentation de calcium à proximité de la membrane cellulaire, les granules de sécrétion se rapprochent des sites d'entrée du calcium.¹⁷¹ Les granules n'ayant pas subi l'exocytose ont donc tendance à se déplacer latéralement pour se rapprocher des canaux calciques afin d'augmenter leur efficacité pour une stimulation ultérieure. La visualisation en temps réel des événements d'exocytose a alors montré qu'il existait des **zones préférentielles de sécrétion** (« hotspots » ou points chauds), suite à une stimulation.^{170, 172}

Les analyses TIRFM ont également permis de mettre en évidence et de confirmer le rôle important du **réseau d'actine** dans la régulation des mouvements vésiculaires. En effet, des traitements à la jasplakinolide (peptide cyclique) chez les cellules chromaffines,¹⁶⁴ à la phalloïdine (toxine) chez les PC12¹⁷³ favorisent la polymérisation du réseau d'actine et donc sa stabilisation. Il en résulte une diminution de la mobilité des vésicules, que leurs mouvements soient diffusifs ou dirigés le long des filaments d'actine.

Par ailleurs, la microscopie TIRF a permis de confirmer l'existence de **plusieurs populations granulaires**. Une population de vésicules, très proches de la membrane plasmique fusionnant en quelques centaines de millisecondes après la dépolarisation de la membrane pourrait correspondre aux vésicules du « readily releasable pool » mis en évidence lors des mesures par patch-clamp.¹⁷⁴ On remarquera que les populations mises en exergue par la microscopie TIRF ne le sont pas sur les mêmes critères (temporels et spatiaux) que l'ampérométrie (structuraux).

L'importance des étapes précédant la fusion et notamment la formation du **complexe SNARE** ont également été mises en lumière. En présence des toxines tétaniques et botuliniques, clivant le complexe, l'accrochage des vésicules est moins stable et la sécrétion diminue chez les cellules chromaffines.¹⁷⁵ La même tendance est observée chez les cellules β du pancréas où la sécrétion ainsi que l'accrochage de nouveaux granules à la membrane plasmique sont inhibés.¹⁶⁸

De plus, la microscopie TIRF confirme **l'existence du pore** de fusion et le passage de molécules à travers ce pore. Lors de l'exocytose des cellules chromaffines,⁵² des PC12,¹⁷⁶ et des cellules β du pancréas,^{177, 178} l'observation du pore correspond à une forte augmentation de fluorescence due à la sortie de la sonde vésiculaire dans le milieu extracellulaire. Une diffusion puis une diminution très rapide (environ 100 ms) de fluorescence reflètent ensuite la libération du contenu vésiculaire.

Enfin, les phénomènes de **fusion totale** et de **fusion partielle** (voire les processus de « kiss-and-run » ou cavicapture) peuvent être observés en microscopie TIRF. Chez les cellules β du pancréas, les événements de fusion mènent majoritairement à une fusion totale¹⁷⁹ alors que chez les cellules chromaffines et PC12, la fusion partielle semble être prédominante.¹⁷⁶

d) Conclusion

La microscopie TIRF est une technique analytique assez récente¹⁸⁰ qui a apporté de nouveaux éléments dans la connaissance de la sécrétion régulée, en particulier sur les étapes précédant la fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique. Cependant, le dispositif expérimental impose que les observations soient réalisées au pôle basal^a (pôle inférieur) de la cellule. On ajoutera que la résolution cinétique de la technique est faible par comparaison avec l'ampérométrie et le patch-clamp (environ 1 ms). Elle peut en effet atteindre 10 ms, mais elle est généralement limitée par la résolution de la caméra.

Les trois techniques analytiques décrites ici (patch-clamp, ampérométrie et microscopie TIRF) apportent de nombreuses informations de nature différente et donc complémentaires. Dans le but d'améliorer la compréhension de ce mécanisme complexe, l'utilisation d'une seule de ces méthodes analytiques ne semble plus apporter de contribution majeure. En revanche, le couplage, comme cela a pu être montré pour la patch-ampérométrie permet, à travers la corrélation de données complémentaires de mieux cerner les nuances et subtilités du mécanisme par exemple, sur la dynamique du pore de fusion. Toutefois, la mise au point expérimentale constitue un enjeu difficile puisqu'il faut concilier les contraintes de deux techniques, lesquelles peuvent être contradictoires. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont, pour leur part, été développés pour coupler deux approches :

- l'analyse électrochimique, dans laquelle l'ampérométrie permettra d'obtenir des informations sur la cinétique du phénomène et la quantité de molécules libérées.
- la méthode optique, où la fusion des vésicules avec la membrane plasmique de la cellule pourra être observée en microscopie de fluorescence.

^a En biologie, la polarité cellulaire est définie par une répartition caractéristique de certains organites. Par exemple, chez les cellules de l'épithélium, le pôle apical contient les produits de sécrétion et le pôle basal contient le noyau et la majorité des organites cellulaires. Cette définition n'est cependant pas une généralité : par exemple, chez les cellules chromaffines, la sécrétion se produit au pôle basal. Cependant, la communauté physico-chimiste choisit de simplifier cette définition et de nommer le pôle basal, le pôle de la cellule en contact avec le substrat où elle est adhérente, et le pôle apical, le pôle opposé en direction du milieu extracellulaire. Ce sera le sens de la terminologie apical/basal choisie dans l'ensemble de ce manuscrit.

Ainsi, la combinaison de ces deux techniques devrait apporter une vision d'ensemble du mécanisme, depuis le déplacement des vésicules dans le cytoplasme, en passant par la dynamique du pore de fusion jusqu'à leur fusion avec la membrane plasmique.

I.III. Originalité et intérêt de l'approche couplée

La détection électrochimique de la libération de neurotransmetteurs à l'échelle de la cellule unique constitue une méthode d'analyse reconnue et performante. Les études menées au laboratoire ont permis, grâce à l'excellente résolution temporelle de l'ampérométrie sur UME, d'apporter des résultats importants sur la dynamique du phénomène, de la formation du pore de fusion jusqu'à la libération. En revanche, le capteur électrochimique, placé dans le milieu extracellulaire n'est sensible qu'aux espèces électroactive libérées hors de la cellule (une fois que la connexion entre vésicule et milieu extérieur est établie) et n'apporte donc des informations qu'une fois la fusion débutée. Il ne donne donc pas accès aux phénomènes ayant lieu au sein du cytoplasme et au voisinage intérieur de la membrane cellulaire. La microscopie optique, quant à elle, permet la visualisation et le suivi des vésicules de sécrétion ou des protéines régulatrices de la fusion. La possibilité qu'a la microscopie TIRF de n'exciter qu'une faible zone de la cellule étudiée lui confère un excellent rapport signal sur bruit.

Le couplage de ces deux techniques apporte donc des **informations différentes et complémentaires**. Le mécanisme d'exocytose pourrait alors être étudié dans sa globalité. Les caractéristiques dynamiques et spatiales d'un événement d'exocytose pourraient être connues en totalité : du déplacement d'une vésicule vers la membrane plasmique jusqu'à la libération de son contenu dans le milieu extracellulaire. La modification de paramètres physico-chimiques et/ou biologiques et leurs effets pourraient alors être étudiés à plusieurs niveaux du mécanisme. La combinaison des deux techniques serait particulièrement intéressante pour caractériser les **propriétés du pore de fusion** transitoire. Sa durée, sa taille, sa répétitivité, sa dépendance aux paramètres physicochimiques (propriétés de membrane, environnement extracellulaire...) ou biologiques (protéines impliquées dans le mécanisme) pourraient être étudiée, ce qui permettrait de comprendre les différences entre les pores conduisant à une fusion totale et ceux se refermant.

L'analyse des pics ampérométriques apporte des informations sur la dynamique du pore de fusion grâce à l'étude des pieds de pic observés lors de certains événements. En cas de fusion partielle, l'ouverture du pore n'est pas suivie par la libération massive du contenu vésiculaire et il n'est pas toujours facile de distinguer les petites déviations de la ligne de base correspondant

seulement à l'ouverture du pore. A cet égard, certains pics de faible intensité et larges (« stand-alone-feet ») peuvent être, uniquement sur la base de l'information ampérométrique, attribués abusivement à des pores exceptionnellement stables alors qu'ils ne pourraient correspondre qu'à des signaux déformés par la diffusion (correspondant aux événements provenant des cotés de la cellule, et alors détectés au bord de l'électrode). Les observations en microscopie TIRF pourraient alors confirmer **l'existence de ce type de fusions particulières.**

A l'heure actuelle, la dynamique du pore de fusion et la cinétique de libération n'ont pas été corrélées à l'évolution et à la réorganisation de la membrane vésiculaire. En utilisant des marqueurs membranaires comme la GFP combinée à une protéine SNARE, il serait possible de visualiser le devenir de la membrane vésiculaire ayant fusionné (incorporation complète dans la membrane plasmique, recyclage...) et de déterminer **l'influence de la tension membranaire** sur la dynamique du pore de fusion.

Enfin, l'existence de zones actives n'est plus à démontrer. Cependant, l'analyse ampérométrique peut permettre de corréler des zones de sécrétion avec la dimension, tout au moins la quantité de neurotransmetteurs libérés, des vésicules impliquées sur des cellules modèles voire étudier les différences entre sécrétion somatique et terminale sur les neurones.¹⁸¹

Le travail décrit dans la suite de ce manuscrit présente la mise au point du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie TIRF pour la détection des espèces libérées par une cellule unique.

II. Développement des dispositifs pour le couplage

II.1. Contraintes expérimentales

Afin de pouvoir corréler les informations complémentaires apportées par l'ampérométrie et la microscopie de fluorescence, il est nécessaire, même si cela peut paraître une évidence, qu'elles soient obtenues simultanément et au même endroit de la cellule étudiée. Or la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente correspond à une observation du pôle basal de la cellule quand l'ampérométrie sur UME détecte les événements d'exocytose au sommet de l'organisme cellulaire, soit au pôle apical. Le fait de ne pas tenir compte de cet antagonisme peut difficilement conduire à une combinaison électrochimie/fluorescence satisfaisante pour le suivi de l'exocytose. Très récemment est paru une étude relatant la mise au point d'un dispositif microfluidique dévolu à ce type de détection¹⁸² (*Figure B-20*).

Plusieurs cellules sont déposées dans un puits contenant une électrode de platine. Cette dernière étant opaque, les détections électrochimique et optique se font respectivement à la base et au sommet de la cellule. Le seul moyen d'obtenir un suivi combiné est alors de manipuler la cellule étudiée et de la pousser sur le bord du puits, rendant la méthode difficilement applicable en pratique pour des études de routine et biologiquement peu acceptable.

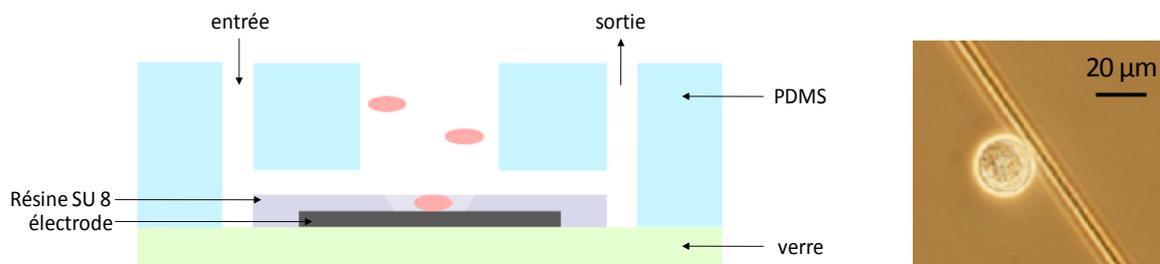


Figure B-20 : Schéma de la section transversale du dispositif microfluidique pour le suivi combiné de l'exocytose par électrochimie et fluorescence. En déplaçant une cellule jusqu'à l'électrode pour créer un contact cellule/électrode sur un seul côté, les événements d'exocytose des vésicules latérales supérieures de la cellule peuvent être détectés simultanément par imagerie et électrochimie.

Comme mentionné précédemment, le montage de microscopie TIRF à disposition dans le cadre de nos études est un microscope droit à prisme de verre permettant de visualiser la fusion des vésicules au pôle basal de la cellule. Il est donc nécessaire de travailler avec une électrode plane sur laquelle la cellule sera déposée, cette électrode permettant alors une détection électrochimique au pôle basal de la cellule. Cette configuration n'est pas celle habituellement utilisée au laboratoire lors des mesures précédentes en boîte de Petri sur cellule unique au moyen d'UME.

Le choix de l'électrode doit alors correspondre aux contraintes électrochimiques et optiques. En d'autres termes, le matériau de cette électrode doit être **conducteur** pour permettre l'étude ampérométrique, mais également **transparent** pour visualiser les cellules en microscopie. Il est également indispensable que l'épaisseur du substrat sur lequel les cellules sont déposées ne soit pas trop élevée. En effet, la microscopie TIRF repose sur l'établissement d'une onde évanescente à l'interface verre/eau. Un substrat trop épais ou d'indice de réfraction du matériau électroactif déposé trop différent de l'indice de réfraction du verre pourrait gêner la génération de l'onde évanescente.

L'**oxyde d'indium dopé à l'étain** (ITO, Indium Tin Oxide) est un mélange d'oxyde d'Indium (In_2O_3) et d'oxyde d'étain (SnO_2) (90/10). L'intérêt principal de l'ITO est qu'il combine conductivité électrique et transparence optique. Un compromis doit cependant être réalisé : l'augmentation de la conductivité de ce matériau entraîne une diminution de sa transparence. Ainsi, en couche

mince (quelques centaines de nanomètres) ce composé, transparent (environ 100 % de transmission pour des longueurs d'ondes allant de 400 à 800 nm),^{104, 183, 184} dispose d'une très bonne conductivité électrique permettant une détection directe des espèces sécrétées par la cellule. De plus, son faible indice de réfraction (1,52) est du même ordre de grandeur que celui du verre (environ 1,5). D'autre part, sa fenêtre de détection, s'étendant de - 0,8 à + 1,2 V vs Ag/AgCl,¹⁸³ est compatible avec la détection des molécules libérées par une cellule (le groupement catéchol classique des neurotransmetteurs comme l'adrénaline ou la dopamine, s'oxydant vers + 0,6 V vs Ag/AgCl).

Nous avons donc choisi de concevoir des électrodes planes d'ITO à partir de lamelles de verre recouvertes d'ITO (dimensions : 22 mm x 22 mm x 0.13 mm, lamelle de verre recouverte par pulvérisation cathodique, ACM, Villiers Saint Frédéric, France). L'épaisseur de la couche d'ITO, déterminée par profilométrie mécanique (*Figure B-21*), est de 165 ± 10 nm. Une telle épaisseur confère donc à l'ITO une faible résistance carrée ($\leq 20 \text{ ohm} \cdot \square^{-1}$). Déposé sur une lamelle de verre, il peut donc servir d'électrode transparente dans la suite de cette étude.

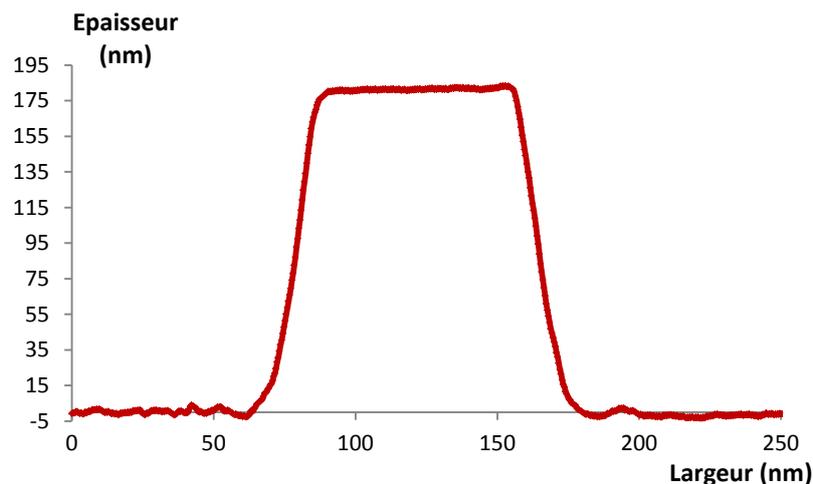


Figure B-21 : Epaisseur de la couche d'ITO déposée sur la lamelle de verre, obtenue par profilométrie mécanique.

II.II. Evolution et procédé de fabrication des dispositifs de couplage

II.II.1. Preuve de concept et premiers dispositifs

Dans un premier temps, un dispositif de principe a été envisagé au laboratoire (*Figure B-22*) à partir d'une lamelle de verre recouverte d'ITO. La détection électrochimique nécessite un rapport signal sur bruit très élevé. Il s'agit donc de limiter la surface d'ITO inactive du point de

vue de la sécrétion cellulaire, comme ce qui est fait lors des études ampérométriques sur UME, la taille de cette dernière étant proche de celle de la cellule.

Ainsi, pour minimiser le signal non faradique, la surface de l'électrode d'ITO doit rester faible, c'est-à-dire ne pas être significativement plus élevée que celle de la cellule étudiée. Une partie de la surface d'ITO de la lamelle a donc été limitée à l'aide d'une résine isolante (SPR 220 ou SU8) par photolithographie, laissant un puits d'ITO de 100 microns de diamètre apparent.¹⁸⁵

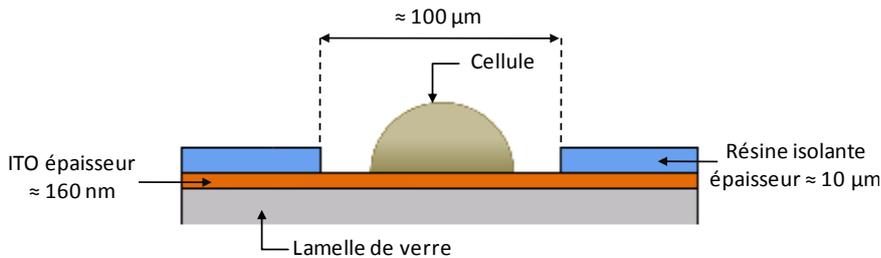


Figure B-22 : Schéma du dispositif de principe pour le couplage de l'ampérométrie et de la microscopie TIRF.

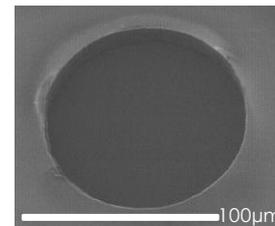


Figure B-23 : Photo en microscopie électronique à balayage de l'UME d'ITO.

Quelques cellules chromaffines en suspension dans du sérum physiologique (Locke, cf. Partie D : Partie expérimentale ; p.232) ont pu être déposées dans le puits d'ITO. Les cellules étudiées, préalablement incubées avec une sonde fluorescente (acridine orange) sont visibles en microscopie de fluorescence (Figure B-24) et la détection ampérométrique de leur sécrétion a été réalisée (Figure B-25). Bien que les deux détections n'aient pas été effectuées simultanément, ce dispositif a permis de montrer que **le matériau choisi était compatible avec les deux techniques analytiques.**

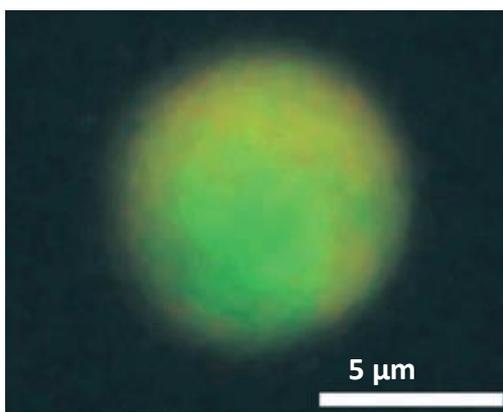


Figure B-24 : Observation d'une cellule chromaffine déposée sur ITO et marquée avec de l'acridine orange en microscopie de fluorescence. Les granules marqués, oranges, sont visibles en épifluorescence.¹⁸⁵

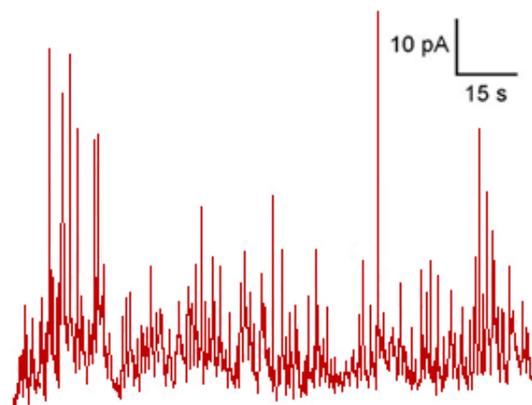


Figure B-25 : Détection ampérométrique de la sécrétion d'une cellule chromaffine stimulée par une solution de barium ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) sur ITO ($E = + 650 \text{ mV vs Ag/AgCl}$).¹⁸⁵

Ces premiers essais avec ce dispositif ont permis de montrer une **preuve de concept** sur cellules chromaffines.¹⁸⁵ Cependant, ce type de dispositif ne convient pas en l'état à l'étude systématique de l'exocytose. D'une part, la probabilité de placer une cellule ou quelques cellules correctement marquées en fluorescence sur une électrode de 100 microns de diamètre est très faible, rendant trop aléatoire cette étape expérimentale. D'autre part, la détection en microscopie TIRF nécessite une bonne adhésion des cellules étudiées, que se soit du point de vue de la viabilité ou de celui de la détection. Ainsi, nous avons envisagé une évolution de ces dispositifs pour augmenter la surface active de l'électrode sans augmenter le bruit électrique et ainsi assurer la double détection à l'échelle de la cellule unique. Son adaptation à la culture cellulaire est également indispensable.

II.II.2. Evolution des dispositifs

La première évolution des dispositifs consiste à faire apparaître plusieurs électrodes indépendantes sur le même dispositif de taille assez faible pour limiter les contributions capacitives mais suffisamment grande pour que des cellules puissent s'y déposer. La surface d'ITO, initialement centimétrique, est alors suffisamment grande pour être séparée en plusieurs zones actives, isolées les unes des autres. Nous avons donc choisi de créer plusieurs électrodes micrométriques et d'ainsi augmenter la probabilité qu'une cellule soit positionnée sur la surface active d'une électrode par comparaison avec le puits de 100 microns de diamètre décrit plus haut. La complexité du montage expérimental utilisé en microscopie TIRF nous a limités à quatre électrodes indépendantes sur chaque lamelle d'ITO.

Les quatre électrodes sont réalisées par photolithographie puis gravure chimique. Tout d'abord, une résine photosensible isolante (AZ 9260) est déposée par « spin-coating » sur les lamelles de verre recouvertes d'ITO (*Figure B-27, étape a*). Après recuit et insolation aux UV (*Figure B-27, étape b*) à travers un masque constitué de quatre bandes (*Figure B-26*), la résine est développée dans un mélange de développeur AZ 400K/eau (2/1) (*Figure B-27, étape c*). Seule la partie insolée de la résine est éliminée lors du développement. A ce stade, le motif des électrodes en résine apparaît sur la lamelle d'ITO.

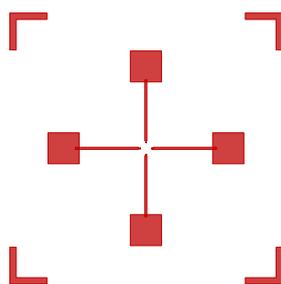


Figure B-26 : Masque utilisé pour obtenir les motifs des électrodes d'ITO : 4 bandes 4,8 mm x 200 μm.

La surface d'ITO non recouverte de résine protectrice est alors gravée chimiquement par une solution commerciale d'acide chlorhydrique pour éliminer cette zone d'ITO puis la résine est éliminée à l'aide d'acétone (Figure B-27, étape d).

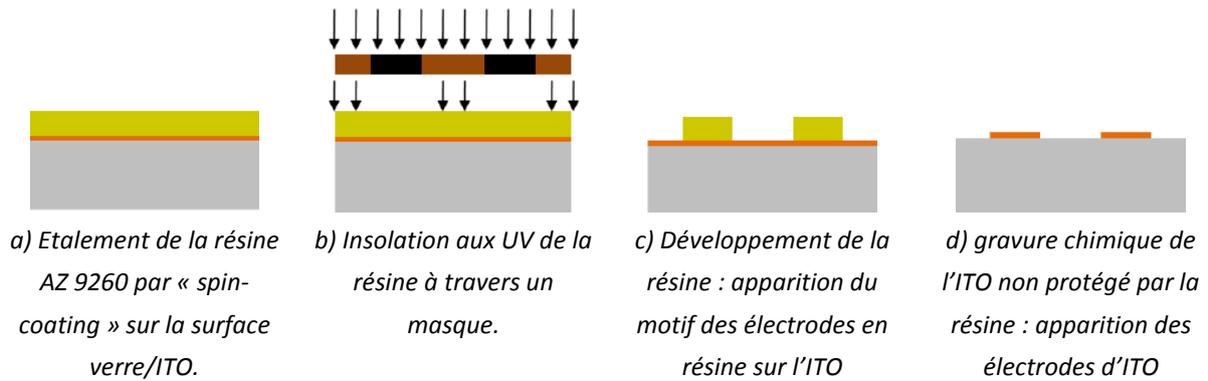


Figure B-27 : Première étape de la fabrication des dispositifs : création des électrodes d'ITO.

Verre ITO Résine AZ 9260

Un premier masque a permis d'obtenir des bandes d'ITO de 100 et 200 μm de largeur. Nous verrons plus tard que l'étude du bruit électrique a montré qu'une largeur de 200 μm permettait de travailler avec un bruit de quelques picoampères, suffisamment faible pour la détection ampérométrique des événements d'exocytose (cf. Partie B, IV.1. Conditions expérimentales).

La deuxième étape de ce procédé de fabrication consiste à isoler électriquement une partie des bandes afin de minimiser le bruit électrique d'origine non faradique. Cette isolation a également été réalisée par photolithographie. Dans un premier temps, une résine photosensible SU8 3010 est déposée par « spin-coating » sur le dispositif avec une épaisseur d'environ 10 μm (Figure B-28, étape a). Cette résine subit un premier recuit, une insolation aux UV (Figure B-28, étape b) à travers un second masque (Figure B-29), puis un second recuit. Après développement dans un bain de PGMEA (Acétate de 2-méthoxy-1-méthyléthyle), la résine SU8 étant négative, seule la partie insolée par les ultraviolets a polymérisé. La zone non insolée va donc être éliminée (Figure B-28, étape c) à l'aide du développeur.

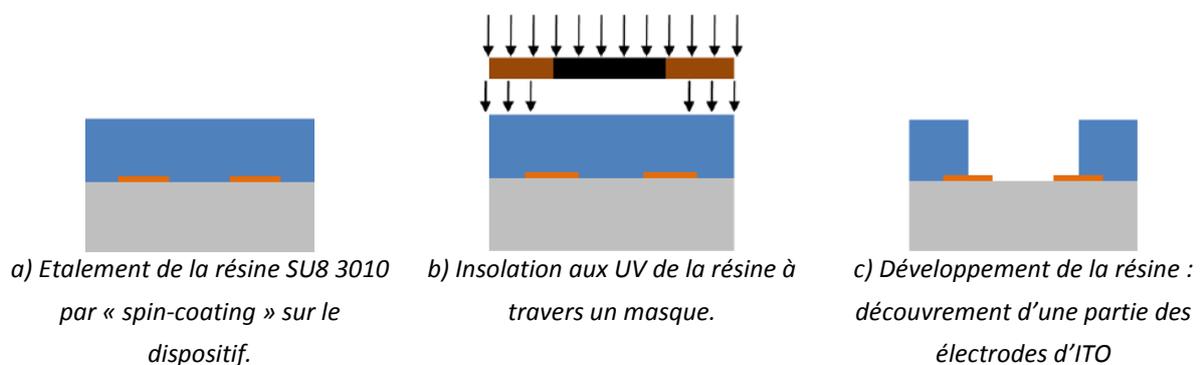


Figure B-28 : Deuxième étape de la fabrication des dispositifs : isolation d'une partie des électrodes

Verre ITO Résine SU8 3010

Le masque de la figure B-29, fait apparaître un cercle de 2,6 mm de diamètre au centre qui permet de ne laisser qu'une longueur de 700 μm de bande découverte. Dans cette configuration (Figure B-30), les bandes d'ITO découvertes, déposées sur la lamelle de verre constituent une marche d'environ 160 nm. Cette épaisseur, très faible, reste cependant non négligeable par rapport à la taille des cellules étudiées si bien que, ayant une meilleure affinité pour le verre que pour l'ITO, les cellules positionnées à l'interface de l'électrode et du substrat pourraient avoir tendance à glisser jusqu'au verre. Nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe suivant pour ce qui est de l'adhésion.

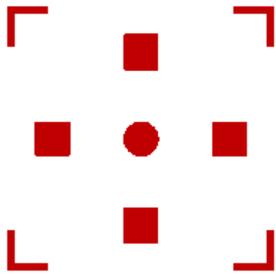


Figure B-29 : Masque utilisé pour isoler partiellement les électrodes d'ITO.

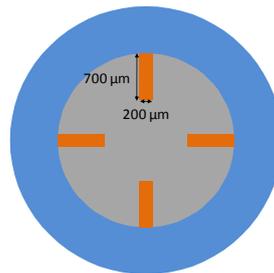


Figure B-30 : Schéma du dispositif.

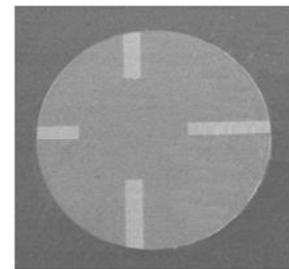


Figure B-31 : Photo en microscopie électronique à balayage du dispositif à quatre électrodes d'ITO.

Ainsi, une autre façon de forcer les cellules à se loger sur la surface d'ITO et donc d'augmenter encore la probabilité d'obtenir des cellules sur les bandes d'ITO a été envisagée à travers deux autres configurations. Les deux nouveaux masques (Figure B-32) permettent de créer des marches entre la résine et l'ITO. Cette fois, l'ITO étant en contrebas et les cellules n'ayant pas d'affinité pour la résine, la quantité de cellules se plaçant sur les électrodes est plus élevée.

Le premier masque est constitué de quatre rectangles de 200 μm x 700 μm qui coïncident avec l'extrémité des électrodes d'ITO, permettant ainsi de ne laisser que la pointe des électrodes découverte. Le second masque est un serpentín dont le canal de 200 μm de largeur permet de découvrir deux carrés de 200 μm x 200 μm d'ITO sur chaque électrode. Expérimentalement, la configuration serpentín permet une meilleure rétention et une meilleure répartition des cellules et ainsi d'obtenir une dizaine de cellules isolées par électrode. Ce nombre de cellules est alors parfaitement adapté à la détection de la sécrétion à l'échelle de la cellule unique puisqu'il permet d'éviter la formation d'amas cellulaires.

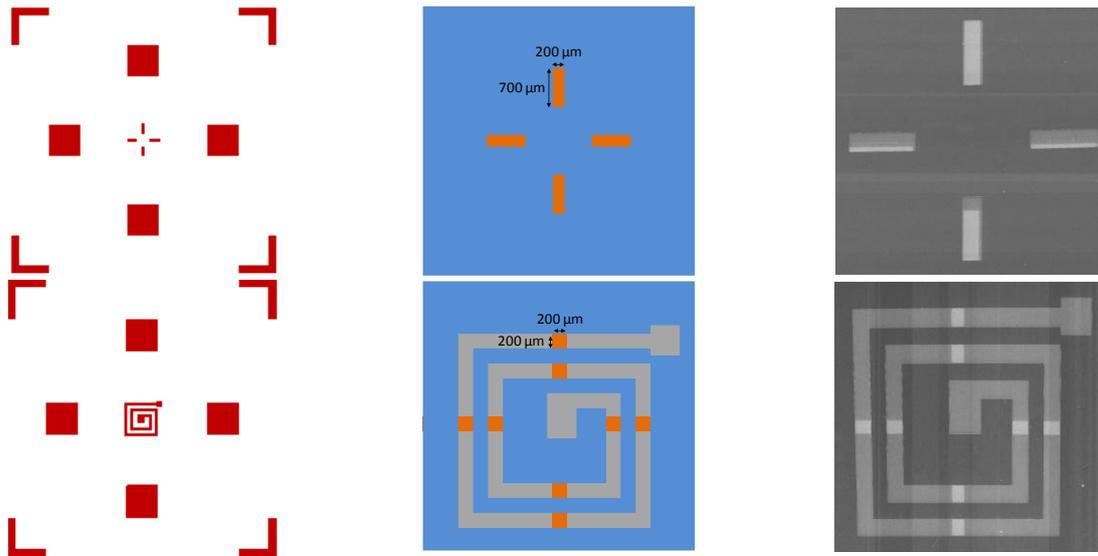


Figure B-32 : A gauche, masques utilisés pour isoler partiellement les électrodes d'ITO ; Au centre, schémas des dispositifs correspondants ; A droite, photos en microscopie électronique à balayage.

Après cette étape de microfabrication, nous nous sommes intéressés à la réalisation des contacts électriques et au montage de ces dispositifs sur boîte de Petri. Les contacts électriques doivent être montés et isolés (cf. *partie D : Partie expérimentale ; p.214*) et, le dispositif est fixé dans une boîte de Petri compatible avec l'appareillage TIRFM (Figure B-33). Dans le but d'obtenir un rapport signal sur bruit le meilleur possible en microscopie TIRF, les cellules doivent reposer au moins 24 heures dans le dispositif et y être cultivées. Vis-à-vis des étapes de la culture cellulaire, l'ensemble présente donc une surface hétérogène verre/résine SU8/ITO a priori défavorable, les cellules risquant d'avoir une affinité marquée pour le verre. Ceci a pu en effet être constaté expérimentalement. Un dépôt de cellules en suspension sur un tel dispositif montre que les cellules adhèrent préférentiellement sur le verre de la boîte de Petri, au détriment de la résine et de l'ITO, en accord avec le caractère hydrophobe de la SU8. Ce problème a pu être résolu par l'intermédiaire d'un traitement au plasma (cf. *partie D : Partie expérimentale ; p.215*) qui rend alors la SU8 hydrophile.^{186, 187} Un dépôt de collagène type IV ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est donc ensuite effectué sur la zone de travail (cf. *partie D : Partie expérimentale ; p.215*) du dispositif afin d'encre améliorer l'adhérence des cellules. On notera qu'il s'agit d'un traitement de surface courant pour l'adhésion cellulaire, même si d'autres (poly-L-lysine, fibronectine) auraient pu être envisagés.

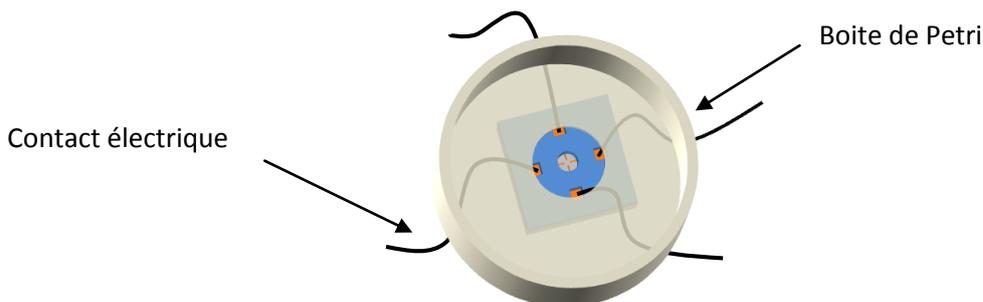


Figure B-33 : Dispositif de couplage collé à la boîte de Petri TIRFM

II.III. Caractérisation électrochimique des dispositifs

Les études préalables avec les cellules chromaffines sur les premiers dispositifs (puits) ont montré que la détection ampérométrique des espèces libérées était possible sur ITO.¹⁸⁵ Comme nous l'avons vu, la dernière étape de la préparation des nouveaux dispositifs consiste cependant à déposer du collagène ($5\mu\text{g.mL}^{-1}$) afin d'améliorer l'adhérence des cellules. Ce dépôt ne doit cependant pas entraver la détection électrochimique des cellules étudiées.

Comme nous en discuterons par ailleurs, le développement de dispositifs microfluidiques pour l'étude électrochimique de l'exocytose a connu un essor particulier ces dernières années, notamment dans le but de diminuer les durées expérimentales par analyse coulométrique.^{12, 188, 189} Il est remarquable que dans de nombreux cas, aucun traitement de surface classique (collagène, poly-L-lysine) n'est réalisé dans le but de favoriser l'adhésion cellulaire et la viabilité des cellules. Dans le cadre d'une preuve de concept, cela ne constitue pas un problème en soi, mais ce point doit être considéré pour les applications futures.

Toutefois, on notera que, dans le cas où de tels traitements sont effectués, leur effet sur la détection électrochimique des molécules libérées n'est quasiment jamais rapporté. A notre connaissance, le seul article qui fasse état de l'effet d'un traitement au collagène correspond à la mise en évidence de la détection de l'activité exocytotique des cellules PC12, émettant de la dopamine,¹⁹⁰ par un réseau d'UME d'or (de diamètre environ 30 microns). Le traitement des surfaces actives et inactives au collagène ($200\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) ne semble pas anodin puisqu'en voltammétrie cyclique ($100\ \text{mV.s}^{-1}$), les intensités du pic de réduction de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ et du pic d'oxydation de la dopamine sont au moins diminuées de moitié sous l'effet du dépôt de collagène. Néanmoins, la voltammétrie cyclique montre que même après modification de la surface au collagène, le réseau reste susceptible de détecter des changements de concentration en dopamine. On notera toutefois que l'intensité du pic d'oxydation de la dopamine est multipliée seulement par trois quand la concentration en échantillon de dopamine est multipliée par cinq. Au bilan, le réseau est à même, après ajout de cellules, de détecter malgré tout la présence et la succession des pics ampérométriques classiques de la libération exocytotique¹⁹⁰ sans qu'il soit possible de savoir si la morphologie des pics et l'information qu'elle contient est déformée ou non. En 2006, K. D. Gillis a publié la mise au point d'un dispositif à base d'ITO (électrodes de $100 \times 20\ \mu\text{m}$ dans un canal de quelques centimètres de longueur) pour la détection de l'exocytose. L'absence d'effet du traitement de surface à la poly-L-lysine est mentionnée, mais uniquement sur la base de réponses exocytotiques similaires entre ITO et fibre de carbone.¹⁹¹

II.III.1. Etude de l'influence du dépôt de collagène sur la détection électrochimique

Pour vérifier si ce film de collagène gêne ou non la détection ampérométrique, l'étude de plusieurs médiateurs électrochimiques a été réalisée en voltammétrie cyclique. Pour les différents systèmes étudiés, les manipulations ont été effectuées dans des solutions à $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ avec une vitesse de balayage de 20 mV.s^{-1} . Afin de pallier le risque de non reproductibilité entre les différents dispositifs utilisés lors de cette étude, la comparaison des voltamogrammes obtenus avec et sans collagène a été réalisée sur le même dispositif en deux étapes : les premiers voltamogrammes sont obtenus sur les dispositifs sans collagène puis ces dispositifs sont recouverts de collagène pour obtenir les seconds voltamogrammes. Les dispositifs utilisés pour cette étude correspondent à la configuration de la figure B-30 (quatre bandes d'ITO $200 \times 700 \mu\text{m}$).

Avant toute chose, une expérience en absence de médiateurs, réalisée dans du tampon physiologique Locke a permis de vérifier que dans la fenêtre de potentiels couramment étudié, ce dernier n'interfère pas avec d'éventuelles réponses électrochimiques (Figure B-34).

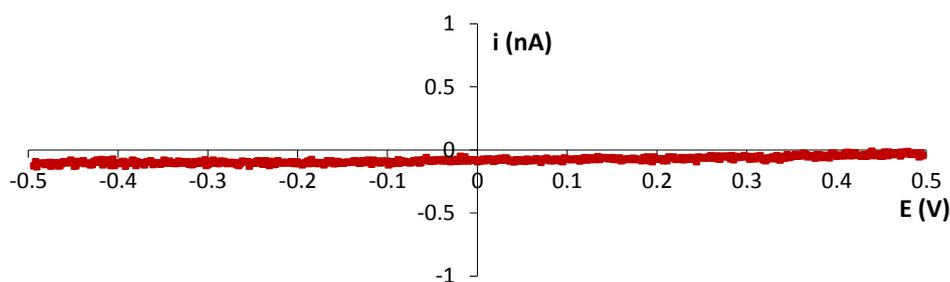


Figure B-34 : Voltamogramme d'une solution de Locke x 1 obtenu sur électrodes d'ITO ; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

a) Etude de molécules classiquement libérées par exocytose

La **sérotonine**, libérée lors de l'exocytose des cellules BON, cellules entérochromaffines qui seront ultérieurement étudiées au cours de la mise au point du couplage microscopie/ampérométrie, a fait l'objet de la première étude. Les voltamogrammes obtenus pour un même dispositif indépendamment du collagène, ne présentent pas de morphologies reproductibles, mettant alors en évidence un phénomène d'adsorption de la sérotonine sur la surface active de l'électrode.

Cet effet de passivation de l'électrode de travail en voltammétrie par la sérotonine est connu dans la littérature que ce soit pour des électrodes millimétriques¹⁹² ou des UME.^{141, 193} Il en est de même pour les catécholamines en général¹⁹⁴ même si les phénomènes d'adsorption sont

nettement plus marqués à haute vitesse de balayage (environ 100 mV.s^{-1}).^{195, 196} On notera que des prétraitements de l'électrode visant à exacerber ces phénomènes constitue une méthode permettant d'augmenter la sensibilité de la détection.^{197, 198} L'élaboration d'électrodes modifiées (nanotubes, porphyrines...) tend plutôt à amplifier le phénomène.^{85, 194, 199, 200} Pour ce qui est de la sérotonine, l'utilisation de vitesses de balayage très élevées avec une marche de potentiel adaptée (1000 V.s^{-1})²⁰¹ ou de surface particulière¹⁹² limitent les problèmes de passivation.

L'étude par voltammétrie cyclique sur ce médiateur a cependant permis de démontrer la faisabilité de la détection de la sérotonine sur électrode d'ITO (Figure B-35), mais ne permet pas d'obtenir des informations quant à l'effet du collagène sur la réponse électrochimique de l'électrode dans les conditions du couplage.

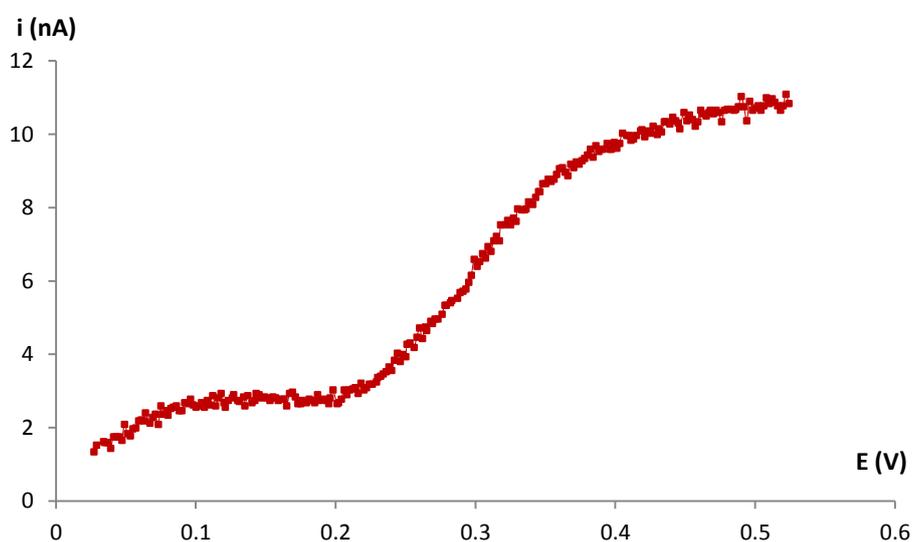


Figure B-35 : Voltammogramme d'une solution de sérotonine ($C = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) obtenu sur électrode d'ITO ; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, référence Ag/AgCl.

Dans le cadre de l'étude de l'exocytose sur cellule unique, la vitesse d'adsorption relativement faible de la sérotonine²⁰¹ ainsi que les quantités de molécules libérées extrêmement faibles (de l'ordre de quelques femtomoles ou moins) impliquent que ce phénomène de passivation observé *in vitro* en voltammétrie cyclique ne constitue pas une limitation pour la détection ampérométrique de l'exocytose.

De la même façon, les études de l'oxydation de l'**adrénaline** (molécules libérées par les cellules chromaffines) *in vitro* entraîne une passivation de l'électrode en voltammétrie cyclique sur ITO.

b) Etude de systèmes électrochimiques classiques

Dans le but de pouvoir étudier l'effet du collagène sur la détection de nos électrodes d'ITO, nous nous sommes tournés vers des systèmes électrochimiques plus classiques.

Cette même étude a alors été réalisée sur le **système Ru (III)/Ru (II)** ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}/\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$) (Figure B-36) et le **système Fe (III)/Fe (II)** ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) (Figure B-37) en solution dans du tampon physiologique Locke.

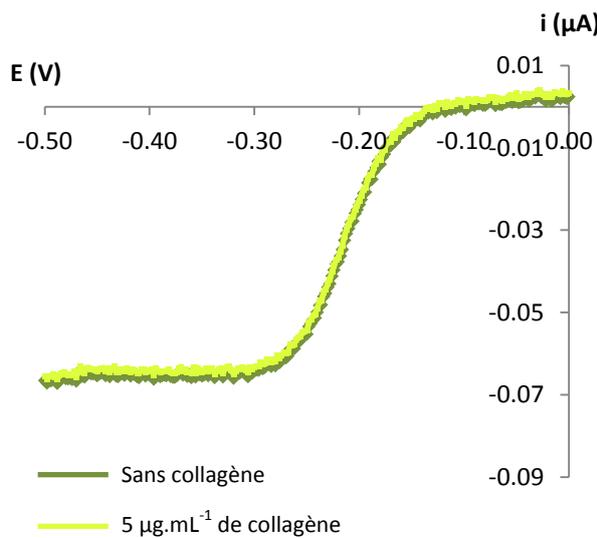


Figure B-36 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur électrode d'ITO ; $C_{\text{Ru}} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, référence Ag/AgCl, $C_{\text{collagène}} = 5 \text{ µg.mL}^{-1}$.

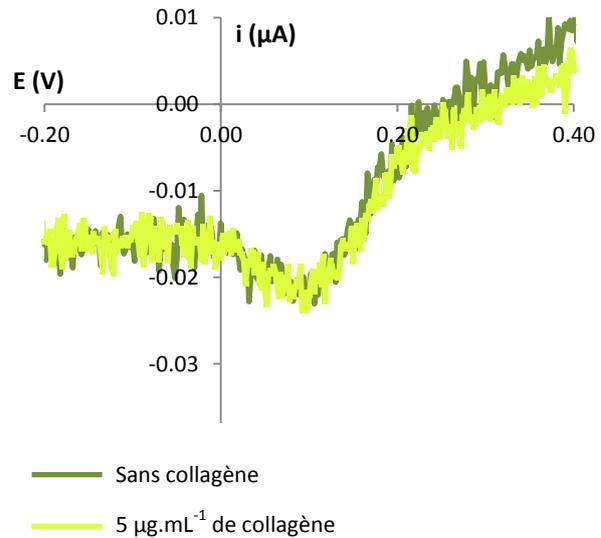


Figure B-37 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur électrode d'ITO ; $C_{\text{Fe}} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, référence Ag/AgCl, $C_{\text{collagène}} = 5 \text{ µg.mL}^{-1}$.

Les voltammogrammes obtenus lors de la réduction du ruthénium et du fer avant et après dépôt de 5 µg.mL^{-1} de collagène sont identiques dans les conditions de l'expérience. Ainsi, déposé à une telle concentration, **le collagène ne modifie pas la détection électrochimique.**

II.III.2. Influence de la concentration de collagène

Avec une concentration de collagène déposé de 5 µg.mL^{-1} (cf. *Partie D : Partie expérimentale ; p.215*), nous n'observons pas de différences notables dans la détection électrochimique. Cependant, comme déjà précisé dans les paragraphes précédents, une étude de la sécrétion de dopamine par les PC12 a montré que pour un dépôt de 200 µg.mL^{-1} de collagène sur les électrodes détectrices, l'intensité du signal électrochimique diminuait pour ce qui est de la

voltammétrie cyclique *in vitro*.¹⁹⁰ La structure du collagène de type IV, composé de 3 chaînes polypeptidiques associées en triple hélice, dépend cependant de la concentration déposée. A des concentrations de l'ordre de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, il se forme un réseau de fibres non organisées (de 50 à 200 nm d'épaisseur) qui en se liant aux protéines de la membrane cellulaire,²⁰² améliore l'adhésion cellulaire. A partir de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, les fibres commencent à s'organiser. Elles deviennent dès lors parallèles et ne se superposent plus. A $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, les fibres commencent à s'associer les unes aux autres et forment des bandes jusqu'à devenir un film à 2mg.mL^{-1} .²⁰²

Dans le but de vérifier que l'absence d'effet observé dans notre cas est bien liée à la faible concentration en collagène déposé, nous avons étudié son influence sur la gamme de concentration de collagène suivante (Tableau B-1) :

Dilution	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
C _{collagène}	0	$2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$50 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$100 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Tableau B-1 : Gamme de concentrations du collagène.

Comme précédemment, l'étude en voltammétrie cyclique a été réalisée à partir de solution de ruthénium (III) et de fer (III) à $10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$ dans le sérum de Locke à une vitesse de balayage de 20mV.s^{-1} (référence Ag/AgCl). Les figures B-38 à B-43 présentent les voltamogrammes obtenus sans et avec collagène pour chaque concentration. Les voltamogrammes correspondant à une concentration en collagène de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été présentés précédemment, figures B-36 et B-37.

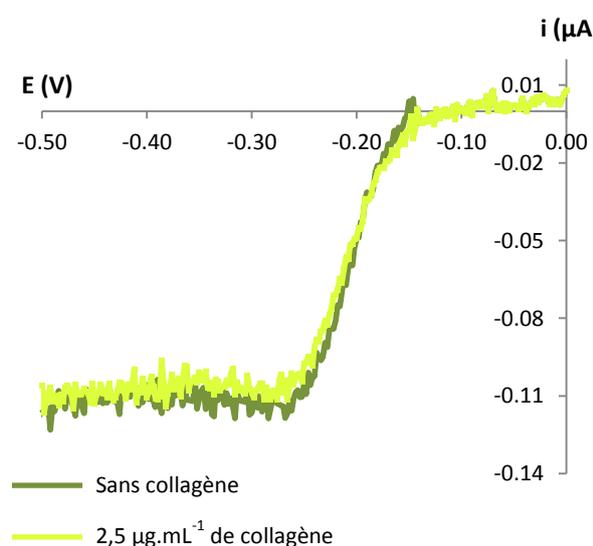


Figure B-38 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{\text{Ru}} = 10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{mV.s}^{-1}$; $C_{\text{collagène}} = 2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

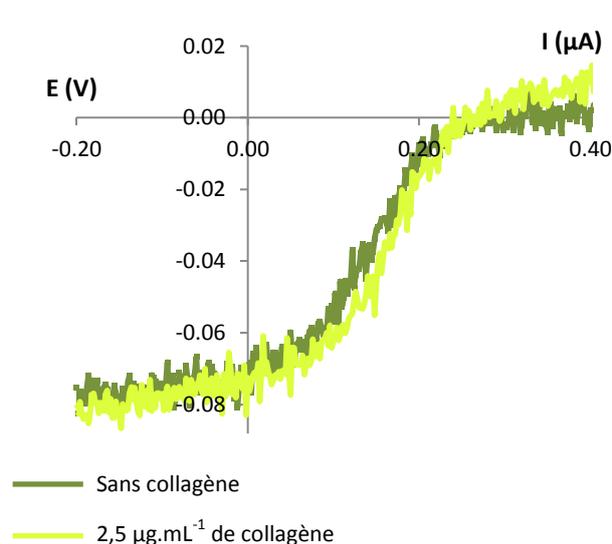


Figure B-39 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; $C_{\text{Fe}} = 10^{-3} \text{mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{mV.s}^{-1}$; $C_{\text{collagène}} = 2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

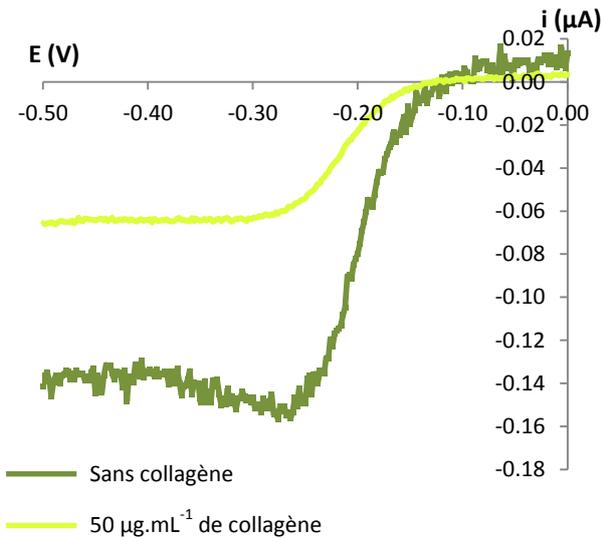


Figure B-40 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 50 \text{ μg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

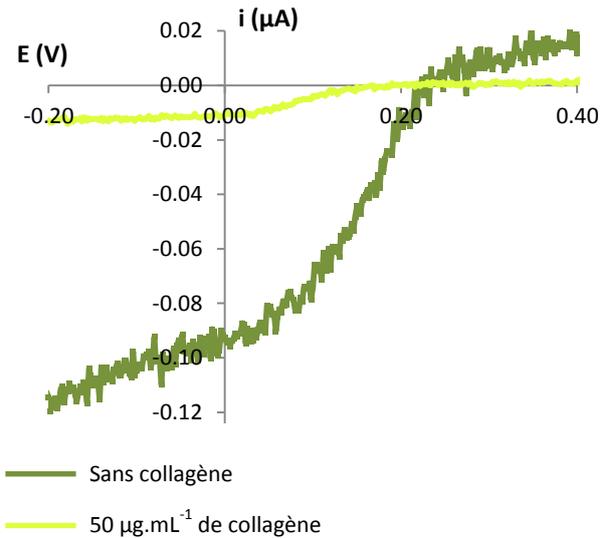


Figure B-41 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 50 \text{ μg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

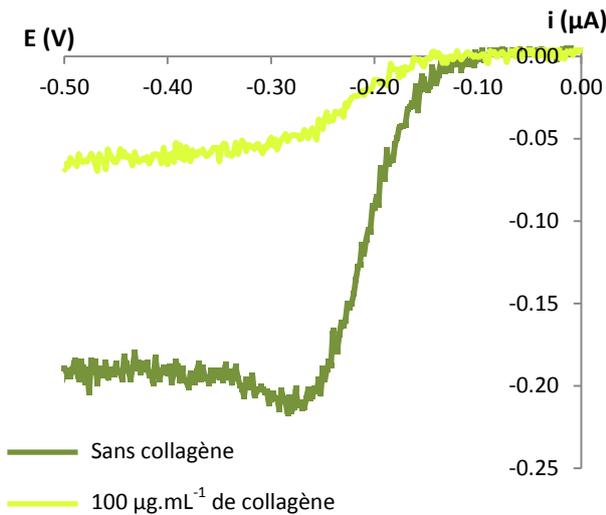


Figure B-42 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 100 \text{ μg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

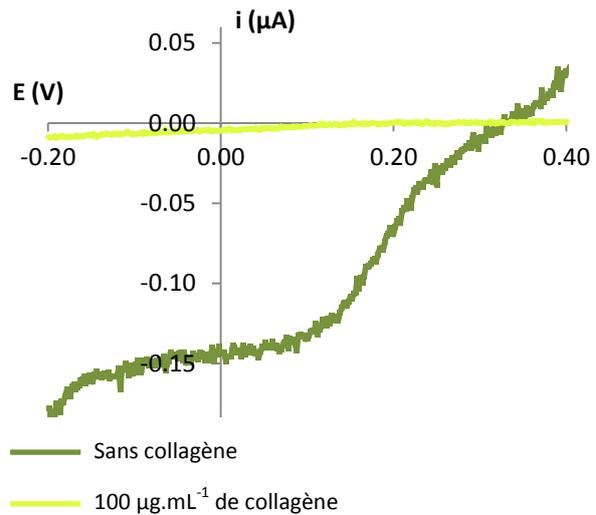


Figure B-43 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 100 \text{ μg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

Pour une modification et une figure donnée (avec et sans collagène), les voltammogrammes ont été réalisés à partir du même dispositif, assurant ainsi la fiabilité de la comparaison. Cependant, d'une étude (avec et sans collagène) et ainsi d'une figure à l'autre, on notera des variations d'intensité (voir par exemple pour les figures B-38, B-40 et B42 pour les voltammogrammes sans collagène) qui peuvent s'expliquer par le fait que les données sont alors été obtenues à partir de dispositifs différents, et donc avec une surface active pas parfaitement reproductible. En effet,

lors de la fabrication des dispositifs, la gravure de l'ITO n'est contrôlée qu'à quelques dizaines de microns en raison de la vitesse de gravure élevée. De plus, l'alignement du second masque, utilisé pour l'isolation des bandes, se fait à l'œil nu. Ainsi, la longueur des bandes peut également être légèrement modifiée. Ceci n'affecte en rien les conclusions de l'étude puisque nous nous sommes assurés, pour chaque concentration en collagène déposé de la constance, que ce soit en taille ou en morphologie, du dispositif vis-à-vis de la modification. De ce fait, le dépôt de collagène n'altère donc pas la détection électrochimique pour des valeurs de concentration inférieures à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour les concentrations supérieures, l'intensité du courant mesuré est d'autant plus faible que la concentration en collagène est élevée. En effet, la diminution de l'intensité du courant de plateau, par rapport au même dispositif sans collagène, est plus importante pour $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que pour $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ces observations coïncident donc avec notre hypothèse sur la structure du collagène obtenue à ces différentes concentrations : en dessous de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (c'est-à-dire dans nos conditions), les fibres ne sont pas associées et suffisamment espacées pour ne pas gêner la diffusion des espèces et alors entraver voire inhiber la détection électrochimique. Par contre, pour des concentrations plus élevées, les fibres commencent à s'associer et à recouvrir la surface des électrodes, et ainsi les isoler. Quoi qu'il en soit, **le dépôt de collagène choisi dans cette étude, qui correspond à des conditions habituelles en biologie pour ce qui est de la culture/viabilité des organismes cellulaires, est également adéquat pour ce qui est de l'analyse (pas de déformation du signal).**

II.III.3. Influence de la vitesse de balayage

L'étude de l'influence du collagène déposé sur le réseau d'électrodes d'or qui a montré qu'à une concentration en collagène déposé de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, la sensibilité du dispositif diminuait,¹⁹⁰ est basé sur la voltammétrie cyclique à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.¹⁹⁰ Or, il n'est également pas exclu que les vitesses de balayage utilisées dans nos études et celles de Cui et al. puissent, au-delà des concentrations en collagène, expliquer les écarts obtenus. Même si cela paraît peu probable au vu des études présentées en II.III.2. *Influence de la concentration de collagène*, par soucis de cohérence, l'intensité maximale (valeur du courant de plateau) du courant de réduction des deux systèmes Ru (III)/Ru (II) et Fe (III)/Fe (II) a donc été étudiée à différentes vitesses de balayage sans et avec $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de collagène déposés sur les électrodes d'ITO (*Figure B-44 à B-51*). La concentration de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été choisie car il a été démontré au paragraphe précédent qu'à cette concentration en collagène, ce dernier n'a pas d'effet d'isolement de la surface des électrodes.

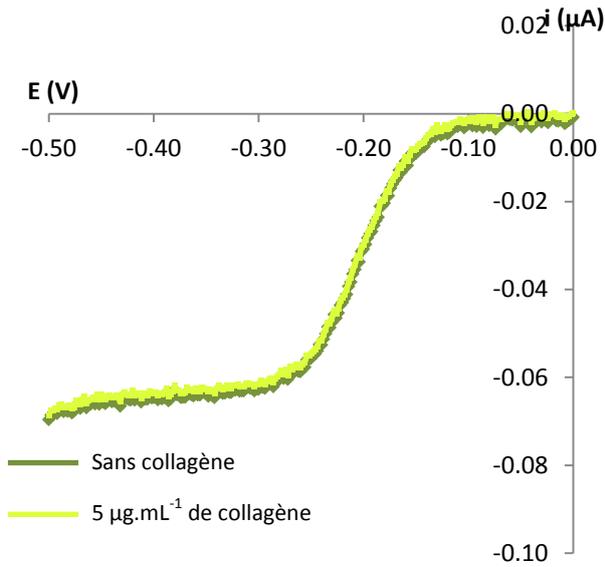


Figure B-44 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 5 \text{ μg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

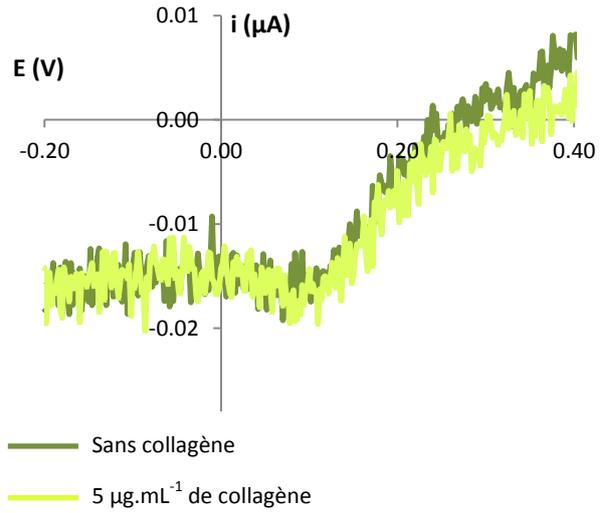


Figure B-45 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 5 \text{ μg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

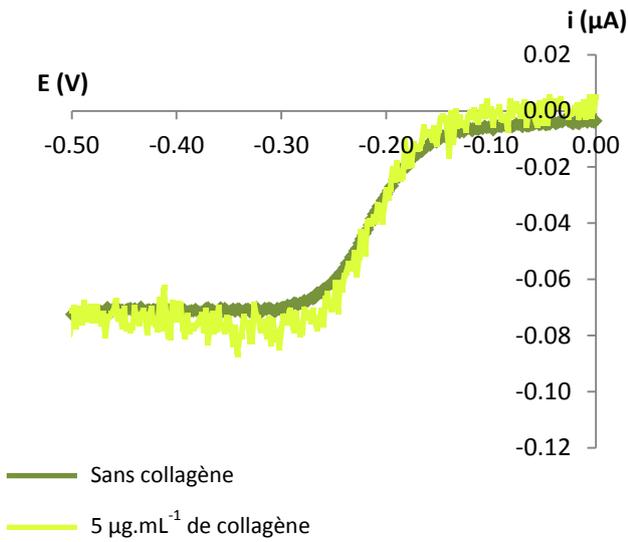


Figure B-46 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 5 \text{ μg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

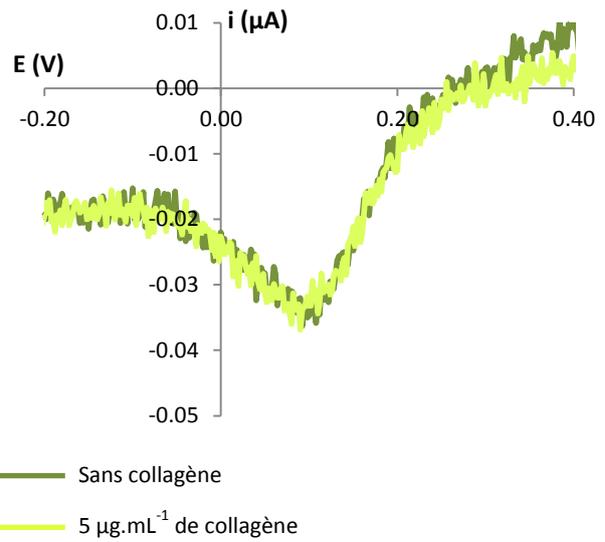


Figure B-47 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 5 \text{ μg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

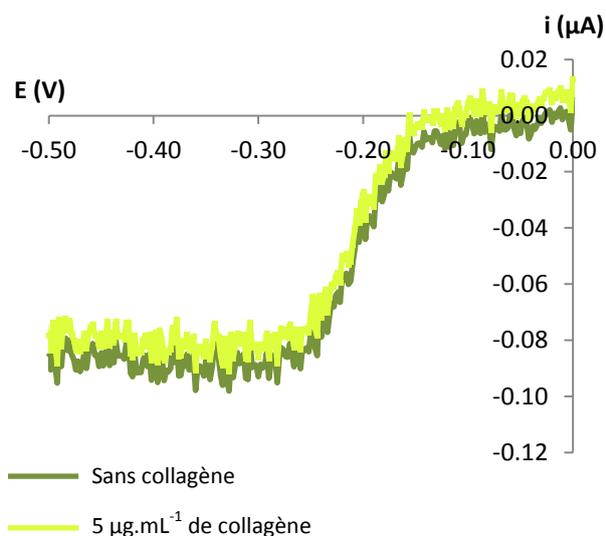


Figure B-48 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 5 \text{ µg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

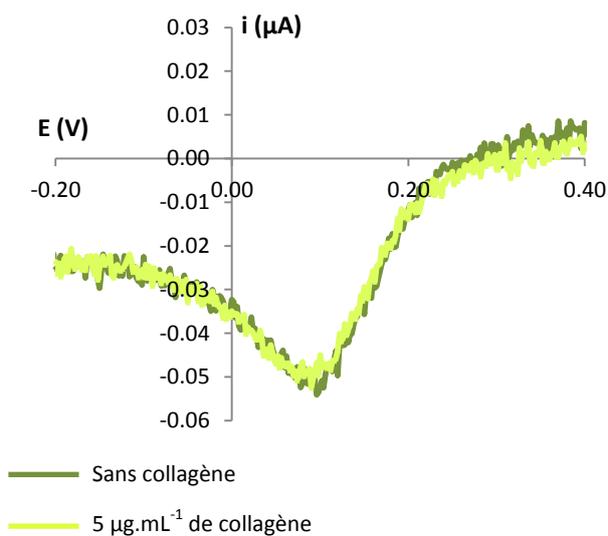


Figure B-49 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO ; $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 5 \text{ µg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

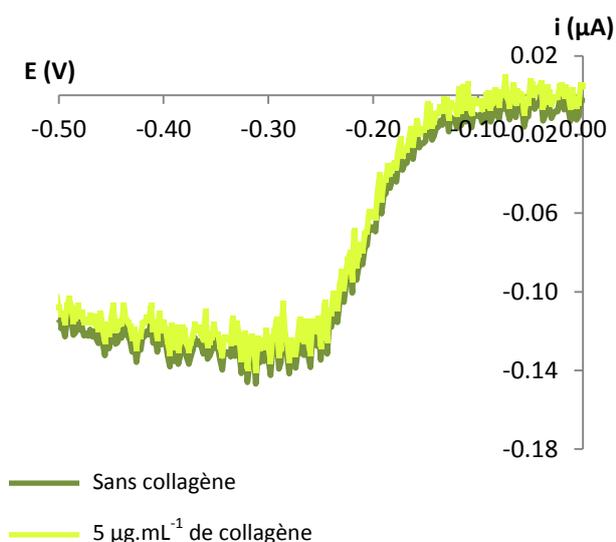


Figure B-50 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur ITO ; $C_{Ru} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 500 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 5 \text{ µg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

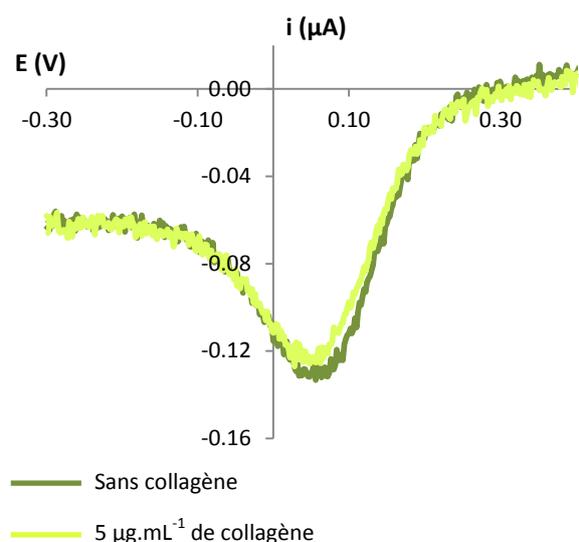


Figure B-51 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur ITO, $C_{Fe} = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 500 \text{ mV.s}^{-1}$; $C_{collagène} = 5 \text{ µg.mL}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

D'après ces voltammogrammes, on remarque effectivement une augmentation de l'intensité du courant de réduction du ruthénium (III) et du fer (III) avec l'augmentation de la vitesse de balayage. Cependant, cette augmentation est la même entre les dispositifs sans et avec collagène pour 5 µg.mL^{-1} de collagène déposé. **Ces observations confirment qu'un dépôt de collagène de 5 µg.mL^{-1} ne gêne pas la détection électrochimique.**

On remarque également une différence de comportement électrochimique entre le ruthénium et le fer. Dans le cas de la réduction du fer, le comportement stationnaire n'est plus atteint dès $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ alors que dans le cas de la réduction du ruthénium, le comportement stationnaire est conservé jusqu'à $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. L'explication de cette différence n'est pas si simple, en particulier car la dimension des bandes ($200 \mu\text{m} \times 700 \mu\text{m}$) utilisées les situent dans une zone « intermédiaire » entre ultramicroélectrodes et électrodes millimétriques, entre géométrie de type bande et géométrie de type disque. Malgré tout, ces observations peuvent s'expliquer par le fait que pour une ultramicroélectrode de dimension donnée, il existe une condition limite de vitesse de balayage pour obtenir une réponse stationnaire. Cette condition dépend principalement du coefficient de diffusion de l'espèce, qui est différent pour le fer et le ruthénium, mais aussi de la taille de l'électrode (et de sa géométrie) qui comme précisé précédemment, peut varier lors de la microfabrication.

II.III.4. Comparaison de la vitesse de transfert électronique sur carbone et ITO

Nous avons vu que la détection ampérométrique des espèces libérées par une cellule unique s'effectuait habituellement sur une UME de carbone. A travers l'analyse logarithmique ci-dessous, nous avons comparé la vitesse de transfert électronique sur nos électrodes d'ITO à celle sur électrode de carbone afin de vérifier si le matériau d'électrode choisi pour nos dispositifs se comporte électrochimiquement de manière similaire.

L'équation du courant pour un système Ox/Red rapide est de la forme :

$$E = E_{\text{Ox/Red}}^0 + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{D_R}{D_O}\right) + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{i - i_{dc}}{i_{da} - i}\right) \quad \text{Equation B-2}$$

En estimant que les coefficients de diffusion (D_R , D_O) des espèces en solutions ont des valeurs voisines, on obtient (avec i_{dc} et i_{da} , les courants limites de diffusion) :

$$E = E_{\text{Ox/Red}}^0 + \frac{0,06}{n} \log\left(\frac{i - i_{dc}}{i_{da} - i}\right) \quad \text{Equation B-3}$$

Pour une solution ne contenant qu'un oxydant (cas de nos sondes Ru (III) et Fe (III)), on a :

$$E = E_{\text{Ox/Red}}^0 + \frac{0,06}{n} \log\left(\frac{i - i_{dc}}{-i}\right) \quad \text{Equation B-4}$$

Les réductions de Ru (III) et Fe (III) sont monoélectroniques, le transfert sera rapide si la courbe

$E = f\left(\frac{i - i_{dc}}{-i}\right)$ correspond à une droite de pente 60 mV.

L'analyse des voltammogrammes stationnaires sur UME de carbone et bande d'ITO pour les deux solutions de Ru (III) et Fe (III) ($20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) montre un décalage de la détection sur ITO vers les potentiels plus anodiques (Figure 52 et 53). Cette surtension est due à la nature des électrodes de travail, en carbone ou en ITO.

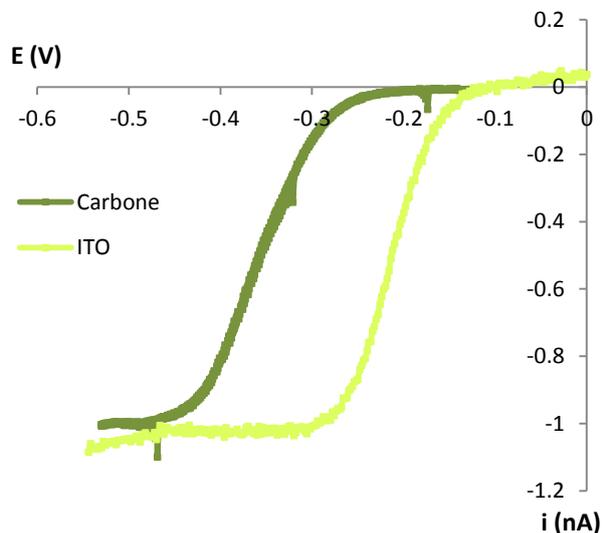


Figure B-52 : Réduction du Ru (III) en Ru (II) sur UME de carbone et bande d'ITO ; référence Ag/AgCl ; $C_{\text{Ru}} = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

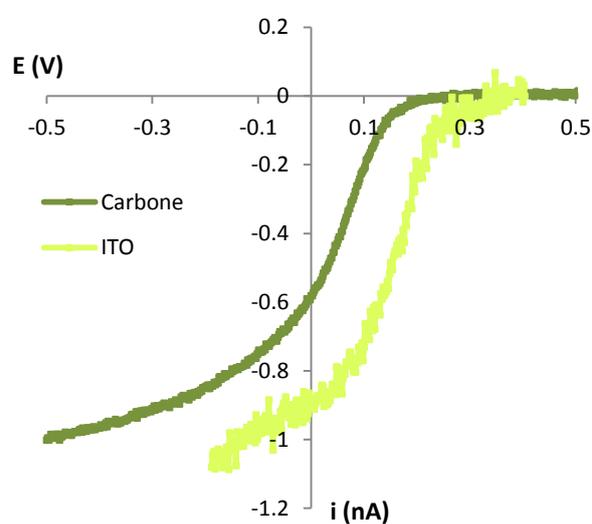


Figure B-53 : Réduction du Fe (III) en Fe (II) sur UME de carbone et bande d'ITO ; référence Ag/AgCl ; $C_{\text{Fe}} = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

On notera que l'oxydation de la sérotonine sur une électrode d'ITO est également facilitée mais dans une moindre mesure ($E_{1/2}^{\text{ITO}} = 300 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ vs Ag/AgCl) par rapport à une UME de carbone ($E_{1/2}^{\text{C}} = 321 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ vs Ag/AgCl).²⁰³

Par ailleurs, l'analyse logarithmique montre que les vitesses de transfert électronique ne sont pas modifiées lors de l'utilisation de bandes d'ITO par comparaison avec les UME de carbone. Le transfert reste rapide pour le système Ru (III)/Ru (II) (pente de 55 mV et 61 mV sur ITO et carbone respectivement) et lent pour le système Fe (III)/Fe (II) (pente de 102 mV et 96 mV sur ITO et carbone respectivement).²⁰⁴

Même si cela est au-delà du champ de nos études puisque la concentration en collagène choisie ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) n'affecte pas la nature de la détection, on remarque que dans le cas où le collagène diminue la sensibilité de l'électrode, les vitesses de transfert électronique restent inchangées pour les systèmes Ru (III)/Ru (II) et Fe (III)/Fe (II), suggérant alors une simple diminution de la surface active de l'électrode par le dépôt de collagène.

Ces deux caractérisations nous permettent de confirmer que la détection de la sécrétion des cellules sur ITO est possible et nous permet de suivre la libération des espèces en temps réel.

III. Choix d'un modèle cellulaire adéquat pour le couplage de l'ampérométrie et de la microscopie TIRF

Dans le cadre de la démonstration et du développement du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente, le choix du modèle cellulaire est primordial.

Il est alors essentiel de choisir le modèle nous permettant d'accéder à la meilleure sensibilité de détection que se soit par ampérométrie ou microscopie TIRF. Compte tenu de la résolution temporelle de la caméra utilisée en microscopie TIRF (100 ms dans le cas de notre montage expérimental), la corrélation des informations électrochimiques et optiques n'est possible que si la durée moyenne de sécrétion entre les événements dépasse largement cette résolution. Dans le cas contraire, l'attribution des signatures optiques et électrochimiques à un événement serait impossible. Un raisonnement similaire s'applique pour la détection électrochimique pour laquelle une fréquence trop intense entraînerait un nombre de pics superposés trop important et donc inexploitable. En conclusion, une trop forte sécrétion pourrait entraîner une superposition des signaux optiques et/ou ampérométriques et surtout une difficulté à attribuer à chaque pic ampérométrique le signal optique correspondant. La résolution de notre caméra actuelle est de 100 ms. La probabilité de recouvrement pour des événements de $t_{1/2}$ d'environ 30 ms est de l'ordre de 15 % pour une fréquence de 1,4 Hz.⁹⁷ Une valeur de 1 Hz ou moins constitue donc une valeur acceptable qui correspond à la majeure partie des modèles cellulaires classiquement étudiés dans la littérature (*Tableau B-2*).

Dans l'immédiat, afin de déterminer un modèle cellulaire adapté au développement de ce couplage, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques électrochimiques de la sécrétion de différents types cellulaires.

III.I. Systèmes biologiques permettant l'étude de l'exocytose : intérêts et limites

Le mécanisme d'exocytose a fait et fait encore l'objet de nombreuses études à l'échelle de la cellule unique. Comme nous l'avons vu, l'analyse électrochimique des événements détectés sur microélectrode de carbone apporte des informations sur la quantité de molécules libérées ainsi que sur la dynamique de sécrétion que ce soit globalement ou au niveau de l'événement isolé. Dans le cadre du couplage électrochimie/fluorescence que nous souhaitons mettre en place, la

question du modèle cellulaire se pose comme nous venons de le voir dans l'introduction de cette section.

La comparaison des paramètres des pics ampérométriques obtenus sur plusieurs types cellulaires nous a permis, en cohérence avec les considérations sur la fréquence, de choisir un modèle adapté à la démonstration du couplage envisagé.

III.1.1. Les neurones

Les cellules nerveuses contiennent deux types de vésicules. Les vésicules à cœur dense dites « dense core » (constituées de protéines, de peptides...) libèrent leur contenu au niveau du corps neuronal, et des vésicules plus petites (environ 50 nm de diamètre), les vésicules synaptiques, sont générées par endocytose au niveau de la terminaison synaptique. Ces vésicules contiennent des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine, le glutamate, la glycine ou l'acide γ -aminobutyrique (GABA), qu'elles libèrent à la terminaison synaptique. Les premières études ayant permis de quantifier la sécrétion lors de l'exocytose datent des années 50. En insérant une ultramicroélectrode dans les fibres neuromusculaires de grenouilles, P. Fatt et B. Katz ont montré qu'il était possible de déterminer la charge électrique transférée à travers la membrane cellulaire suite à l'arrivée d'un potentiel d'action.²⁰⁵

Cependant, les neurones sont des cellules amitotiques (incapables de se reproduire) et leur structure fragile rend leur manipulation délicate. L'insertion d'une UME dans une synapse n'est par ailleurs pas envisageable actuellement, la fente synaptique ne faisant que quelques dizaines de nanomètres.²⁰⁶ La même limitation vaut d'ailleurs pour le patch-clamp.

Pour étudier la sécrétion de cellules uniques sans être limité expérimentalement par les problèmes exposés ci-dessus, l'emploi de techniques électrochimiques a été appliqué par de nombreux groupes de recherche à d'autres catégories d'organismes biologiques, les cellules hématopoïétiques et les cellules endocrines.

III.1.2. Les cellules hématopoïétiques

Les **mastocytes** de souris beiges contiennent des granules de diamètre de 0,4 à plusieurs microns^{68, 137, 207} contenant de l'histamine et de la sérotonine associées à une matrice de protéoglycanes.¹⁵² La concentration granulaire globale en hormones est de l'ordre de $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ mais les granules contiennent également des lipides, des cytokines, de chemokines et des facteurs de croissance qui sont libérés après activation.

Ces cellules ne sont viables en culture que pendant 48 heures, mais récemment, leur co-culture avec des fibroblastes a permis de prolonger leur viabilité à 28 jours.¹⁵³ L'étude électrochimique de la sécrétion des mastocytes a permis de déterminer les paramètres caractéristiques moyens des pics ampérométriques. La charge moyenne des pics est d'environ **1 pC**, l'intensité maximale moyenne est d'environ **16 pA** et la largeur à mi-hauteur des pics est approximativement **95 ms**.

Enfin, leur fréquence de sécrétion est de l'ordre de **2,5 Hz** (*Tableau B-2*). Ces données ne sont que des valeurs moyennes et ne sont pas forcément représentatives. En effet, les mastocytes possèdent des granules présentant une distribution de taille très large, les caractéristiques ampérométriques sont donc très différentes d'un événement à l'autre.

III.1.3. Les cellules endocrines

Les **cellules chromaffines** de la glande médullosurrénale sont couramment utilisées pour étudier l'exocytose par ampérométrie, la plupart de leurs propriétés physiologiques et biochimiques les rendant très similaires aux neurones. Ces cellules ne sont pas viables en culture au-delà de quelques jours et nécessitent donc une préparation délicate avant toute manipulation. Elles contiennent des granules d'environ 300 nm de diamètre²⁰⁸ dans lesquels, des catécholamines sont stockées à une concentration de l'ordre de $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$.¹⁵³

L'analyse électrochimique de leur sécrétion montre qu'une importante quantité adrénaline/noradrénaline est libérée pendant l'exocytose à une fréquence relativement élevée (*Tableau B-2*). En effet, la charge moyenne des pics ampérométriques est de l'ordre de **1 pC** et pour une électrode au contact membranaire, l'intensité maximale moyenne, de l'ordre de **80 pA**, la largeur à mi-hauteur, d'environ **27 ms** et la fréquence de sécrétion est d'environ **1,3 Hz**. Ces valeurs peuvent être affectées par la provenance des cellules (souris, veau, bœuf...) et/ou du sécrétagogue mais sont assez représentatives des événements observés.

La **lignée cellulaire PC12**, établie en 1976 et dérivée d'une tumeur de la glande médullosurrénale de rat mâle (phéochromocytome), est également très utilisée pour l'étude de l'exocytose sur cellule unique car la prolifération et la différenciation de ces cellules sont connues et maîtrisées. Du fait de la dérive clonale, les différents sous-clones existants présentent quelques différences au niveau de leur sécrétion. En particulier, certaines lignées sécrètent toujours alors que d'autres ont perdu cette faculté. Ainsi, ces cellules, facilement maintenues en culture, nécessitent un chargement en matériel électroactif (dopamine) préalable aux manipulations électrochimiques afin de pouvoir étudier leur sécrétion.

Les granules des PC12 ont un diamètre d'environ 150 nm^{209} et accumulent donc moins de molécules que ceux des chromaffines car de diamètre inférieur pour une concentration du même ordre de grandeur. En effet, l'étude électrochimique de leur sécrétion montre que la charge moyenne des pics ampérométriques correspondants est de l'ordre de **70 fC** et l'intensité maximale moyenne est d'environ **11 pA**. La largeur à mi-hauteur des pics est d'environ **7,3 ms** et leur fréquence de sécrétion, **0,8 Hz** (Tableau B-2).

Les vésicules des **cellules β du pancréas** ont un diamètre d'environ 500 nm^{153} et contiennent de l'insuline.^{210, 211} Cette hormone s'oxyde trop lentement pour être détectée électrochimiquement sur électrode de carbone dans les conditions physiologiques. Cependant, des électrodes modifiées avec un oxyde de ruthénium peuvent être utilisées pour catalyser son oxydation.⁶¹ Les paramètres caractéristiques moyens des pics ampérométriques correspondants sont les suivants : la charge moyenne est de l'ordre de **0,22 pC**, l'intensité maximale moyenne, d'environ **2,5 pA**, la largeur à mi-hauteur, **45 ms** et la fréquence de sécrétion **0,9 Hz** (Tableau B-2). Ce type de cellules peut également être chargée avec de la sérotonine qui se loge dans le même type de vésicules que l'insuline. Les paramètres ampérométriques des pics occasionnés par la libération vésiculaire de sérotonine se différencient essentiellement par leur très courte durée ($t_{1/2}$ de l'ordre de 5 ms).¹⁰⁵

Le tableau B-2 présente quelques valeurs de la littérature des paramètres de pics ampérométriques obtenus sur les différents modèles cellulaires présentés précédemment. Il reflète la grande variabilité des résultats. Cette distribution de valeur est essentiellement due au fait que selon les laboratoires, les manipulations ne sont pas effectuées dans les mêmes conditions. Les modes opératoires, et en particulier, la nature du sécrétagogue utilisé ou la concentration choisie lors d'un éventuel chargement en molécules électroactives, modifient énormément les résultats obtenus. La variabilité cellulaire et les différentes méthodes d'analyse de chaque équipe de recherche participent également à l'explication de cette large distribution.

Modèle cellulaire	Q (pC)	I _{max} (pA)	t _{1/2} (ms)	Fréquence (Hz)	Sécrétagogues
Mastocytes (histamine, sérotonine)	0,25 – 2,05 80, 83, 87, 212, 213	8 – 24,5 80, 87	39,4 – 152 80, 83, 86	1,90 - 3,09 83, 87, 213	GTPγS – cagé ^{86, 212} Ca²⁺-cagé ²¹² Ca²⁺ ionophore A23187 ^{83, 214} digitonine ⁸³ ; BaCl₂ ⁸⁰ ; C_{48/80} ⁸⁷
Chromaffines (catécholamines)	0,55 – 2,26 16, 57, 80, 83, 117, 212, 214-217, 106, 142, 93	11 – 170 16, 80, 106, 117, 142, 215-2179	3,6 – 190 57, 80, 83, 117, 142, 215-217 82, 93	0,38 – 2,10 117, 215, 217	GTPγS – cagé ²¹² ; Ca²⁺-cagé ²¹² ; K⁺ ^{83, 214} ; digitonine ⁸³ ; Ba²⁺ ^{80, 106, 117, 142, 216 93,} mécanique ⁵⁷ ; Ca²⁺ ⁸²
PC12 (dopamine)	0,013 – 0,072 215, 60, 84, 132, 209, 218	4,7 – 31,4 215, 122, 132, 209, 218	2,23 – 11,2 215, 122, 132, 209, 218	0,12 – 1,5 215, 122, 209, 218	K⁺ ^{214, 215,} ^{60, 122, 132, 209, 218,} Nicotine ⁶⁰ ; ATP ²⁰⁹
β pancréatiques (insuline)	0,12 – 0,29 61, 88, 90	2,24 – 2,70 90	37 – 52 61, 89	0,4 – 1,3 61	Glucose ^{61, 88, 89} ; Tolbutamide ^{214, 88,} ²¹⁴ ; K⁺ ^{61, 88} ; Ca²⁺-cagé ⁹⁰

Tableau B-2 : Comparaison des paramètres des pics ampérométriques obtenus lors de la sécrétion de mastocytes, cellules chromaffines, PC12 et cellules β pancréatiques.

Il n'en reste pas moins que tous ces modèles cellulaires peuvent présenter une fréquence de sécrétion modérée (environ 1 Hz et moins) de molécules électroactives alors détectables par ampérométrie. Les éventuelles superpositions de pics dues à la fréquence de sécrétion non négligeable, peuvent être minimisées, ceci présentant un important avantage pour la détection électrochimique d'événements isolés. Du point de vue de l'électrochimie, il n'y a pas de raison de préférer particulièrement un type cellulaire parmi les cellules chromaffines, PC12, mastocytes ou β pancréatiques. Le choix du modèle cellulaire sera donc plutôt lié à la culture cellulaire, aux habitudes des laboratoires et dans le cadre de notre travail, aux exigences techniques cumulées de la microscopie TIRF et de l'ampérométrie.

En effet, le marquage des vésicules de sécrétion par des sondes fluorescences de type GFP est tout à fait envisageable pour des cellules chromaffines, PC12 ou β pancréatiques mais nécessite des protocoles de transfection dont les rendements peuvent être faibles. Les cellules chromaffines, qui sont des cultures primaires, impliquent des problèmes d'obtention (abattoirs). Les PC12, quant à elles, possèdent des vésicules plus petites que la moyenne et donc un rapport signal sur bruit moins favorable en microscopie TIRF.

Compte tenu de ces contraintes expérimentales, et également de la résolution temporelle limitée de la caméra utilisée sur notre montage expérimental de microscopie TIRF (100 ms, des fréquences trop intenses empêcheraient la différenciation des différents événements), nous avons opté pour un modèle moins connu, les **cellules BON** dont les vésicules contiennent de la sérotonine (5-HT). On notera que ce contenu est faible, environ trois ordres de grandeur plus petit que pour les cellules chromaffines pour les catécholamines.²¹⁹ Elles présentent cependant l'avantage d'être facilement cultivées. Leur transfection est relativement plus aisée et elles peuvent donner lieu à des lignées transfectées stables. Une étude en microscopie électronique a permis de mettre en évidence la présence de granules à cœur dense²²⁰ constitués d'une matrice de chromogranine A. Cette lignée, dérivée d'un carcinome du pancréas, est constituée de différents types cellulaires, comme les N13 ou les BC21.

Afin de choisir le meilleur modèle cellulaire pour nos conditions expérimentales, une analyse fine des paramètres de pics ampérométriques des N13 et des BC21 a été effectuée sur UME de carbone.

III.II. Etude ampérométrique des cellules BON

Nous nous sommes intéressés à deux clones de cellules BON (N13 et BC21) particulièrement adaptés à l'analyse de l'exocytose en microscopie TIRF.²²¹⁻²²⁴ Ces deux lignées sont des clones de la lignée originelle. L'une, celle des BC21, exprime constitutivement la sonde fluorescence eGFP tandis que l'autre, celle des N13, nécessite une construction plasmidique et une transfection pour induire l'expression de NPY-eGFP. Cependant, l'analyse de leur sécrétion par ampérométrie n'a jamais fait l'objet d'étude approfondie.²¹⁹ Nous avons donc choisi d'effectuer dans un premier temps une analyse « classique » sur UME de carbone (polarisé à + 650 mV vs Ag/AgCl). Le choix du sécrétagogue s'est porté sur l'ionomycine (5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) en présence de Ca^{2+} ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), en particulier pour sa bonne reproductibilité par comparaison au Ba^{2+} , ou son caractère plus physiologique par rapport à la digitonine.

III.II.1. N13 et BC21 sans modification (ni transfection ni chargement)

Une analyse de la réponse ampérométrique des cellules BON N13 et BC21 a été effectuée sans modifications préalables, c'est-à-dire sans chargement passif en sérotonine ou transfection avec un transporteur.

Dans le cas des cellules BC21, aucune réponse n'a pu être obtenue (30 cellules testées) avec l'ionomycine comme sécrétagogue. Le baryum a également été utilisé en vain. Le cas des cellules N13 est, quant à lui, un peu particulier. Des réponses ampérométriques ont été obtenues avec les caractéristiques suivantes (6 cellules testées et 140 pics obtenus) :

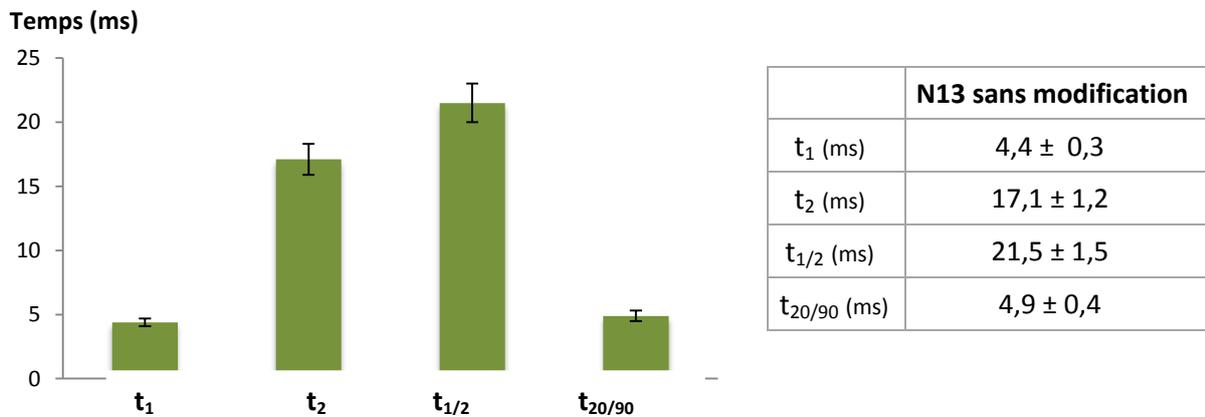


Figure B-54 : Cinétique des événements d'exocytose des N13 non modifiées.

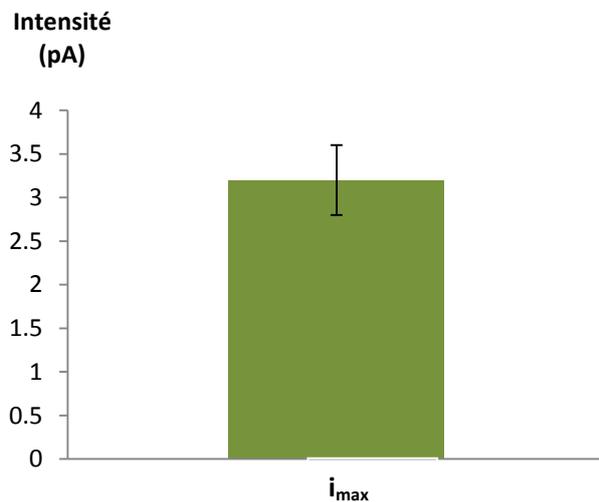


Figure B-55 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 non modifiées.

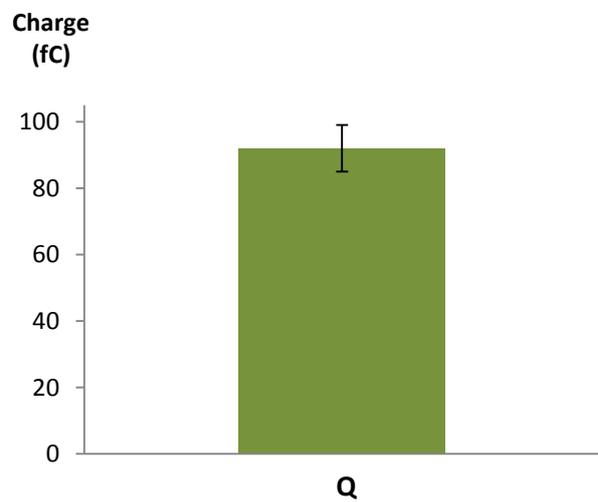


Figure B-56 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 non modifiées.

Ces données sont à prendre avec précaution. En effet, elles correspondent à un traitement statistique effectué pour les cellules ayant exprimé une activité de sécrétion après stimulation.

En réalité, la réponse est extrêmement aléatoire et seulement une cellule stimulée sur dix, dans le meilleur des cas, donne lieu à une réponse exocytotique. Les N13, en l'état, ne constituent donc pas un modèle fiable pour une étude couplée ampérométrie/microscopie TIRF de l'exocytose.

Ces premiers résultats montrent donc qu'il est nécessaire, comme attendu, d'augmenter la quantité de sérotonine intravésiculaire afin de rendre la détection électrochimique possible et reproductible. Dès lors, différents protocoles ont été envisagés afin d'augmenter la quantité de sérotonine intravésiculaire.

III.II.2. N13 et BC21 non transfectées

Dans un second temps, nous avons comparé la sécrétion des N13 et des BC21, incubées pendant 24 heures dans un milieu de culture supplémenté en sérotonine ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

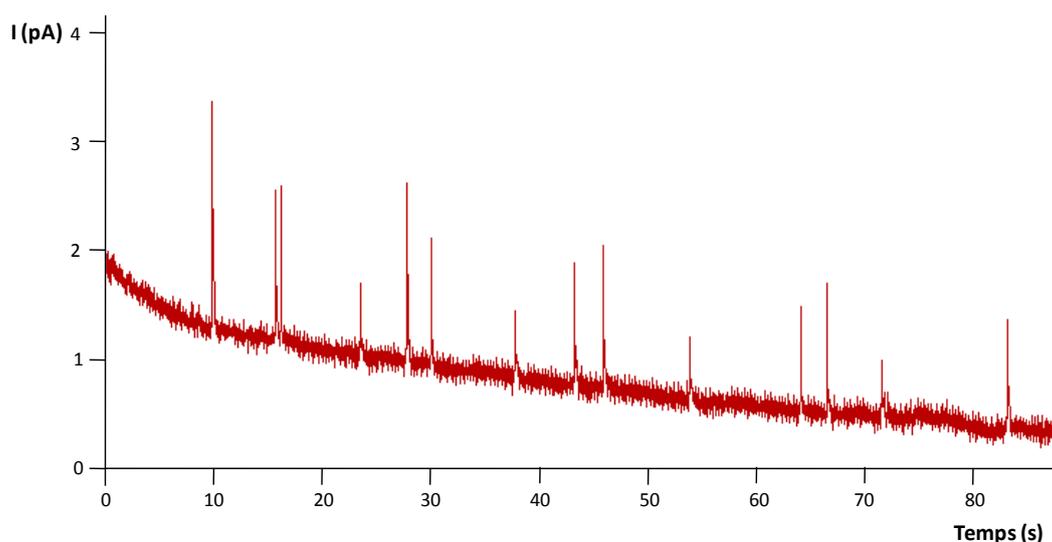


Figure B-57 : Extrait d'un suivi ampérométrique de la sécrétion d'une cellule BON N13 ; incubation 24h avec $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sérotonine ; stimulation ionomycine ($C = 5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) pendant les 30 premières secondes ; électrode polarisée à + 650 mV vs Ag/AgCl.

a) Etude du nombre d'évènements d'exocytose

L'analyse statistique provient ici de la sécrétion de 175 cellules N13 (obtention de plus de 2050 pics ampérométriques) et de seulement 8 cellules BON BC21 (qui n'ont fourni qu'une centaine de pics ampérométriques). Cet écart important est dû au fait que, même si une grande majorité des BC21 sécrète, l'intensité des pics ampérométriques est souvent trop faible pour être

analysée, les pics étant alors confondus avec le bruit de fond. Même si la fréquence moyenne d'exocytose est d'environ **3,2 pics.min⁻¹** ($5,3 \cdot 10^{-2}$ Hz) pour ces deux modèles cellulaires, expérimentalement les BC21 non transfectées nécessitent de tester énormément de cellules avant d'observer une sécrétion et obtenir un traitement statistique significatif (au moins une centaine de pics).

b) Etude des paramètres de pic

Comme précédemment, l'analyse détaillée des paramètres des pics d'exocytose a été réalisée.

- Etude de la cinétique des événements d'exocytose :

La moyenne des différents temps caractéristiques des pics d'exocytose des cellules BON N13 et BC21 est représentée figure B-58 :

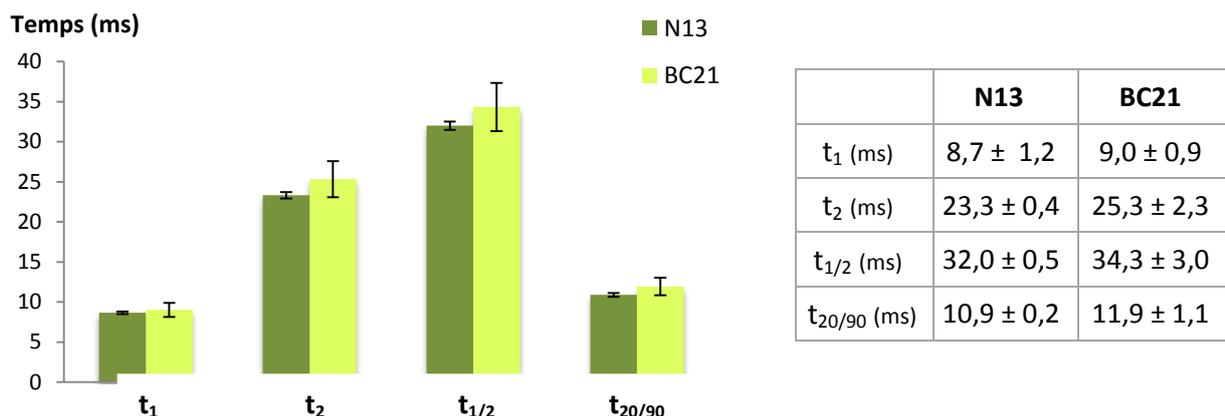


Figure B-58 : Cinétique des événements d'exocytose des BC21 et N13.

Les temps moyens correspondants à l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 sont statistiquement du même ordre de grandeur. La cinétique des événements est donc la même lors de l'exocytose pour ces deux modèles cellulaires.

- Etude du flux maximal et de la quantité de molécules libérées lors de l'exocytose :

La figure B-59 représente le courant maximum moyen et la figure B-60 représente la charge moyenne des pics ampérométriques obtenus lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 chargées ($C_{\text{sérotonine}} = 500 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

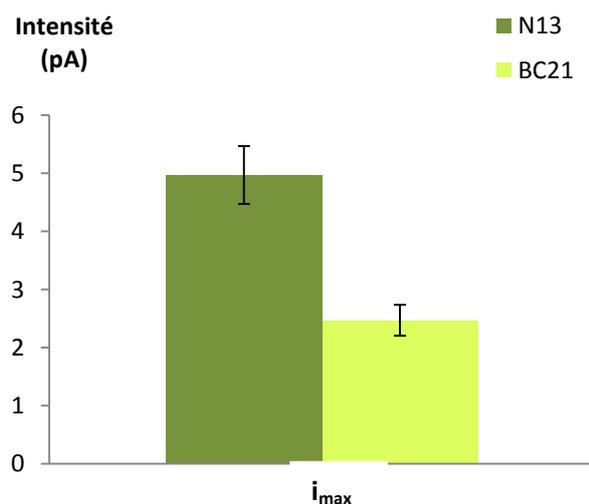


Figure B-59 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21.

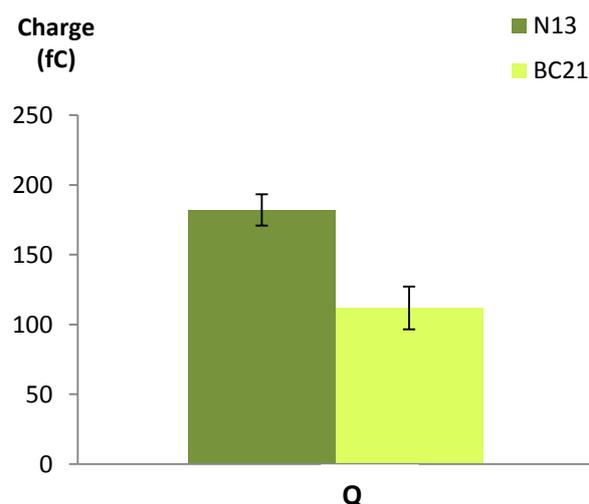


Figure B-60 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21.

L'intensité maximale moyenne et la charge moyenne des pics d'exocytose des cellules BON BC21 sont statistiquement beaucoup plus faibles que pour les N13. L'intensité atteinte par les pics obtenus avec les N13 est de **4,9 ± 0,5 pA** alors que celle des pics obtenus avec les BC21 est de **2,5 ± 0,3 pA**. De même la charge libérée par les N13 est de **182 ± 11 fC** alors qu'elle est juste supérieure à 100 fC (**112 ± 15 fC**) pour les BC21. Ces deux paramètres, assez faibles, laissent supposer qu'une grande proportion des pics d'exocytose des BC21 est peut-être confondue avec le bruit électrique. L'analyse d'une trace type pour les BC21 met, en effet, en évidence la présence de pics de très faible intensité (0,1 pA ou moins) que l'on pourrait attribuer à des événements provenant de vésicules contenant une quantité de sérotonine à la limite du seuil de détection. Ceci expliquerait la différence de capacité de sécrétion observée expérimentalement malgré une assez grande similarité des valeurs temporelles (Figure B-58). Dans les deux cas, on remarquera que la fréquence et les caractéristiques des pics sont largement plus faibles que ce qui est observé, par exemple, pour les cellules chromaffines, en accord avec une concentration intravésiculaire moindre pour les cellules BON.

Pour ces deux modèles cellulaires et pour le protocole de chargement par incubation utilisé, la fréquence des pics ampérométriques ainsi que la quantité et le flux maximal de molécules libérées sont relativement faibles, mais acceptables. Par ailleurs, la faible fréquence de sécrétion est idéale pour le couplage TIRFM/ampérométrie. Les intensités des pics obtenus restent correctes pour la lignée N13, mais excluent à ce stade de l'étude, la lignée BC21. Nous avons donc envisagé d'augmenter l'accumulation de sérotonine au sein des vésicules en transfectant les cellules soit avec VMAT1, un transporteur de monoamine (Vesicular Monoamine Transporter

isoform 1) (**N13/VMAT1** et **BC21/VMAT1**), avant le chargement avec de la sérotonine, soit en électroporant les cellules en présence de sérotonine (**N13/5-HT** et **BC21/5-HT**).

III.II.3. N13 et BC21 transfectées VMAT1 (N13/VMAT1 ; BC21/VMAT1)

Suite à l'étude précédente, il semblerait que les cellules N13 soient meilleures candidates pour étudier l'exocytose des cellules BON par le couplage ampérométrique et optique. Cependant, la transfection de ces cellules avec un transporteur de monoamines facilitant ainsi le chargement en sérotonine pourrait inverser cette tendance. Une autre étude ampérométrique a donc été réalisée sur les N13 et les BC21 transfectées avec VMAT1 (cf. *Partie D : Partie expérimentale ; p.227*), notées respectivement N13/VMAT1 et BC21/VMAT1.

a) Etude du nombre d'évènements d'exocytose

L'analyse statistique des N13/VMAT1 a été réalisée sur 134 cellules et a permis d'obtenir plus de 3370 pics. Comme précédemment, même transfectées, les BC21 répondent moins systématiquement que les N13. L'analyse des BC21/VMAT1 a donc seulement été réalisée sur la base des réponses de 11 cellules, ce qui a permis d'obtenir environ 250 pics. D'après ces données, les fréquences moyennes de sécrétion pour ces deux types de cellules transfectées avec VMAT1 ont été déterminées. La sécrétion de ces deux types de cellules est plus fréquente que la sécrétion de ces cellules non transfectées et, la fréquence de sécrétion des BC21/VMAT1 est légèrement plus faible (**4,4 pics.min⁻¹** soit $7,3 \cdot 10^{-2}$ Hz) que celle des N13/VMAT1 (**5,2 pics.min⁻¹** soit $8,6 \cdot 10^{-2}$ Hz).

Cet ordre de grandeur de fréquence est toujours acceptable pour le couplage envisagé, mais il faut encore tenir compte du fait que malgré la transfection des cellules avec VMAT1, expérimentalement, le nombre de cellules répondant à la stimulation est bien inférieur pour les BC21 que pour les N13 et qu'alors, travailler avec des cellules BC21 nécessite de tester un plus grand nombre de cellules.

b) Etude des paramètres de pic

- Etude de la cinétique des évènements d'exocytose :

La moyenne des différents temps caractéristiques des pics d'exocytose des cellules BON N13 et BC21 transfectées avec VMAT1 est représentée figure B-61 :

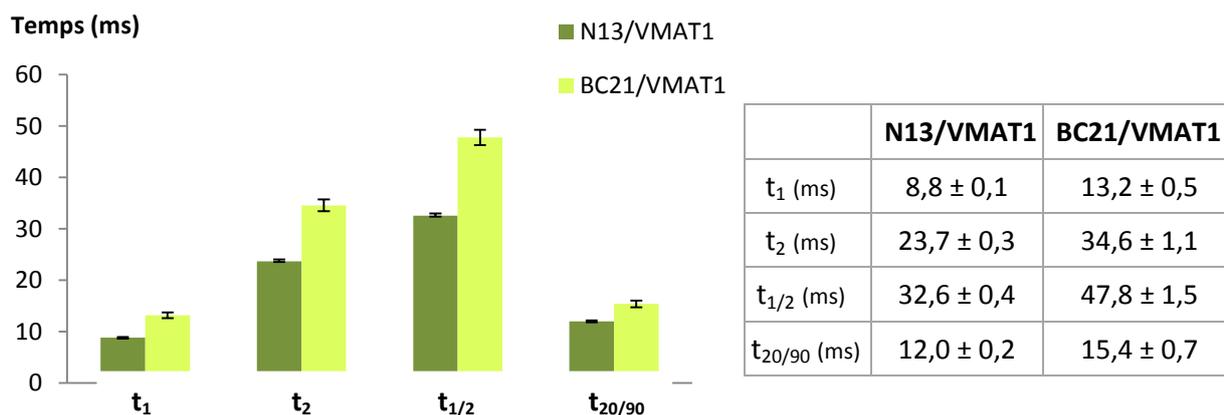


Figure B-61 : Cinétique des événements d'exocytose des cellules BON BC21 et N13 transfectées avec VMAT1.

On remarque une augmentation des différents temps caractéristiques de la cinétique des événements lors de l'exocytose des cellules BON BC21/VMAT1 par rapport à la cinétique de ces cellules non transfectées alors que les cinétiques des N13 transfectées ou non avec VMAT1 sont du même ordre de grandeur. La libération des molécules électroactives est donc plus lente par les BC21/VMAT1 que par les N13/VMAT1.

- Etude du flux maximal et de la quantité de molécules libérées lors de l'exocytose :

La figure B-62 représente le courant maximum moyen et la figure B-63 représente la charge moyenne des pics obtenus lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 transfectées avec VMAT1.

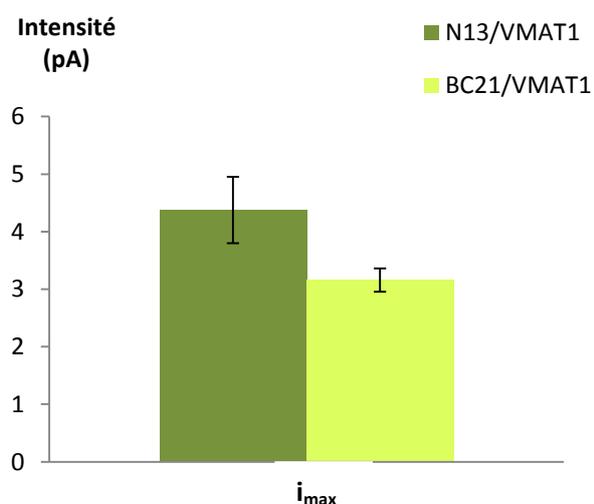


Figure B-62 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 transfectées avec VMAT1.

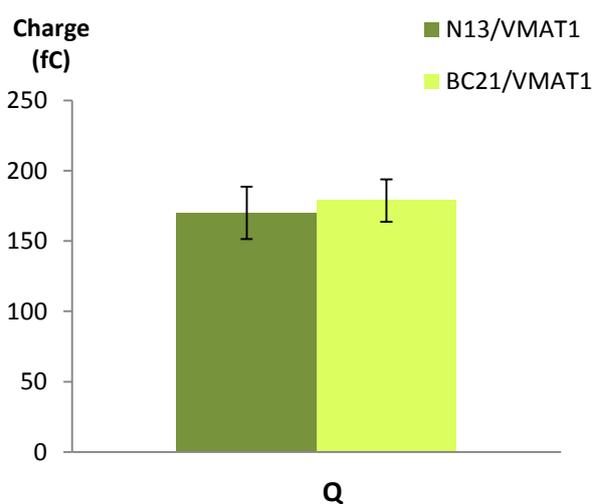


Figure B-63 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 transfectées avec VMAT1.

L'intensité moyenne des pics d'exocytose obtenus avec les cellules BON BC21/VMAT1 ($3,2 \pm 0,2$ pA) est encore plus faible que celle obtenue avec les N13/VMAT1 ($4,4 \pm 0,6$ pA) alors que la charge libérée par ces deux types de cellules est statistiquement la même (178 ± 15 fC et 170 ± 18 fC pour les BC21/VMAT1 et les N13/VMAT1 respectivement). L'intensité et la charge des pics obtenus avec les N13/VMAT1 sont du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues avec les N13 non transfectées. Contrairement aux N13 qui ne présentent pas de différence de charge ou d'intensité que les cellules soit transfectées ou non avec VMAT1, les BC21/VMAT1 voient leur charge et leur intensité augmenter par rapport au BC21 non transfectées. De ce point de vue, le protocole expérimental testé ici constitue une amélioration notable de la détection par ampérométrie de l'exocytose des cellules BON BC21.

Il semblerait alors que la transfection des cellules avec VMAT1 n'affecte pas ou très peu les N13 alors qu'elle influe d'avantage sur le mécanisme d'exocytose des BC21. La réponse des BC21 reste toutefois expérimentalement trop aléatoire pour envisager une étude de l'exocytose par le couplage de l'ampérométrie et de la microscopie.

III.II.4. N13 et BC21 électroporées en présence de sérotonine (N13/5-HT; BC21/5-HT)

Un dernier type de protocole expérimental a encore été envisagé. Il ne s'agit alors plus de transfecter les cellules avec un transporteur de monoamine avant un éventuel chargement à la sérotonine, mais d'insérer directement de la sérotonine ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$) au sein des cellules pendant leur électroporation (cf. *Partie D : Partie expérimentale ; p.227*). Les cellules N13 et BC21 électroporées en présence de sérotonine sont notées respectivement N13/5-HT et BC21/5-HT.

a) Etude du nombre d'évènements d'exocytose

L'analyse statistique des N13/5-HT a été réalisée sur 24 cellules et a permis d'obtenir environ 270 pics. L'analyse des BC21/5-HT a également été réalisée sur 24 cellules et a permis d'obtenir environ 330 pics. D'après ces données, les fréquences moyennes de sécrétion pour ces deux types de cellules électroporées en présence de sérotonine ont été calculées. On remarque que les fréquences de sécrétion des BC21 et des N13 électroporées en présence de sérotonine sont du même ordre de grandeur ($4,4 \text{ pics.min}^{-1}$ soit $7,3 \cdot 10^{-2}$ Hz pour les BC21/5-HT et $4,0 \text{ pics.min}^{-1}$ soit $6,6 \cdot 10^{-2}$ Hz pour les N13/5-HT).

Lors de cette dernière étude, on a pu remarquer que la réponse ampérométrique des BC21/5-HT est nettement meilleure et plus reproductible que la réponse de ces mêmes cellules non

transfectées ou transfectées avec VMAT1. Pour un même nombre de cellules testées, le taux de réponse des N13/5-HT et des BC21/5-HT est environ le même (environ 1 cellule sur 4).

b) Etude des paramètres de pics

- Etude de la cinétique des évènements d'exocytose :

La moyenne des différents temps caractéristiques des pics d'exocytose des deux cellules types de cellules BON N13 et BC21 électroporées avec de la sérotonine est représentée figure B-64 :

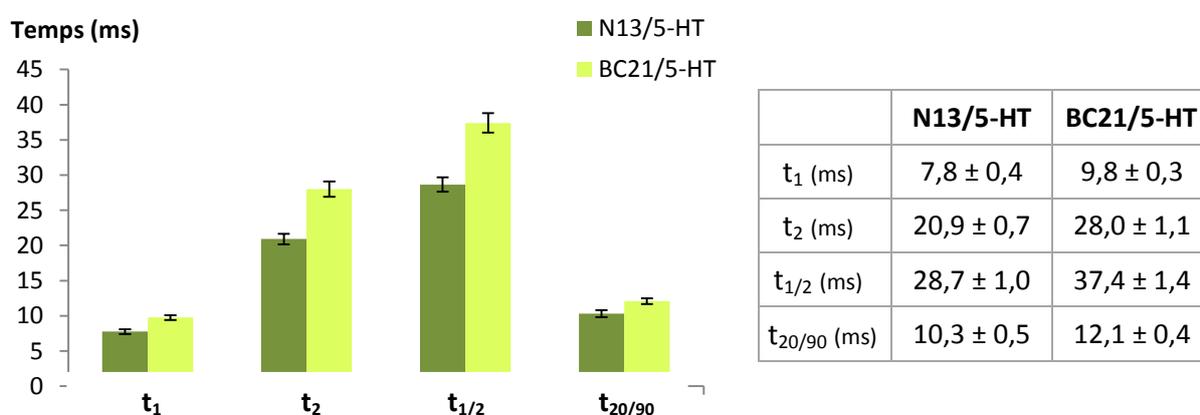


Figure B-64 : Cinétique des évènements d'exocytose des cellules BON BC21 et N13 transfectées avec de la sérotonine.

On remarque une légère augmentation des différents temps caractéristiques de la cinétique des évènements lors de l'exocytose des cellules BON BC21/5-HT par rapport à la cinétique de ces cellules non transfectées alors que la cinétique des N13 électroporées ou non avec de la sérotonine est du même ordre de grandeur. La libération des molécules électroactives par les BC21/5-HT est donc à peine plus lente que celle des N13/5-HT.

- Etude du flux maximal et de la quantité de molécules libérées lors de l'exocytose :

La figure B-65 représente le courant maximum moyen et la figure B-66 représente la charge moyenne des pics obtenus lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 électroporées avec de la sérotonine 5-HT.

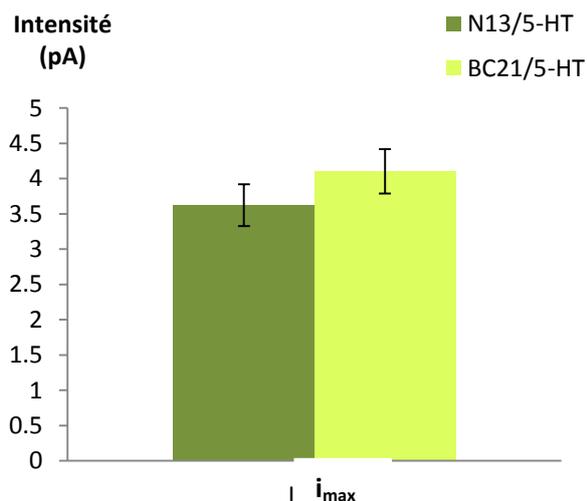


Figure B-65 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 électroporées avec de la sérotonine.

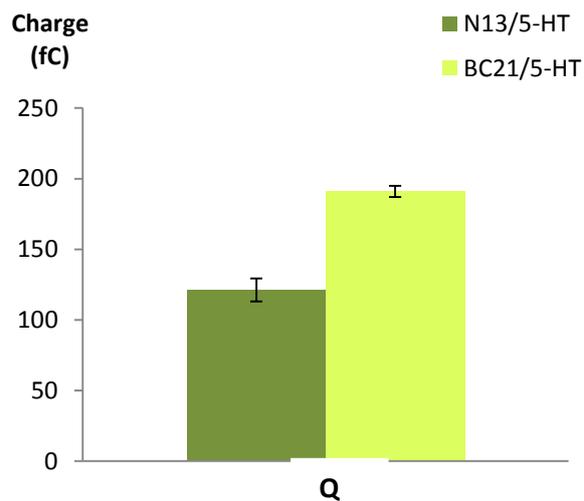


Figure B-66 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON N13 et BC21 électroporées avec de la sérotonine.

L'intensité moyenne des pics d'exocytose obtenus avec les cellules BON BC21 et N13 transfectées avec de la sérotonine est statistiquement la même (environ $4,1 \pm 0,3$ pA et $3,6 \pm 0,3$ pA pour les BC21/5-HT et le N13/5-HT respectivement), alors que la charge libérée par les BC21/5-HT est significativement supérieure (191 ± 4 fC) à la charge libérée par les N13/5-HT (environ 121 ± 8 fC), ce qui reflète l'augmentation des temps caractéristiques (Figure B-64).

Si nous comparons avec les études réalisées sur les N13 non transfectées mais chargées en sérotonine ou les N13/VMAT1, l'électroporation des cellules N13 avec de la sérotonine, n'a permis d'augmenter ni la quantité de molécules libérées au cours des événements d'exocytose ni l'intensité des pics ampérométriques correspondants. Au contraire, l'intensité des pics ampérométriques correspondant à l'exocytose des BC21/5-HT est plus élevée que celle correspondant à l'exocytose des BC21 non transfectées ou des BC21/VMAT1 ($I_{max} = 2,3$ pA pour les BC21 non transfectées, $I_{max} = 3,2$ pA pour les BC21/VMAT1 et $I_{max} = 4,1$ pA pour les BC21/5HT). De même, on remarque une nette augmentation de la charge libérée par les BC21/5-HT ($Q = 110$ fC pour les BC21 non transfectées, $Q = 180$ fC pour les BC21/VMAT1 et $Q = 190$ fC pour les BC21/5HT).

Enfin, si la fréquence de sécrétion des N13 et des BC21 électroporées avec de la sérotonine est légèrement plus faible que celle de leurs équivalents transfectés avec VMAT1, elle reste néanmoins du même ordre de grandeur, et est donc suffisante sans être trop élevée pour permettre d'envisager un couplage des détections électrochimiques et optiques. **L'électroporation des cellules BON BC21 en présence de sérotonine rend donc ce modèle cellulaire adapté au couplage envisagé.** De manière plus globale, nous avons pu mettre en place

des protocoles permettant d'obtenir une détection électrochimique correcte et reproductible de l'exocytose pour les deux lignées N13 et BC21.

Au bilan, on notera que quelque soit le clone de cellule BON considéré, ses granules de sécrétion contiennent de la sérotonine.²¹⁹ Cependant, malgré un système de chargement intracellulaire de la sérotonine synthétisée dans le cytoplasme,²²⁰ leur contenu granulaire (environ $0,006 \text{ mol.L}^{-1}$ de sérotonine) reste faible et, pour l'analyse ampérométrique de leur sécrétion, il peut être préférable d'augmenter ce chargement. Il est alors possible soit d'incuber simplement pendant 24 à 48 heures les cellules dans un milieu de culture supplémenté en sérotonine ($0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) soit, pour forcer davantage l'accumulation de sérotonine au sein des vésicules, d'électroporer les cellules avec un transporteur de monoamine ou directement en présence de sérotonine. L'électroporation a un résultat efficace. Elle permet d'augmenter significativement la charge des vésicules et l'intensité du signal électrochimique tout en conservant des fréquences de sécrétion adaptées au couplage de l'ampérométrie et de la microscopie de fluorescence. Il n'existe donc pas de raisons particulières, de ce point de vue, de préférer l'une ou l'autre. Le choix définitif du modèle cellulaire utilisé sera donc basé sur les contraintes expérimentales de la microscopie TIRF.

D'une part, les BC21 présentent des prolongements avec une grande concentration de vésicules alors que les N13 sont plus rondes. Ceci rend donc les BC21 moins facilement différenciables en microscopie. D'autre part, contrairement aux BC21, les N13 ne contiennent pas naturellement de protéines fluorescentes. Il est donc nécessaire de les transfecter avec une sonde fluorescente avant leur observation. Cependant, un rendement de transfection, de l'ordre de 30 % diminuerait la possibilité d'observation en microscopie TIRF. Il a donc fallu trouver un compromis entre une meilleure observation et un rendement de transfection relativement faible pour les N13 d'une part, et une observation moins aisée mais des vésicules déjà fluorescentes pour les BC21 d'autre part. De nombreux essais expérimentaux nous ont conduits, dans le cadre de la démonstration du couplage microscopie TIRF/ampérométrie, à choisir les **BC21/5-HT** comme modèle cellulaire. Enfin, afin de valider ce choix, nous avons étudié la sécrétion des BC21/5-HT dans les conditions du couplage, c'est-à-dire par ampérométrie au pôle basal de la cellule, sur électrode d'ITO.

III.II.5. BC21 électroporées en présence de sérotonine sur électrode d'ITO

Comme imposé par le choix fait lors de l'élaboration de nos dispositifs, le couplage de l'ampérométrie et de la microscopie de fluorescence nécessite de mettre en œuvre une détection électrochimique au pôle basal de la cellule. Nous avons donc vérifié que la réponse

ampérométrie des cellules BON BC21/5-HT détectée au pôle basal de la cellule sur électrode d'ITO était aussi bien adaptée au couplage envisagé que celle déterminée jusqu'ici au pôle apical.

a) Etude du nombre d'évènements d'exocytose

La réponse apicale des BC21/5-HT sur électrode de carbone a été comparée à leur réponse basale détectée sur électrode d'ITO. 24 et 20 cellules BC21/5-HT ont été testées respectivement sur électrode de carbone et sur électrode d'ITO. Les fréquences de sécrétion sont du même ordre de grandeur quelque soit le pôle de détection (**4,4 pics.min⁻¹** soit $7,3 \cdot 10^{-2}$ Hz lors de la détection au pôle apical et **4,6 pics.min⁻¹** soit $7,6 \cdot 10^{-2}$ Hz lors de la détection au pôle basal).

b) Etude des paramètres de pic

- Etude de la cinétique des évènements d'exocytose :

La moyenne des différents temps caractéristiques de la cinétique du phénomène d'exocytose des cellules BON BC21/5-HT détecté sur électrode de carbone et d'ITO est représentée figure B-67 :

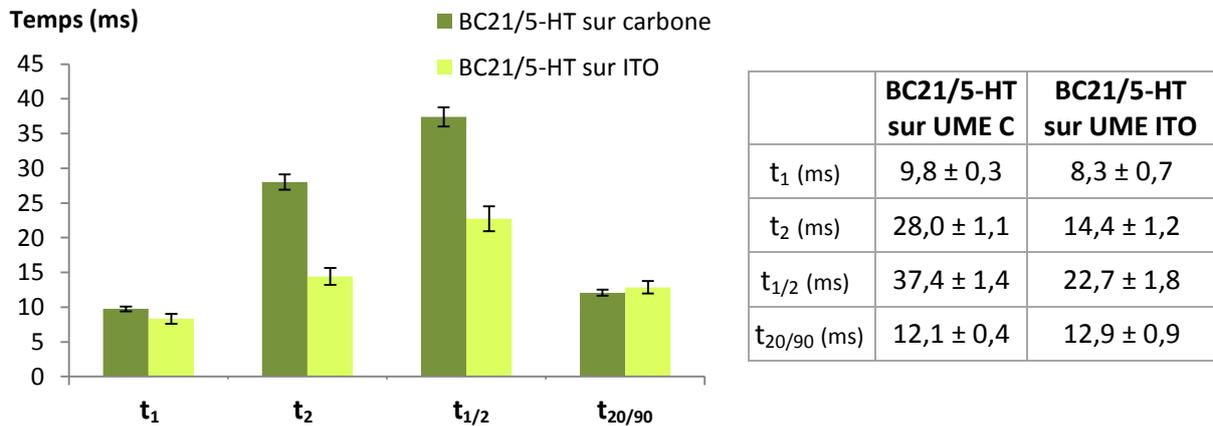


Figure B-67 : Cinétique des évènements d'exocytose des BC21/5-HT détectés sur électrodes de carbone et d'ITO.

On remarque que les temps caractéristiques t₁ et t_{20/90} sont du même ordre de grandeur pour les deux détections alors que t₂ et t_{1/2} sont statistiquement plus élevés lors de la détection au pôle apical. Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer cette différence. D'une part, on peut envisager le fait que les cellules BON soient polarisées. En d'autres termes, les populations

vésiculaires impliquées aux deux pôles (apical et basal) peuvent avoir des caractéristiques différentes. D'autre part, le pôle basal, du fait de l'adhésion de la cellule sur le support, implique que la membrane cellulaire puisse avoir des propriétés (viscosité, tension, courbure...) différentes de celles de la membrane localisée au sommet de la cellule, ce qui réduirait la fraction libérée par rapport à la capacité totale.¹³⁵ Il n'est pas possible en l'état de choisir l'une ou l'autre de ces explications. Il est par contre exclu que les différences observées entre les détections sur carbone et ITO soient dues à une distance différente membrane cellulaire/électrode dans les deux cas. Certes la distance pour une cellule adhérente et son support est de l'ordre de 100 nm^{225, 226} quand la distance cellule/UME de carbone est légèrement inférieure au micron, mais il a été montré au laboratoire que le facteur de collecte restait voisin de 100 % pour peu que la distance cellule/électrode soit de l'ordre du rayon de l'électrode.^{21, 227} On mentionnera cependant qu'un résultat similaire a déjà été recensé chez les cellules chromaffines.²¹⁷

- Etude du flux maximal et de la quantité de molécules libérées lors de l'exocytose :

Les différences observées entre sommet et base de la cellule ne sont pas limitées aux temps de montée et de descente des pics ampérométriques. Ainsi, la figure B-68 représente le courant maximum moyen et la figure B-69 représente la charge moyenne des pics obtenus lors de l'exocytose des cellules BON BC21/5-HT détectés sur électrodes de carbone et d'ITO.

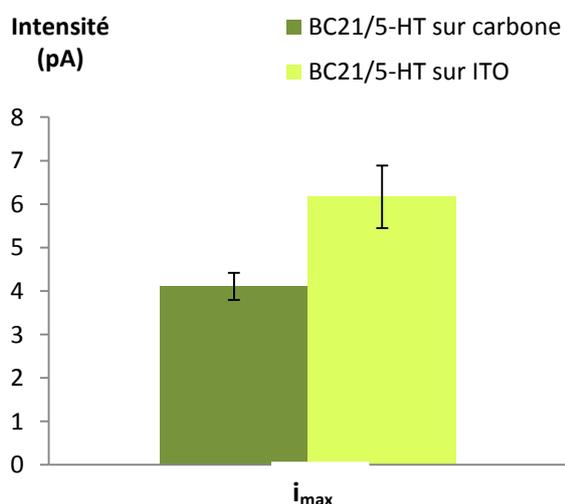


Figure B-68 : Flux de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON BC21/5-HT détectées sur électrodes de carbone et d'ITO.

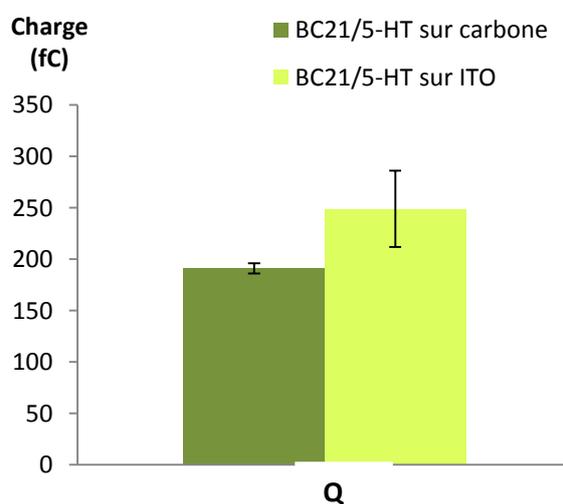


Figure B-69 : Quantité de molécules libérées lors de l'exocytose des cellules BON BC21/5-HT détectées sur électrodes de carbone et d'ITO.

L'intensité moyenne des pics d'exocytose obtenus avec les cellules BON BC21/5-HT sur électrode d'ITO (**6,2 ± 0,7 pA**) est plus élevée que celle obtenue sur électrode de carbone (**4,1 ± 0,3 pA**). De

même, la charge libérée détectée sur électrode d'ITO (249 ± 37 fC) est plus élevée que celle détectée sur électrode de carbone (191 ± 4 fC) mais restent globalement du même ordre de grandeur, ce qui montre que l'hypothèse faite ci-dessus sur les fractions libérées ne convient pas pour rendre compte des valeurs relatives des $t_{1/2}$ (Figure B-67).

Indépendamment des écarts observés entre pôles basal et apical, le couplage de la microscopie de fluorescence et de l'ampérométrie est donc tout à fait réalisable à partir des cellules BON BC21/5-HT.

III.III. Rôle du modèle cellulaire pour le couplage : problématique du pH dans la bande cellule/électrode

III.III.1. Généralités

Comme il a été précisé précédemment, les paramètres du milieu extracellulaire (composition, sécrétagogue...) et possiblement ceux liés à ou impliqués par la mesure influencent la dynamique du mécanisme. La fréquence d'exocytose est alors un paramètre important à prendre en compte car lors de la détection électrochimique, chaque molécule libérée par la cellule lors des événements exocytotiques, et oxydée à l'électrode est responsable de la libération de deux protons. Initialement à 7,4 dans le milieu extracellulaire, une modification de pH pourrait affecter la dynamique du mécanisme.^{89, 105, 111, 112} En effet, le gradient de pH entre le milieu intragranulaire (pH = 5,5) et le milieu extracellulaire joue un rôle dans la déstructuration de la matrice intragranulaire et son éventuel gonflement comme nous l'avons vu précédemment.¹¹⁵ Ainsi, et même si les résultats dépendent du modèle cellulaire et du sécrétagogue, une acidification marquée et continue du milieu extracellulaire pourrait inhiber la sécrétion des cellules.

Par ailleurs, le gradient de pH entre les milieux intragranulaire et extracellulaire est également impliqué dans la détection optique par fluorescence. En effet, la fluorescence de la sonde est dépendante du pH et, dans le cas de la eGFP, l'intensité de fluorescence est significative à pH = 5,5 et maximale aux alentours de 7, ce qui occasionne le « flash » observé lors d'un événement de sécrétion.¹⁵⁸ Connaître l'influence de la fréquence de sécrétion sur l'acidification de la bande électrode/cellule nous est donc apparu comme primordial.

Un modèle mathématique a récemment été établi au laboratoire afin d'étudier l'influence de la détection ampérométrique d'un événement d'exocytose sur le pH de la zone limitée par la membrane cellulaire et l'électrode.²²⁸

III.III.2. Modélisation du pH : le cas des cellules chromaffines

a) Principes

La problématique du pH lors de la détection ampérométrique et son biais analytique potentiel sont liés à deux points particuliers imposés par la méthode de détection. Premièrement, de par la nature des neurotransmetteurs électroactifs étudiés (généralement des catécholamines), la détection électrochimique des molécules libérées par exocytose s'effectue via l'oxydation d'un groupement catéchol (comme l'adrénaline, *Figure B-70*) et génère donc deux protons H^+ par molécule oxydée.

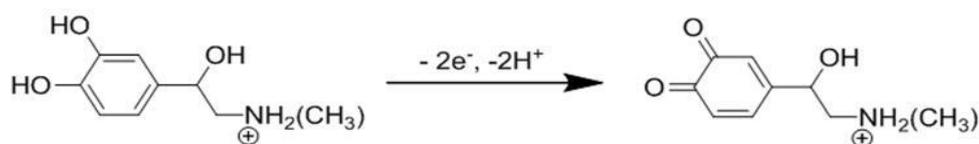


Figure B-70 : Oxydation biélectronique de l'adrénaline.

Deuxièmement, cette libération de protons ne serait pas significative si elle avait lieu dans un grand volume. Mais l'utilisation d'une UME en configuration synapse semi-artificielle entraîne le confinement des espèces entre la cellule analysée et la surface de l'électrode, alors seulement espacées d'une centaine de nanomètres. Ainsi, même si la quantité de protons électrogénérés reste faible (quelques atto- voire zeptomoles), ceux-ci sont libérés dans un faible volume (quelques fL). La concentration instantanée des protons dans la bande cellule/électrode peut donc être significative et le pH dans la bande peut donc fortement diminuer. Une telle acidification pourrait alors affecter la mesure d'un événement donné ou, à terme, la faculté de la cellule à sécréter. Par exemple, la concentration en catécholamines contenues dans une vésicule d'une cellule chromaffine de diamètre 150 nm ($V_{\text{vésicule}} = 1,41 \cdot 10^{-17} \text{ dm}^3$) est de $0,6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ soit $8,5 \cdot 10^{-18}$ mole. En considérant deux protons générés par catécholamine libérée puis oxydée, la détection d'un événement d'exocytose occasionne alors $1,7 \cdot 10^{-17}$ mole de protons. Pour une cellule de 10 μm de diamètre et une distance cellule/électrode de 100 nm ($V_{\text{bande cellule/électrode}} = 3,14 \cdot 10^{-14} \text{ dm}^3$), la concentration en protons est de $5,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ à la fin d'un événement d'exocytose moyen et le pH de la bande passe alors de 7,4 à 3,3. Bien entendu, le tampon compense cela mais son effet est freiné par les temps de diffusion dans la bande depuis son bord extérieur (*Figure B-71*).

Le modèle mathématique mis au point dans le but de quantifier le pH au sein de la bande au cours de la sécrétion est fondé sur la diffusion et la réaction des protons avec le tampon. Il permet d'affiner les calculs grossiers présentés ci-dessus. Il consiste à produire des « pulses » de

protons au sein d'un cylindre dont les parois horizontales représentent respectivement la membrane cellulaire et l'électrode, distantes d'une hauteur « h » (Figure B-70). Il ne tient pas compte des protons déjà présents dans le milieu intravésiculaire, négligeables vis-à-vis de ceux libérés par oxydation. En outre, vu la faible valeur de h, on peut considérer un système discoïde à deux dimensions par intégration sur la coordonnée verticale.

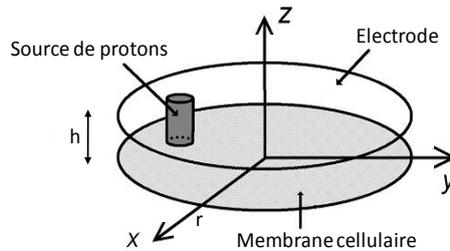


Figure B-71 : Géométrie du système considéré dans les simulations basées sur l'émission de protons.

Ce modèle prend en compte trois évolutions possibles pour les protons générés (Figure B-72) :

- une diffusion libre vers l'extérieur ($D_{H^+} = 3.10^{-5} \text{ cm}^2.s^{-1}$), liée au gradient de concentration qui se crée lors de la détection entre le lieu où se produit l'évènement détecté et le reste de la bande ;

- une réaction chimique avec le tampon présent dans le milieu physiologique de la bande (pH = 7,4) ;

une reprise partielle du proton par la matrice vésiculaire lors de son gonflement, comme dans le cas des vésicules dites « dense-core ». En effet, la déstructuration de la matrice intragranulaire lors d'un évènement d'exocytose est liée au remplacement des catécholamines par des ions monovalents (Na^+ , H^+) afin de conserver l'électroneutralité de l'ensemble. Ainsi, le nombre de protons libérés au cours de la détection peut être compris entre 1 et 2 selon la reprise ou non par la matrice d'un proton sur les deux générés par oxydation (pour chaque cation catécholamine libéré, un autre cation doit être repris par la matrice, tandis que deux protons sont créés par la détection électrochimique d'un cation catécholamine).

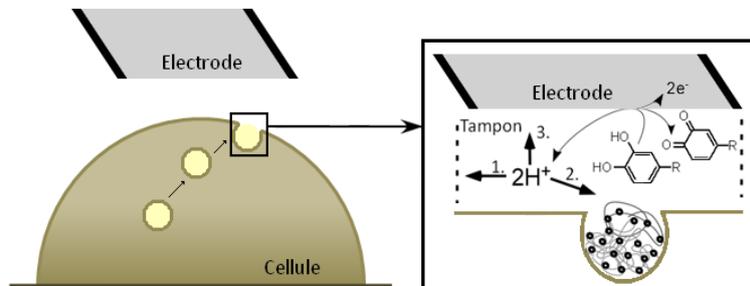


Figure B-72 : Représentation des trois évolutions possibles d'un proton généré électrochimiquement entre l'électrode et la membrane cellulaire.

Le principe de la modélisation consiste donc en l'émission spatialement aléatoire de différentes émissions « flash » de protons dans cette bande cylindrique définie par sa hauteur h et son rayon r . Les deux équilibres acido-basiques impliquant le tampon (*Equation B-5*) et l'autoprotolyse de l'eau (*Equation B-6*) sont associés dans la résolution de la seconde loi de Fick (*Equation B-7*) selon la méthode des différences finies.²²⁸ Ce programme, mis au point antérieurement dans l'équipe pour une autre étude, nous a permis, en le spécialisant à notre cas (cellules BON), d'obtenir les évolutions du pH dans la bande au cours d'une sécrétion type.



$$C_{(x,y,z)} = \frac{1}{h} \int_0^h [\text{H}^+]_{(x,y,z,t)} dz \quad \text{Equation B-7}$$

Afin d'évaluer l'impact de la fréquence de sécrétion F (en Hz) et du rayon r de l'électrode, il a été choisi de travailler à hauteur constante ($h = 100$ nm, distance moyenne membrane/support pour une cellule adhérente sur un support)²²⁵ et avec deux variables que sont la fréquence surfacique F_s (en $\text{Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$) et le rayon de l'électrode, tel que :

$$F = \pi r^2 F_s \quad \text{Equation B-8}$$

L'utilisation de la fréquence surfacique facilite les modélisations mais rend moins lisible la fréquence de sécrétion. Nous chercherons donc à convertir les fréquences surfaciques en fréquences de sécrétion sur une électrode de rayon donné pour mieux illustrer le propos.

b) Résultats principaux

Les fréquences utilisées dans la modélisation initiale ont été déduites d'études ampérométriques expérimentales de l'exocytose de cellules chromaffines avec différentes tailles d'électrode.⁹⁷ Lors des calculs, les valeurs de rayon r utilisées vont de 1 à 10 μm et les fréquences surfaciques F_s vont de 0,05 à 0,12 $\text{Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. Pour un rayon de 4 μm , ces valeurs correspondent à des fréquences d'exocytose allant de 2,5 à 6 Hz. Le rapport entre la quantité de protons libérés et la quantité de catécholamines intragranulaires (noté ρ) est fixé entre 1 et 2 selon les simulations, le pH initial dans la bande est de 7,4 et la concentration intragranulaire en catécholamines est de 0,6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. La figure B-72 représente un exemple type de courbe $\text{pH} = f(t)$ obtenue en faisant varier ces paramètres.

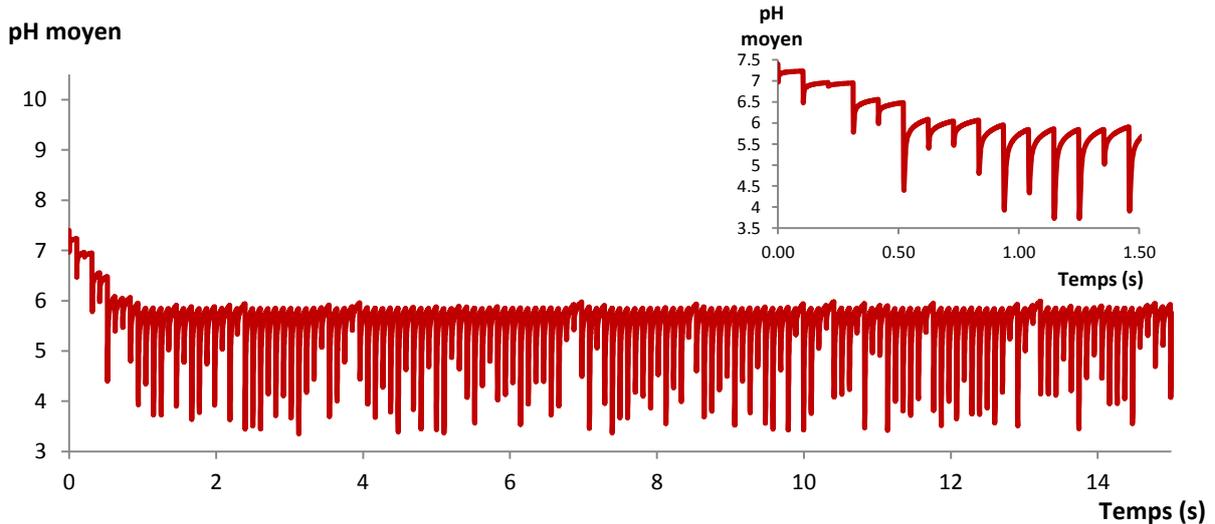


Figure B-73 : Evolution du pH moyen pendant les 15 premières secondes de sécrétion dans la bande électrode/cellule. $h = 100 \text{ nm}$; $r = 6 \text{ }\mu\text{m}$; $F_s = 0,085 \text{ Hz}\cdot\mu\text{m}^{-2}$, soit $9,6 \text{ Hz}$; $\rho = 1,5$; $C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; En haut à droite, zoom de la courbe aux temps courts.

On constate que les premiers « pulses » de pH provoqués par la succession d'événements exocytotiques ne sont qu'en partie neutralisés par le tampon. Il en résulte alors une diminution du pH. Après seulement quelques secondes, **le pH devient stationnaire dans toute la bande** (Figure B-73). Il atteint alors une valeur constante vers laquelle chaque pulse de pH relaxe. Ce phénomène s'explique d'une part par la diffusion des protons due au gradient local de concentration créé entre de la zone du pulse et le reste de la bande, et d'autre part par la neutralisation des protons par le tampon qui a principalement lieu sur le bord externe du disque de solution délimité par l'électrode et la membrane cellulaire.

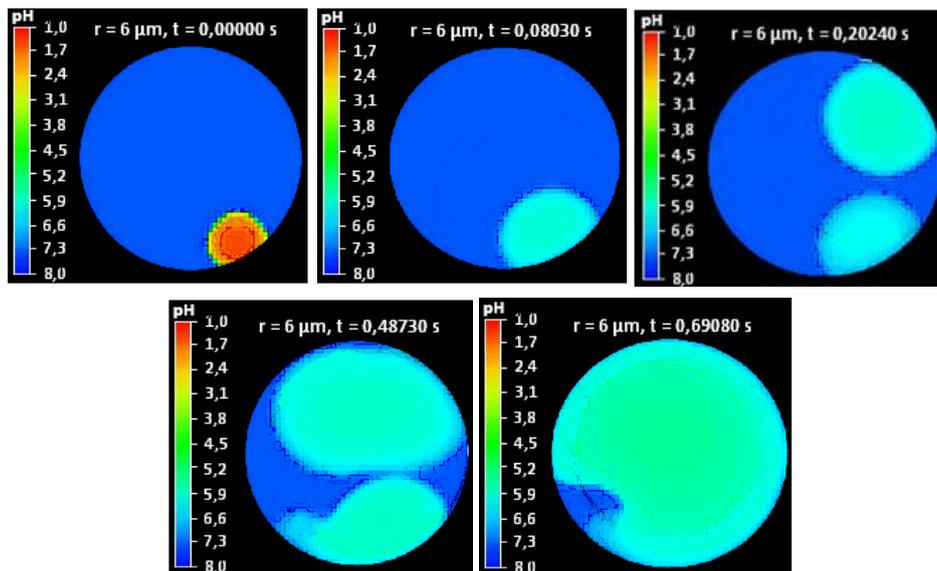


Figure B-74 : Représentation spatiale du pH aux temps courts au sein de la bande électrode/cellule. $r = 6 \text{ }\mu\text{m}$; $F_s = 0,085 \text{ Hz}\cdot\mu\text{m}^{-2}$ soit $9,6 \text{ Hz}$; $\rho = 1,5$; $h = 100 \text{ nm}$; $C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cartographies obtenues au moyen du logiciel de simulation.

Réalisées pour plusieurs rayons d'électrode, ces simulations montrent en effet que cette valeur stationnaire de pH dépend de la taille de l'électrode lorsque celle-ci délimite le rayon du disque de solution (Figure B-75). En accord avec une diffusion des protons hors de la bande plus ralentie pour les électrodes de plus grand rayon, le pH est d'autant plus faible et la bande est d'autant plus acide que la surface de l'électrode est importante. On constate que **pour des électrodes de rayon élevé, le pH peut descendre en dessous de 5 et devrait même arriver à « inverser » le gradient de concentration entre milieux intragranulaire et extracellulaire.**

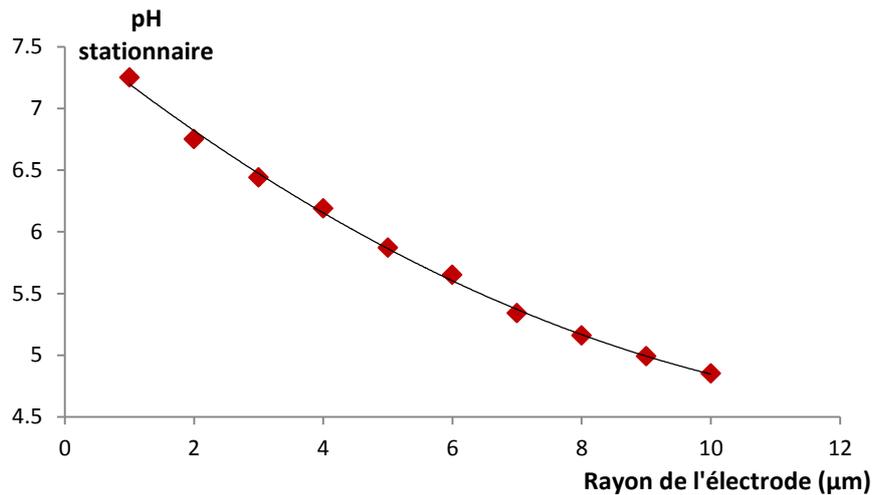


Figure B-75 : Evolution de la valeur du pH de relaxation pour différents rayons d'électrode.

$F_s = 0,085 \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ soit de 0,3 à 26,7 Hz; $h = 100 \text{ nm}$; $\rho = 1,5$; $C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

On notera par ailleurs que le **temps mis pour atteindre le pH stationnaire, appelé temps de relaxation, n'est pas corrélé au rayon de l'électrode (Figure B-76) mais dépend plus logiquement de la fréquence de sécrétion (Figures B-77 et B-78). Il est ainsi d'autant plus court que la fréquence de sécrétion, et donc de pulses de pH, est élevée.**

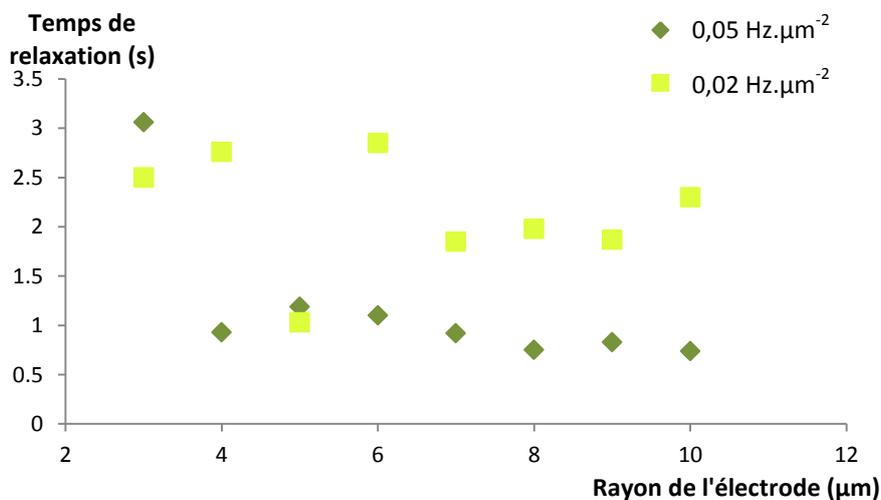


Figure B-76 : Evolution du temps mis par le système à relaxer en fonction du rayon de l'électrode.

$F_s = 0,02 \text{ et } 0,05 \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ soit 0,16 et 15,7 Hz. $\rho = 2$; $h = 100 \text{ nm}$; $C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

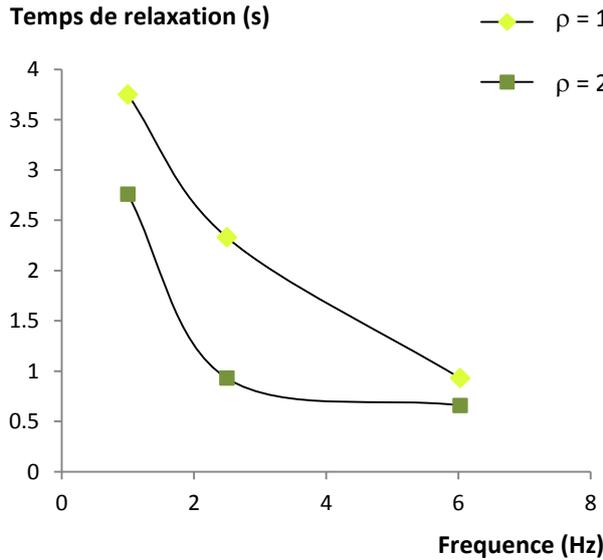


Figure B-77 : Evolution du temps mis par le système à relaxer en fonction de la fréquence de sécrétion pour $r = 4 \mu\text{m}$; $h = 100 \text{ nm}$; $C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$; $\rho = 1$ ou 2 .

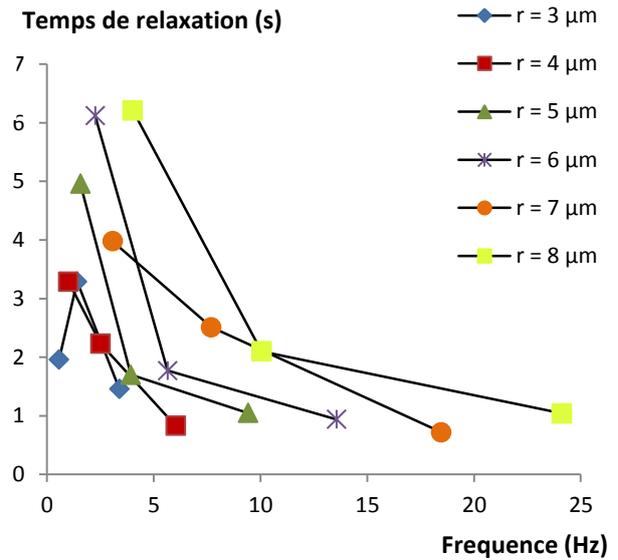


Figure B-78 : Evolution du temps mis par le système à relaxer en fonction de la fréquence de sécrétion. $r = 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7$ et $8 \mu\text{m}$; $\rho = 2$ et $C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$.

c) Commentaires

Au laboratoire, les ultramicroélectrodes de carbone sont en général fabriquées à partir d'une fibre de 7 ou 10 μm encapsulée dans une pipette de verre puis polie à un angle de 45°. L'aire de l'ellipse électroactive obtenue est alors d'environ 55 μm^2 (pour la fibre de 7 μm), ce qui correspond à un « rayon » effectif d'environ 4 μm . Une analyse de la littérature montre que selon les équipes de recherches, les protocoles de fabrication ainsi que la dimension des ultramicroélectrodes de carbone diffèrent. Il a cependant été montré au laboratoire que pourvu que le nombre d'expériences soit suffisant, la dimension de l'UME n'altère pas la nature de l'information ampérométrique.⁹⁷ En conséquence, pour un milieu tamponné initialement à un pH de 7,4, la détection électrochimique de l'exocytose par ampérométrie sur une ultramicroélectrode de carbone conventionnelle (c'est-à-dire avec un rayon pouvant aller de 3 à 5 μm , suivant le modèle cellulaire et/ou le protocole du groupe de recherche effectuant les études) semble occasionner une acidification non négligeable de la bande cellule/électrode de 1 à 1,5 unités pH.

Ce résultat représente cependant un effet exagéré de l'effet de confinement membrane cellulaire/électrode et doit être nuancé pour plusieurs raisons :

- les fréquences d'émission choisies lors des simulations ci-dessus, bien qu'expérimentales, correspondent à des valeurs très élevées, entre 4 et 10 Hz pour les électrodes habituelles de 7 μm de diamètre. Ces fréquences peuvent correspondre à la réponse de cellules chromaffines suite à leur stimulation par le sécrétagogue K^+ en présence de Ca^{2+} ($55 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). Bien que physiologique, ce sécrétagogue peut induire des fréquences de sécrétion très élevées et conduire, en pratique, à un nombre élevé de pics ampérométriques se chevauchant et qui sont alors impossibles à analyser. Il ne constitue donc pas toujours une façon de déclencher l'exocytose propice à l'étude ampérométrique en général. Dépendantes du modèle cellulaire ou du sécrétagogue (Ba^{2+} , Ca^{2+} associé à un ionophore comme l'ionomycine ou à un perméabilisant comme la digitonine), les fréquences de sécrétion peuvent être et sont la plupart du temps largement inférieures et aux alentours de 1 Hz pour des conditions de contrôle, comme nous l'avons vu précédemment (*Tableau B-2*).

- le modèle utilisé est volontairement restrictif afin de minimiser le temps de calcul. Seul le proton H^+ y est considéré comme espèce mobile, compte tenu de la valeur élevée de son coefficient de diffusion dans l'eau par rapport aux autres constituants du mélange, notamment le couple acido-basique du tampon. Ainsi, l'apport de base conjuguée en provenance du milieu extérieur qui devrait compenser sa consommation dans la bande n'est pas pris en compte. Cependant cette approximation a nécessairement des conséquences modestes vu les valeurs relatives disproportionnées entre les protons et les bases du tampon ($D_{\text{H}^+} \gg D_{\text{base}}$).

- seules les contraintes physico-chimiques ont été considérées, indépendamment de tout mécanisme de régulation biologique du pH au voisinage de la cellule. En effet, au mieux de nos connaissances, les membranes cytoplasmiques ne sont pas équipées de pompes à protons. Néanmoins, elles possèdent des pompes « à eau » qui leur permettent sans doute de diluer les protons et éventuellement de créer un flux hydrodynamique renouvelant le film de la bande. Cela serait alors accompagné d'une diminution du volume cellulaire interne.

Comme mentionné précédemment, des investigations réalisées au laboratoire ont mis en évidence que les caractéristiques ampérométriques des événements d'exocytose (durée, intensité, aire) sur cellules chromaffines ne dépendaient pas de la dimension de l'électrode.⁹⁷ Comme nous l'avons vu plus haut, les électrodes de faible dimension occasionnent théoriquement des valeurs de pH dans la bande plus élevées et plus proches de celle du tampon alors que les électrodes de rayons plus grands génèrent des pH plus acides. Ce résultat expérimental laisse donc penser que même si le pH extracellulaire au voisinage de la cellule sécrétrice est légèrement diminué, **la détection ampérométrique n'affecte pas le phénomène qu'elle prétend étudier**, ce qui laisse envisager que le déséquilibre acido-basique lié à la détection ampérométrique est compensé par un mécanisme biologique de type de ceux imaginés plus haut ou même d'autres, restant à découvrir.

d) Simulations complémentaires : mise au point d'un canevas

Si le fait qu'une éventuelle acidification de la bande cellule/électrode, même en l'absence de tout mécanisme de compensation, ne biaise pas les données de l'analyse ampérométrique est rassurant, il nous faut néanmoins tenir compte du fait que la visualisation des événements d'exocytose par fluorescence pourrait être altérée dans ces conditions. Dans le but d'avoir une vision d'ensemble sur l'impact de ces phénomènes et pour des fréquences reflétant la plupart des modèles cellulaires, nous avons cherché à étendre notre modèle à des fréquences de sécrétion plus faibles ($2 \cdot 10^{-4}$; 0,002 et 0,02 $\text{Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ en termes de fréquence par unité de surface, soit donc 0,011 ; 0,11 et 1,1 Hz pour une UME de 4 μm de rayon) par comparaison avec celles utilisées dans les simulations précédentes. Comme attendu, la **diminution du pH dans la bande pour de telles fréquences de sécrétion est moindre** (Figure B-79).

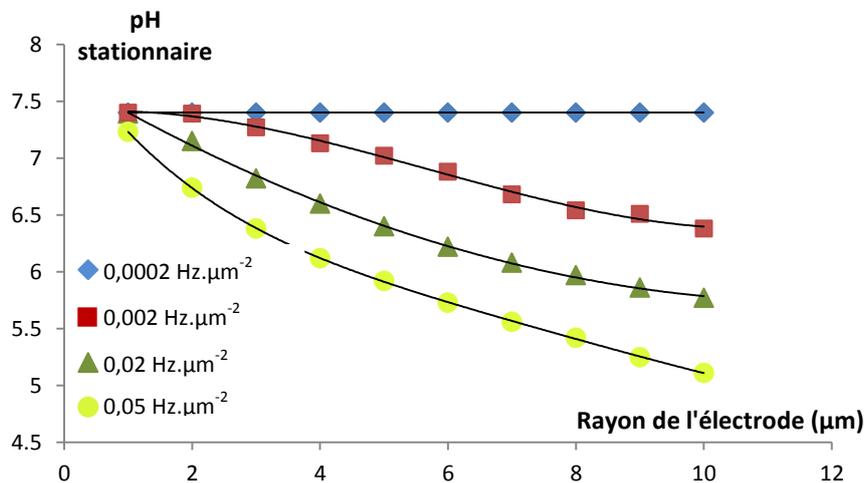


Figure B-79 : Evolution de la valeur du pH de relaxation pour différents rayons d'électrode ; $F_s = 0,0002$; $0,002$; $0,02$ et $0,05 \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$; $h = 100 \text{ nm}$; $\rho = 2$; $C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Les données résultant de ces différentes simulations ont permis d'établir la variation du pH stationnaire dans la bande cellule/électrode en fonction de la fréquence de sécrétion ($F = \pi r^2 F_s$).

Par ailleurs, la valeur du pH de relaxation dépend de la dimension de l'électrode **et** de la fréquence surfacique choisie. De ce fait, un système avec un $r = 2 \mu\text{m}$ et $F_s = 0,01 \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ n'est pas équivalent à un système avec $r = 1 \mu\text{m}$ et $F_s = 0,04 \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. C'est pourquoi nous avons volontairement restreint les gammes de rayon d'électrode (de 3 à 5 μm). On obtient alors la courbe suivante (Figure B-80), permettant de corrélérer et de prévoir le pH atteint dans la bande en fonction de la fréquence des événements pour des rayons d'électrode allant de 3 à 5 μm , c'est-à-dire recouvrant la totalité de la surface cellulaire.

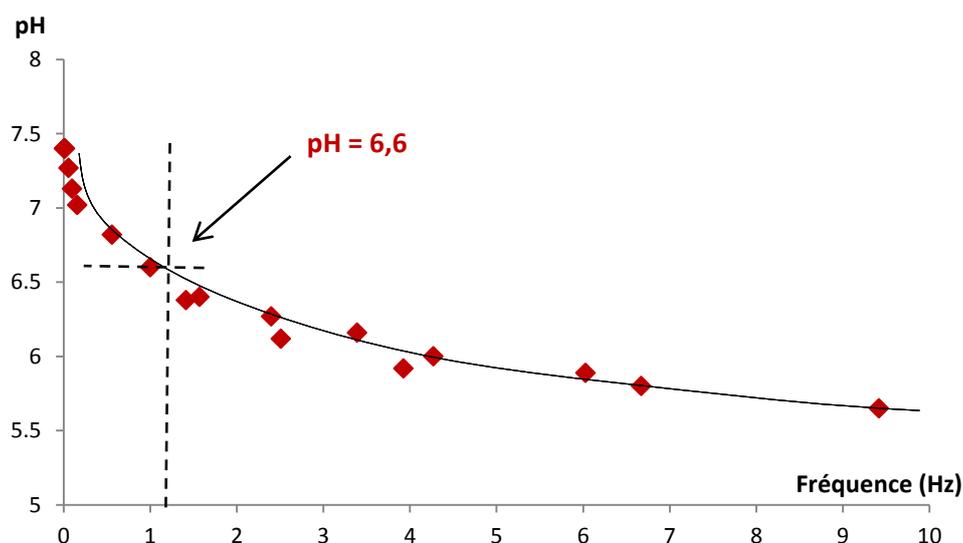


Figure B-80 : Relation entre fréquence de sécrétion et pH stationnaire dans la bande cellule/électrode.

$$h = 100 \text{ nm} ; \rho = 2 ; C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol.L}^{-1} ; 3 < r < 5 \text{ }\mu\text{m}.$$

On constate que pour les gammes habituelles de fréquence d'exocytose (aux alentours de 1 Hz et moins), **les valeurs de pH dans la bande membrane cellulaire/électrode sont légèrement inférieur à 7** (diminution de 0,8 unités pH par rapport au pH du tampon pour deux protons libérés par catécholamine détectée et de 0,7 unités pH pour un proton libéré globalement par catécholamine détectés, résultats non présentés), **mais ces valeurs restent cependant supérieures au pH intravésiculaire.**

III.III.3. Modélisation du pH : le cas des cellules BON

D'après la courbe représentant le pH stationnaire atteint dans la bande membrane cellulaire/électrode en fonction de la fréquence d'émission de protons (*Figure B-80*), on remarque que pour les fréquences caractéristiques de sécrétion des cellules BON (de 0,05 à 0,2 Hz), l'influence de la détection électrochimique sur le pH de la bande semble négligeable, le pH de relaxation étant de 7,15. Le couplage est alors parfaitement envisageable avec ce modèle cellulaire. D'autre part, les valeurs de pH obtenues sont encore sous-estimées. En effet, la concentration intravésiculaire en sérotonine des cellules BON est 1000 fois inférieure à la concentration en catécholamines des cellules chromaffines.¹⁹ Nous avons donc réalisé de nouvelles simulations avec des paramètres similaires à celles effectuées précédemment mais avec une concentration intravésiculaire égale à $6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

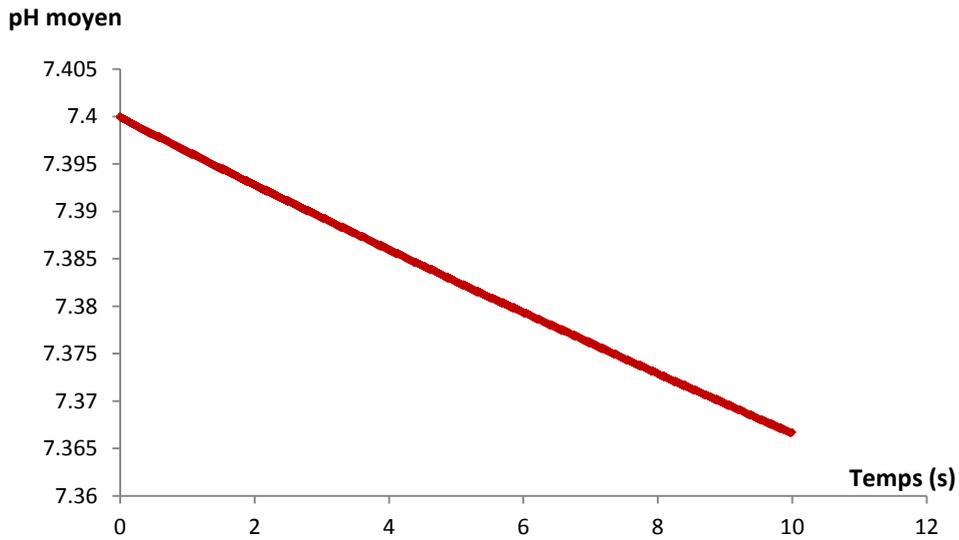


Figure B-81: Evolution du pH moyen pendant les 10 premières secondes de sécrétion au sein de la bande électrode/cellule. $r = 10 \mu\text{m}$; $F_s = 0,12 \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^2$, soit $37,7 \text{ Hz}$; $\rho = 2$; $h = 100 \text{ nm}$; $C_{\text{catécholamines}} = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Contrairement aux cellules chromaffines, et ce quelles que soient les fréquences surfaciques et/ou le nombre de protons électrogénérés (1 ou 2), les courbes $\text{pH} = f(t)$ obtenues semblent ne posséder ni pics de pH ni présence d'une relaxation jusqu'à un palier de pH (Figure B-81). En réalité, les pics de pH existent mais ont leur intensité est si faible et leur durée si brève qu'on ne peut pas les observer de prime abord sauf en « zoomant » et encore, ils n'apparaissent que sous l'apparence de brèves transitions de paliers après chaque événement (Figures B-82 et B-83).

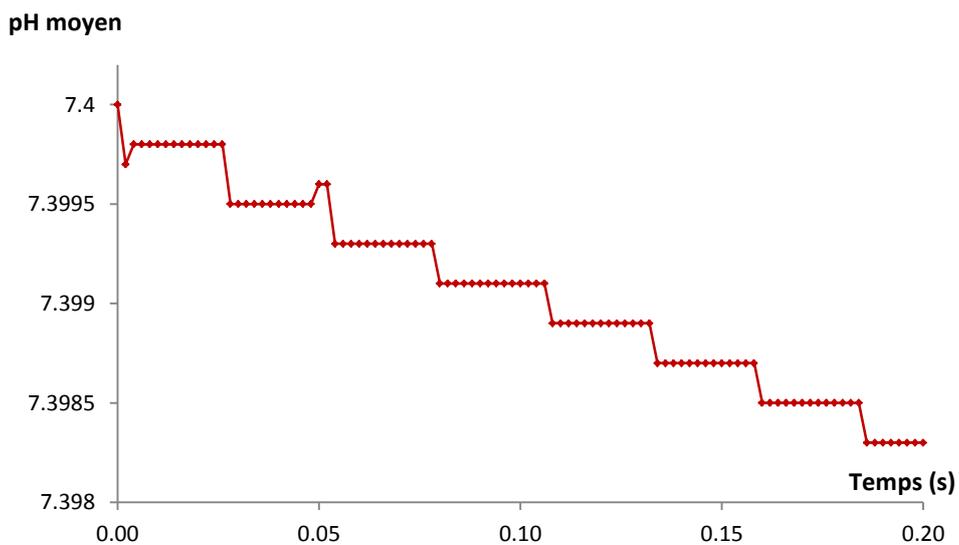


Figure B-82 : Zoom de la figure B-81 aux temps courts.

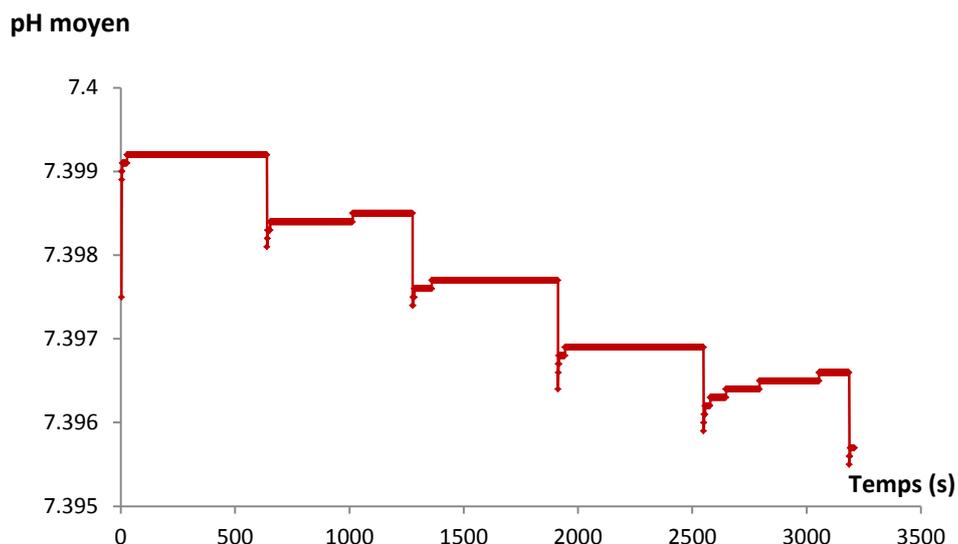


Figure B-83 : Evolution du pH moyen pendant les 3 premières secondes de sécrétion dans la bande. $r = 5 \mu\text{m}$; $F_s = 0,02 \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, soit $1,5 \text{ Hz}$; $\rho = 2$; $h = 100 \text{ nm}$; $C_{\text{catécholamines}} = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Ainsi, même dans un cas extrême pour nos expériences (fréquence surfacique de $0,12 \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, soit une fréquence de sécrétion de $37,7 \text{ Hz}$; $r = 10 \mu\text{m}$; 2 protons électrogénérés) (*Figure B-80*), le pH dans la bande diminue de 0,06 unités de pH par rapport au pH du tampon après dix secondes.

Contrairement aux cas précédents, **aucun palier de pH n'est atteint et ce même après plusieurs dizaines de secondes de sécrétion**. Si on se fie à l'évolution linéaire du pH en fonction du temps, la pente de la droite est alors de $6,67 \cdot 10^{-3}$ unités $\text{pH} \cdot \text{s}^{-1}$. Le pH moyen dans la bande serait alors de 7 au bout d'une minute de sécrétion, et ce, même pour une fréquence irréaliste de $37,7 \text{ Hz}$. Pour une fréquence caractéristique des cellules BON ($r = 5 \mu\text{m}$ et $F_s = 2 \cdot 10^{-3} \text{ Hz} \cdot \mu\text{m}^{-2}$) (*Figure B-83*) à savoir aux alentours de $0,2 \text{ Hz}$, le pH atteint une valeur de 7,38 après une minute de sécrétion et de détection.

Ce résultat est directement lié au fait que la concentration intragranulaire des cellules BON est 1000 fois plus faible que celle des cellules chromaffines. Lors d'un événement d'exocytose, le gradient local de concentration en protons entre la zone de libération et le reste de la bande est donc beaucoup moins élevé pour les cellules BON que pour les cellules chromaffines. La diffusion des protons dans le reste de la bande est alors très limitée. Par ailleurs, la quantité de tampon et sa vitesse de diffusion sont alors suffisantes pour rapidement neutraliser l'essentiel de l'augmentation locale de pH.

Ainsi, contrairement aux cellules chromaffines, le pulse de pH résultant d'un événement d'exocytose ne se propage pas ou très peu sur l'ensemble de la bande. Ce résultat est en effet confirmé par les cartographies simulées de pH comparées pour des concentrations intragranulaires de $0,6$ et 6.10^{-4} mol.L⁻¹ (Figure B-84)

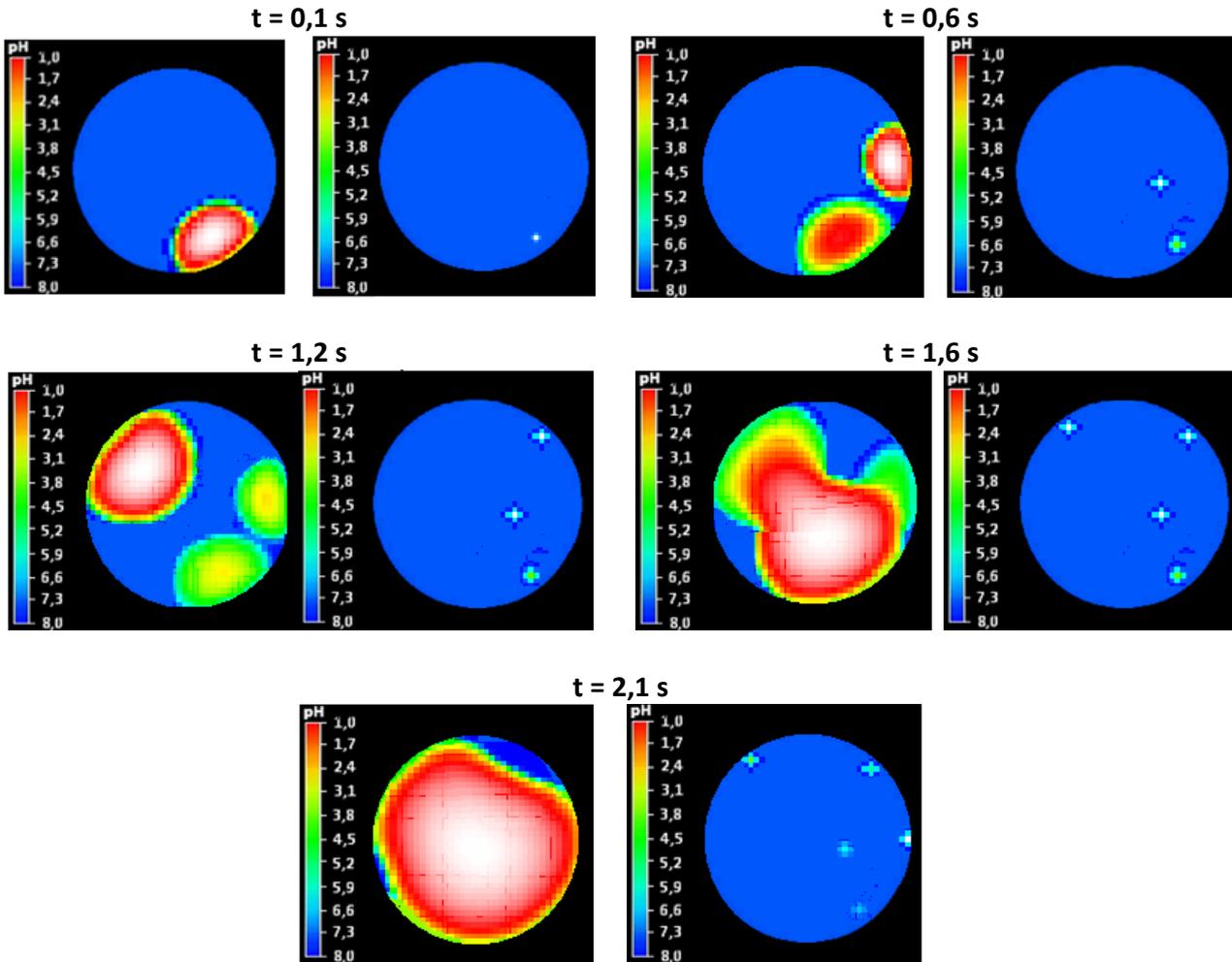


Figure B-84 : Représentation spatiale du pH au cours du temps au sein de la bande électrode/cellule.

$$r = 6 \mu\text{m} ; F_s = 18.10^{-3} \text{ Hz}.\mu\text{m}^{-2}, \text{ soit } 2 \text{ Hz} ; \rho = 2 ; h = 100 \text{ nm} ;$$

$$C_{\text{catécholamines}} = 0,6 \text{ mol.L}^{-1} \text{ (gauche)} \text{ et } 6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \text{ (droite)}.$$

Nota bene : les formes en croix des pulses résiduels sont liés à la pixelisation et ne présupposent pas la forme réelle à symétrie cylindrique.

D'après ces cartographies, on constate que pour une concentration vésiculaire élevée, quatre à cinq pulses suffisent pour modifier de façon homogène le pH moyen dans la bande. Par contre, des pulses de pH moins intenses diffusent faiblement voire quasiment pas au sein de la bande, le pH moyen de cette dernière n'étant donc peu voire jamais modifié par rapport à celui du tampon. Dans ces conditions, les gradients de pH entre les valeurs intravésiculaires et

extracellulaires ne sont pas modifiés par rapport à une mesure en microscopie TIRF classique. Cela est extrêmement important pour l'interprétation des signaux de fluorescence.

Il apparaît donc que les cellules BON, de par leur faible quantité de matériel électroactif ($C = 6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) et leur sécrétion modérée (fréquence moyenne entre 0,1 et 1 Hz), conviennent parfaitement au couplage entre la microscopie TIRF et l'ampérométrie pour la détection d'événements exocytotiques individuels. En effet, chaque événement induit une variation de pH extrêmement faible et la non-propagation du pulse en question à l'ensemble de la bande assure quasiment à l'événement d'exocytose suivant d'avoir lieu à un endroit de la bande où le pH est rigoureusement celui du tampon.

IV. Fonctionnement des dispositifs de couplage

Dans les parties précédentes, nous avons présenté l'intérêt que peut présenter le couplage entre microscopie TIRF et ampérométrie pour la détection et la compréhension de l'exocytose. Nous avons mis au point un dispositif fondé sur quatre bandes d'ITO. Par ailleurs, à titre de modèle pour le couplage, nous avons montré que les cellules BON BC21 présentaient une activité exocytotique susceptible d'être visualisée en microscopie TIRF et détectée en ampérométrie sans que chaque détection n'introduise un biais significatif sur l'autre. Nous allons désormais présenter le couplage proprement dit.

IV.I. Conditions expérimentales

Une fois les cellules électroporées en présence de sérotonine ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$), environ 1 million de cellules BON BC21/5-HT est déposé sur les dispositifs. Ces cellules sont alors incubées pendant 24 à 36 heures dans leur milieu de culture supplémenté en sérotonine ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Juste avant les mesures, le milieu de culture est remplacé par un tampon physiologique de Locke puis la boîte de Petri est placée sur la plate-forme du microscope.

La cellule identifiée et retenue pour les mesures doit être isolée des autres cellules pour ne pas parasiter d'une part les images de microscopie TIRF avec une fluorescence provenant de vésicules d'une autre cellule et, d'autre part pour que la détection ampérométrique ne puisse provenir que de cette cellule unique. En effet, le principe de l'association entre les images TIRFM et les pics ampérométriques d'un même événement repose sur l'absence d'ambiguïté sur la correspondance temporelle entre les deux mesures. Les cellules doivent donc être à la fois

entièrement positionnées sur la surface active d'une électrode et être bien visible en évanescence. Les cellules mal adhérentes ou « abîmées » ne sont pas toujours visibles. Une fois la cellule choisie, le fil conducteur de l'électrode sur laquelle la cellule à étudier se trouve est relié au potentiostat et le capillaire de stimulation contenant une solution de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'ionomycine est rapproché à l'aide d'un micromanipulateur à 20-30 μm de la cellule. Le flux de la solution de stimulation, contrôlé à l'aide d'un pousse seringue, est maintenue pendant la durée d'acquisition de la caméra (60 secondes). La libération de sérotonine est suivie par ampérométrie à + 650 mV vs Ag/AgCl.

La figure B-85 représente un dispositif type sur lequel des cellules BON BC21/5-HT sont adhérentes. Un capillaire de stimulation est placé de façon à ne stimuler qu'une cellule sur l'électrode bande d'ITO considéré.

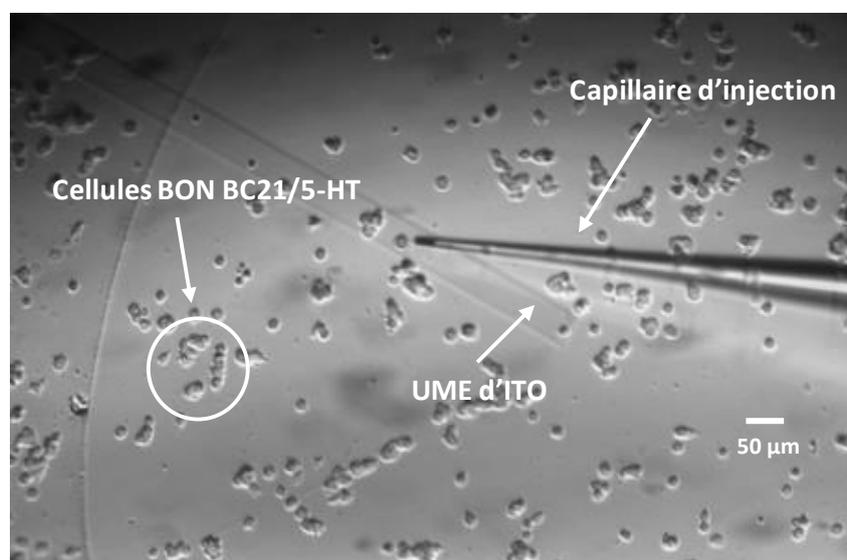


Figure B-85 : Photo d'une électrode d'ITO partiellement isolée.

Etude du bruit électrique

Les études ampérométriques présentées dans la *partie B. III.III. Etude ampérométrique des cellules BON*, ont été effectuées sous cage de Faraday. Le bruit électrique obtenu sans traitement du signal pouvait ainsi y être maintenu à un niveau très faible, de l'ordre de 0,1 pA voire moins. Ceci n'était pas le cas dans le cadre des manipulations de couplage réalisées au laboratoire de F. Darchen à l'IBPC car le microscope TIRF n'était pas équipé d'une cage de Faraday. D'autre part, le bruit dépend peu du matériau de l'électrode mais essentiellement de sa surface active.²²⁹ Lors de la conception des dispositifs, nous avons fait varier la largeur des bandes d'ITO ainsi que la surface recouverte de résine isolante pour minimiser le bruit tout en maintenant une probabilité raisonnable qu'une cellule « saine » adhère sur la bande.

	Surface active de l'électrode (mm ²)	Bruit (pA)
bande 200 μm x 1 mm (non isolée)	0,2	4
bande 200 μm x 2 mm (non isolée)	0,4	7
bande 100 μm x 700 μm (isolation sous le masque type cercle)	0,07	2,5
Bande 200μm x 700 μm (isolation sous le masque type cercle)	0,14	3
bande 200 μm x 700 μm (isolation sous le masque type rectangle)	0,14	3
2 zones de 200 μm x 200μm (isolation sous le masque type serpent)	0,08	2,5

Tableau B-3 : Bruit électrique des électrodes d'ITO en fonction de la surface de l'électrode.

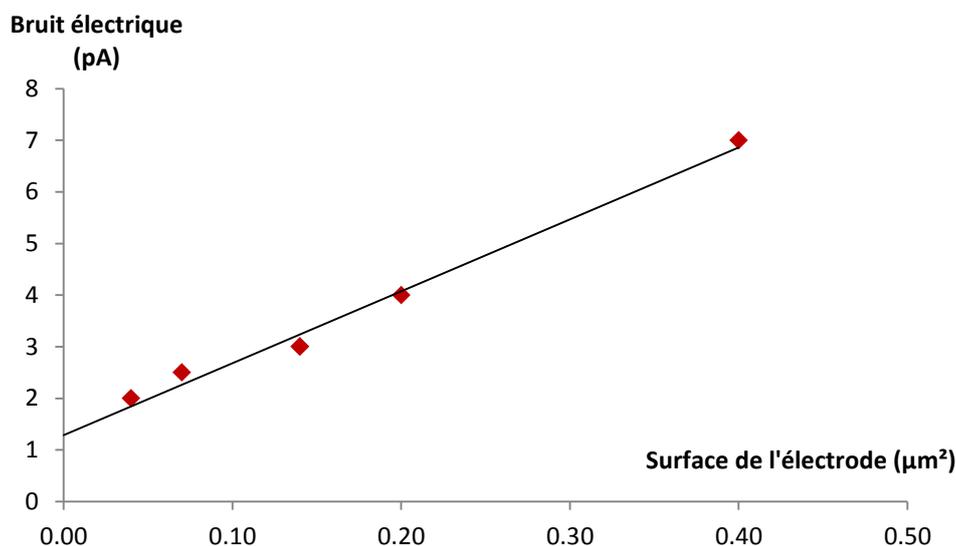


Figure B-86 : Bruit électrique des électrodes d'ITO en fonction de la surface de l'électrode. (Mesures en l'absence de cellules, toutes choses égales aux conditions de mesures par ailleurs).

Il faut remarquer que si le bruit varie bien linéairement avec la surface de l'électrode, il ne lui est pas proportionnel mais affine. Cela indique l'existence d'une capacité constante, vraisemblablement liée à la connectique électrique. Après isolation des électrodes avec de la résine, le bruit électrique est de seulement 2 à 3 pA malgré l'absence de cage de Faraday. En réalité, le bruit électrique est bien plus faible dans les conditions de l'étude sur cellules. En effet, une fois déposées sur les dispositifs, les cellules non stimulées jouent un rôle isolant sur la surface d'ITO. Le bruit peut donc être cinq à dix fois plus faible, permettant alors la détection d'événements d'exocytose de très faible amplitude. Dans certains cas moins favorables,

l'essentiel du bruit provient du 50 Hz et peut être éliminé *a posteriori* avec un filtre adéquat, les caractéristiques du pic étudié étant vérifiées avant et après application du filtre en question pour éviter toute altération du signal faradique.

IV.II. Démonstration de la faisabilité du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie TIRF

Une fois une cellule choisie et stimulée (*Figure B-85*), la détection en temps réel permet d'observer le mouvement des vésicules se rapprochant de la membrane plasmique et leur localisation au voisinage de cette membrane. En effet, la lignée BON BC21 est un clone fluorescent stable développé en fusionnant la sonde eGFP au neuropeptide Y permettant de marquer les compartiments acides de la cellule, et de fait, leurs vésicules de sécrétion. Les cellules excitées par un laser à 488 nm émettent alors leur fluorescence à 508 nm, permettant de visualiser les vésicules entrant dans le champ d'observation.

Les événements d'exocytose sont identifiés d'une part à travers la présence de pics ampérométriques au cours de la stimulation et d'autre part grâce à des flashes ou des extinctions de fluorescence se produisant au même moment. La sonde GFP utilisée, la eGFP, est sensible au pH : sa fluorescence est maximale à pH 7 et elle perd 50 % de son intensité à pH 5,5.¹⁵⁸ Lors de sa fusion, un granule se rapproche de la membrane plasmique et entre ainsi dans le champ évanescent. La sonde fluorescente, toujours au sein du granule est alors moyennement fluorescente, le pH intragranulaire étant de 5,5. Après la fusion, les molécules libérées, dont la eGFP, diffusent à travers le pore de fusion dans le tampon physiologique, et se trouvent alors dans un environnement extracellulaire à pH 7,4. La fluorescence est donc presque maximale, et la dilution plus ou moins rapide de la sonde fluorescente est responsable d'une extinction graduelle ou d'un flash lumineux.

IV.III.1. Analyse d'événements couplés

Les expériences de détection optique/électrochimique combinées de l'exocytose ont été effectuées sur six cellules isolées. Comme observé précédemment lors des études ampérométriques indépendantes, la fréquence de sécrétion reste suffisamment faible (0,1 Hz) pour que l'attribution des deux types de mesures à un événement donné puisse être réalisée sans aucune ambiguïté. Dans ce contexte, 25 événements couplés ont pu être détectés. Quatre d'entre eux sont présentés (*Figure B-87 à B-90*) à titre d'exemples.

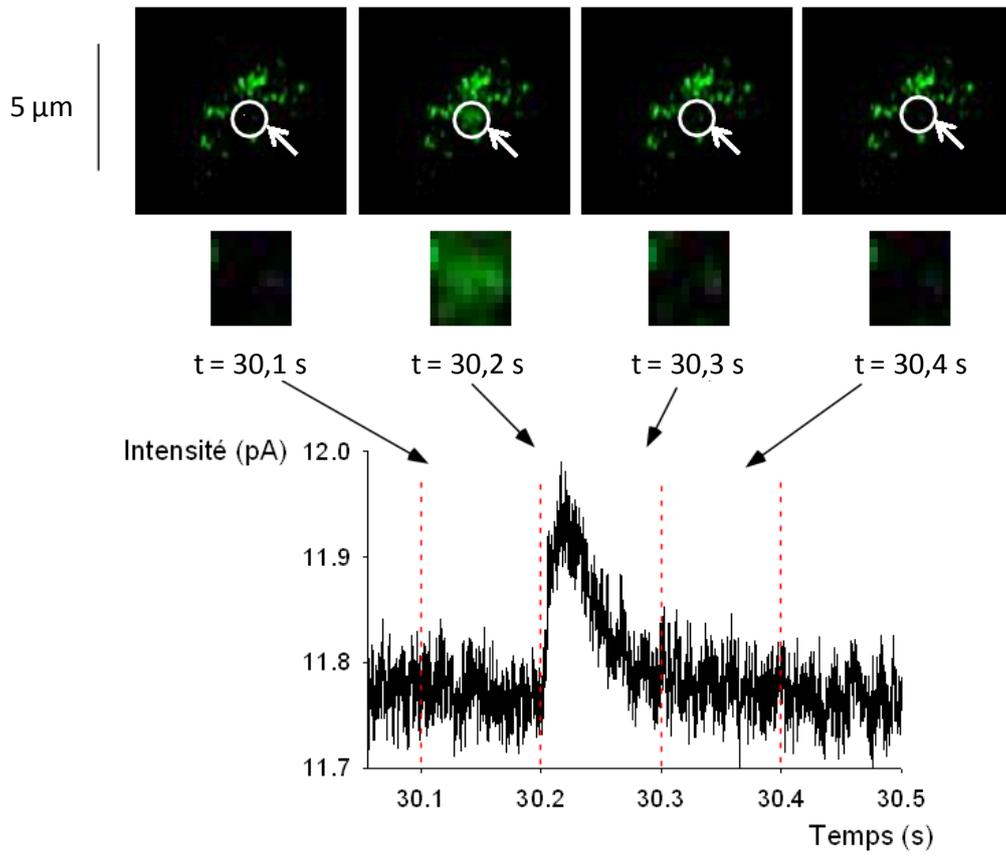


Figure B-87 : Exemple d'événement couplé (flash de fluorescence).

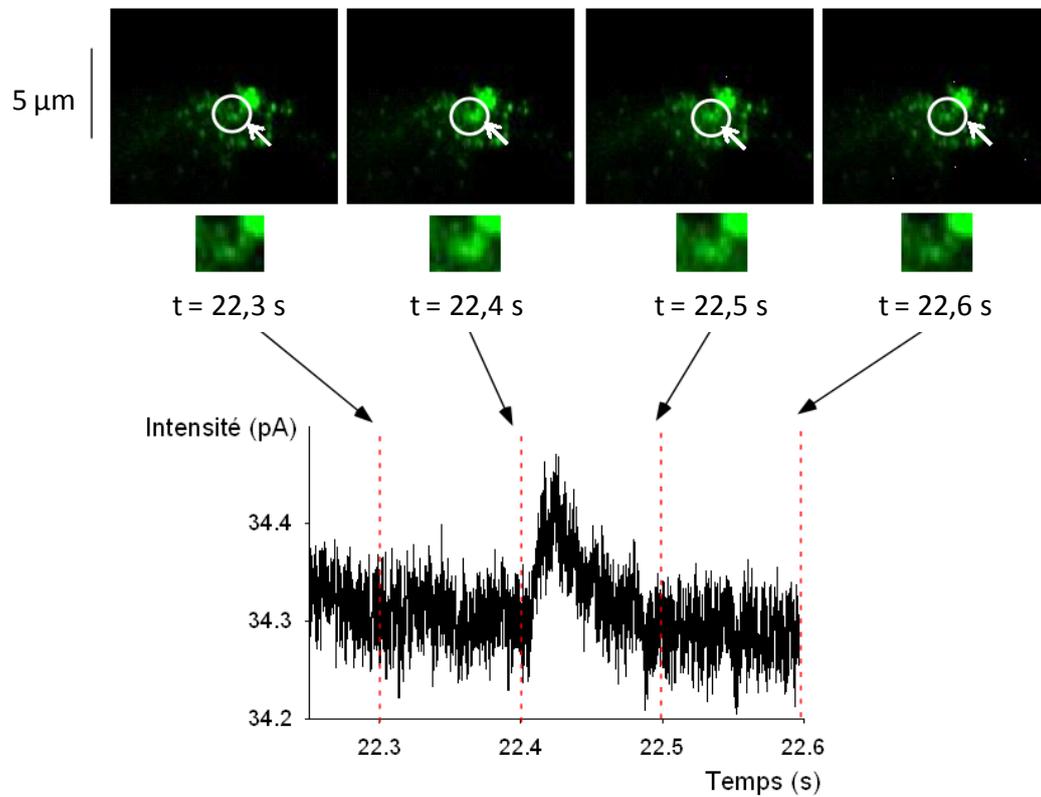


Figure B-88 : Exemple d'événement couplé (flash de fluorescence).

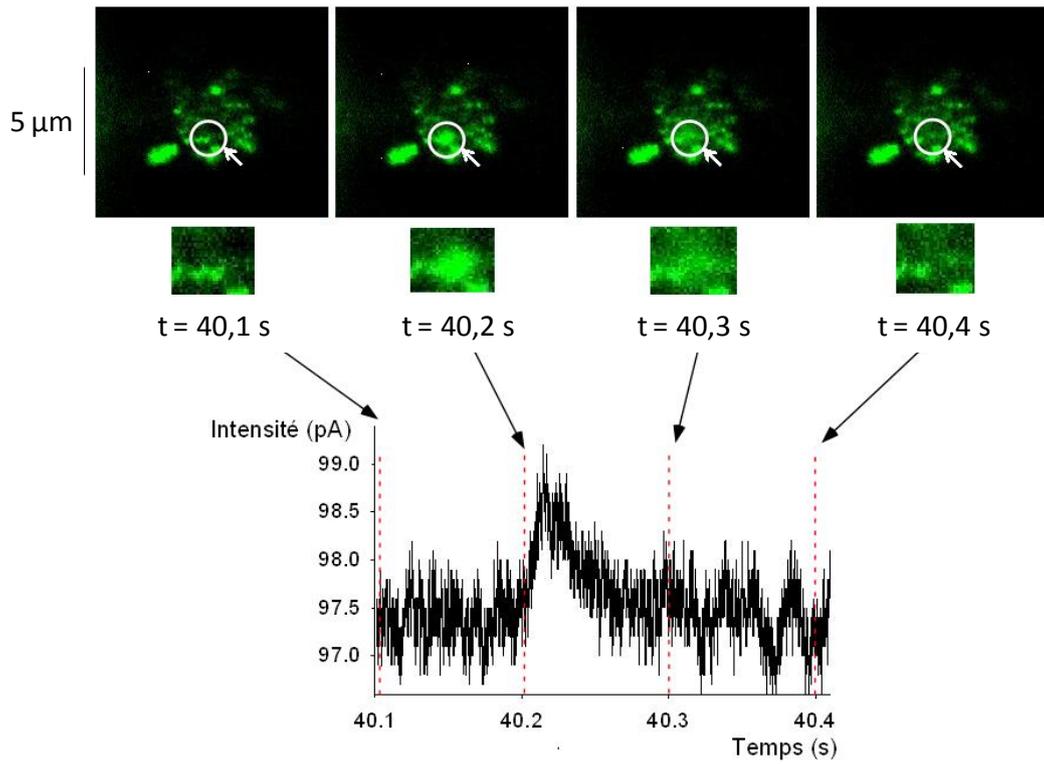


Figure B-89 : Exemple d'événement couplé (flash de fluorescence).

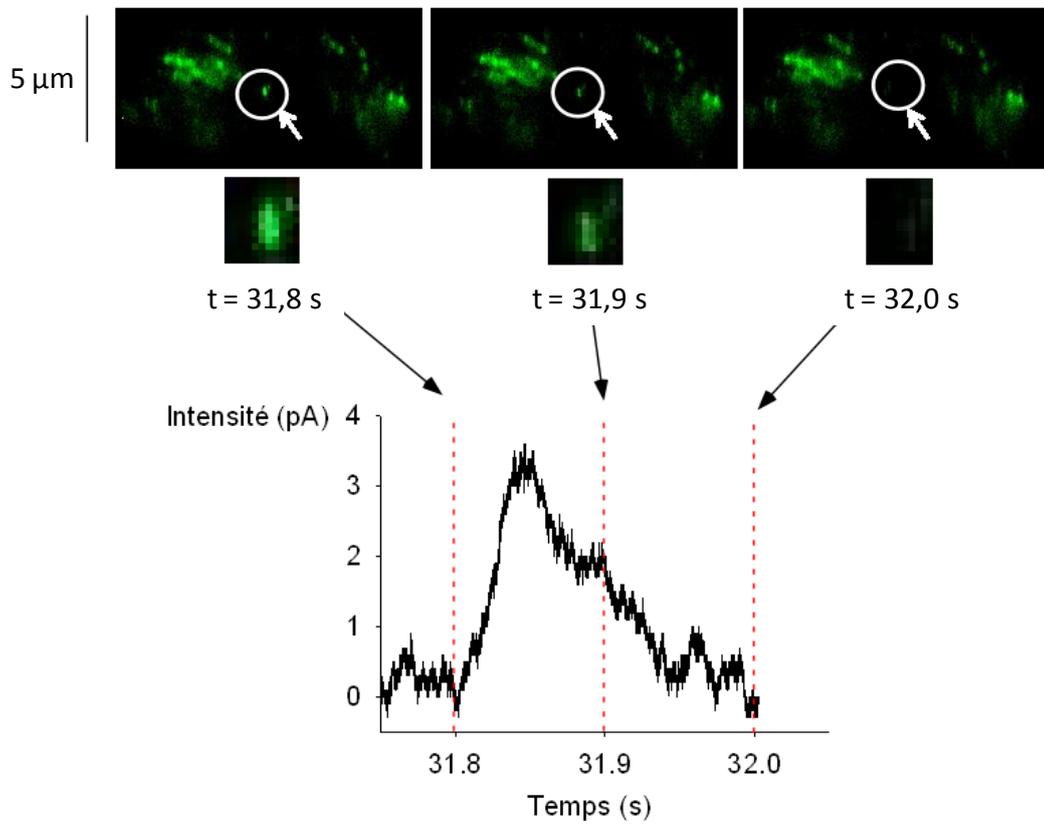


Figure B-90 : Exemple d'événement couplé (extinction graduelle de fluorescence).

Les trois premiers exemples (Figures B-87 à B-89) mettent en évidence un flash fluorescent (le cas le plus fréquent), représentatif d'une libération massive du faible contenu intravésiculaire en moins de 100 ms. Sur les images obtenues en microscopie TIRF, on voit l'apparition du flash en question au moment de la montée du pic ampérométrique, une diffusion de ce flash lors de la descente du pic et enfin, une disparition lors du retour à la ligne de base. D'autres événements de durée plus longue (200 ms) car correspondant à des vésicules plus larges, sont, quant à eux, repérés par une extinction de fluorescence (Figure B-90).

Cependant, la faible résolution temporelle de la caméra utilisée pour la détection optique ne permet pas de voir clairement l'évolution dans le temps du flash de fluorescence. En effet, globalement, un événement d'exocytose a une durée de plusieurs dizaines de millisecondes, mais la caméra ne permet d'obtenir qu'une image toutes les 100 ms. C'est ce qui explique en partie le fait que lors de cette étude, tous les événements d'exocytose détectés (85 au total), optiquement et électrochimiquement, ne sont pas nécessairement couplés. Ainsi, 30 % des événements exocytotiques observés le sont avec une double détection. 20 % sont des pics ampérométriques n'ont pas de correspondant optique, ceci étant dû à la résolution de la caméra qui la rend aveugle aux événements de libération trop rapide. Au contraire, 50 % des événements sont identifiés en microscopie TIRF, mais cette fois sans correspondance électrochimique claire. Ceci peut être expliqué par le fait que la concentration intravésiculaire en sérotonine des cellules BON BC21 (mais il en serait de même pour les N13) reste peu élevée, occasionnant donc la présence d'événements de sécrétion à la limite de sensibilité de l'ampérométrie compte tenu du trop faible rapport signal sur bruit. Ce type d'événement pourrait certainement être observable avec un dispositif placé sous cage de Faraday (bruit de l'ordre de 0,5 pA avant dépôt des cellules) ce qui n'a pas été possible dans le laboratoire de nos partenaires de l'IBPC.

IV.III.2. Analyse des pics ampérométriques obtenus lors du couplage

Ainsi, l'analyse ampérométrique des pics couplés obtenus a été réalisée selon la méthode décrite précédemment et ce sur 6 cellules. Les caractéristiques ampérométriques moyennes des événements couplables sont les suivants :

Largeur à mi hauteur	$t_{1/2} = 21,1 \pm 2,0$ ms
Intensité maximale	$I_{\max} = 0,8 \pm 0,2$ pA
Charge	$Q = 52 \pm 17$ fC

Tableau B-4 : Valeurs moyennes des paramètres caractéristiques des pics ampérométriques des événements couplés.

Ces paramètres de pics obtenus lors du couplage, bien qu'obtenus sur les mêmes cellules que dans le cas de la détection de l'exocytose des BC21/5-HT sur ITO dans notre laboratoire (cf. III.II.5. *BC21 électroporées en présence de sérotonine sur électrode d'ITO*), semble avoir des caractéristiques différentes pour ce qui est de l'intensité et de la charge. Même si l'on peut incriminer la faible résolution de la caméra utilisée en microscopie TIRF, qui biaise la sélection des événements ampérométriques, il convient de rester prudent et de se garder de toute déduction supplémentaire puisque le nombre de pics analysés est trop faible pour conduire à un traitement statistique fiable et pertinent.

IV.III. Couplage microscopie TIRF/ampérométrie : conclusions des études sur cellules BON BC21

Au terme de ces études, nous avons pu élaborer un dispositif fondé sur la présence de quatre bandes d'ITO, matériau conducteur et transparent. Ce dispositif, adapté aux exigences et contraintes de la microscopie TIRF et de l'ampérométrie a été utilisé avec succès pour la détection d'événements d'exocytose couplés sur cellules BON BC21 offrant la possibilité de localiser et de caractériser finement les événements de libération. Néanmoins, si la validité du concept et de sa réalisation expérimentale est bien établie, la performance reste encore limitée, d'une part par la faible résolution de la caméra (TIRFM) et d'autre part par les faibles rapports signal sur bruit (ampérométrie) liés à l'impossibilité d'utiliser une cage de Faraday dans la configuration actuelle à l'IBPC. L'une et l'autre de ces limites sont indépendantes de la méthode elle-même et devraient donc être remédiées en spécialisant le montage TIRF.

IV.III.1. Le couplage est-il viable pour d'autres modèles cellulaires que les BON ?

Si on se réfère aux résultats obtenus pour les cellules chromaffines (cf. *paragraphe III.III. Rôle du modèle cellulaire pour le couplage : problématique du pH dans la bande cellule/électrode*) l'acidification de la bande cellule/électrode est assez rapide (quelques secondes) et conduit à des valeurs de pH qui restent supérieures à 5,5 mais qui sont inférieures de 1 à 1,4 unités pH par rapport au tampon (7,4), risquant alors de limiter voire d'empêcher la détection d'événements exocytotiques en microscopie TIRF. Au-delà des simplifications et limitations du modèle, ces valeurs de pH sont probablement encore sous-estimées. Elles sont en effet basées sur une concentration intravésiculaire de $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$, grandeur caractéristique et admise pour les cellules chromaffines dans la littérature.

D'une part, les cellules chromaffines, associées au sécrétagogue K^+ ($55 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) / Ca^{2+} ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) tant en concentration intragranulaire qu'en fréquence, constituent un cas extrême. Les concentrations en espèces électroactives sont souvent inférieures pour d'autres sécrétagogues et ou d'autres modèles cellulaires. D'autre part, par l'intermédiaire de mesures ampérométriques couplées à l'observation par microscopie,⁹² une étude récente a revu cette valeur à la baisse ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) pour les cellules chromaffines de souris. (Le résultat de cette étude n'invalide pas la valeur de $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ pour la concentration intravésiculaire en catécholamines pour une cellule chromaffine. Elle signifie que le matériel électroactif détecté correspondrait à une concentration intravésiculaire effective 6 fois moindre, ce qui laisse à penser qu'une vésicule ne libère pas en moyenne la totalité de son contenu)

D'autres simulations ont alors été réalisées à partir de cette gamme de concentrations et la courbe représentant le pH stationnaire atteint dans la bande en fonction de la fréquence de sécrétion pour une concentration de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ a été élaborée pour une oxydation générant un ou deux protons par molécules oxydées (Figures B-91 et B-92).

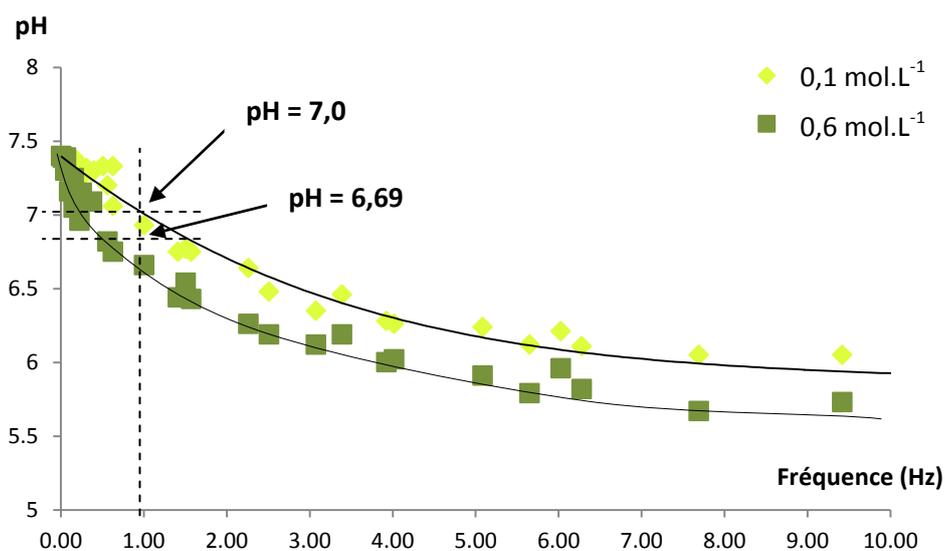


Figure B-91 : Relation entre fréquence de sécrétion et pH stationnaire dans la bande cellule/électrode.

$$h = 100 \text{ nm} ; C_{\text{catécholamines}} = 0,1 \text{ et } 0,6 \text{ mol.L}^{-1} ; \rho = 1 ; 3 < r < 7 \mu\text{m}.$$

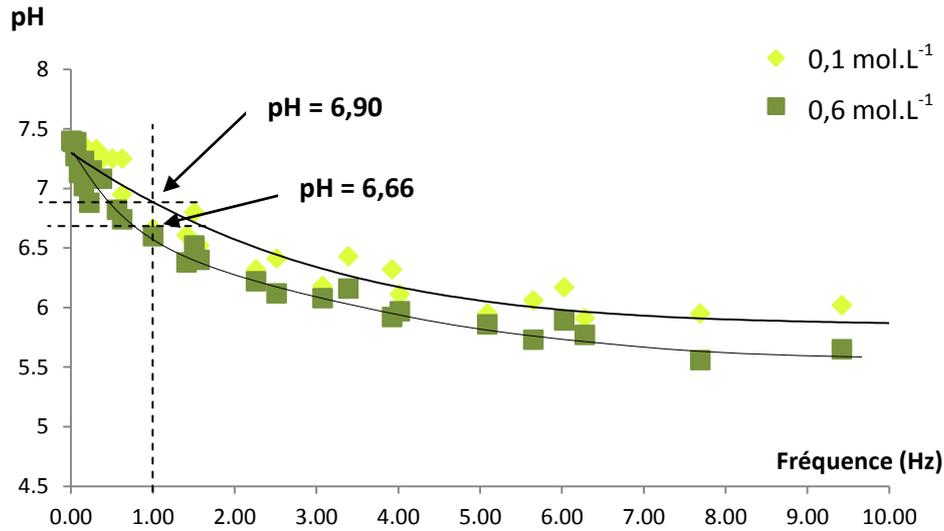


Figure B-92 : Relation entre fréquence de sécrétion et pH stationnaire dans la bande cellule/électrode. $h = 100 \text{ nm}$; $C_{\text{catécholamines}} = 0,1 \text{ et } 0,6 \text{ mol.L}^{-1}$; $\rho = 2$; $3 < r < 7 \text{ }\mu\text{m}$.

On constate alors que pour des fréquences de sécrétion habituelles, c'est-à-dire de l'ordre de 1 Hz et une concentration intravésiculaire de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, le pH moyen dans la bande atteint une valeur située aux alentours de 7 et non plus de 6,7, comme le montraient les simulations réalisées pour $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$. Ainsi, la modification du pH au voisinage de la cellule reste acceptable et ne doit pas conduire à une dégradation significative de la détection optique d'un événement moyen de sécrétion.

Globalement, les modélisations effectuées dans le cadre de ce chapitre montrent que pour le modèle cellulaire BON, la détection ampérométrique de l'exocytose n'affecte pas le pH de la bande électrode/membrane cellulaire. Ces modélisations, qui correspondent à des valeurs de pH sous-estimées, ont été également effectuées pour des fréquences et concentrations intravésiculaires caractéristiques des cellules chromaffines, type cellulaire qui peut conduire aux sécrétions les plus soutenues et les plus intenses parmi tous les types utilisés dans la littérature (PC12, mastocytes, cellules β -pancréatiques...). Dans ce cas, pour des fréquences inférieures à 1 Hz, la variation de pH est tout au plus de 0,4 unités pH, induisant alors des conditions encore favorables à la détection en microscopie à onde évanescente. L'acidification de la bande cellule/électrode reste cependant plus préoccupante pour des fréquences supérieures à 1 Hz si les cellules ne possèdent pas de mécanisme biologique compensant les chutes de pH au voisinage de leur membrane cytoplasmique.

Cette gamme de fréquence n'est cependant pas pertinente dans le contexte du couplage puisque ce dernier, afin d'espérer corréliser signaux ampérométrique et optique, impose de

travailler dans des conditions de sécrétion modérée. De fait, nous pouvons conclure, à travers ces simulations, que le couplage TIRFM/ampérométrie est a priori applicable à d'autres modèles cellulaires que les cellules BON, y compris les cellules chromaffines, pour peu que l'on choisisse un sécrétagogue adapté à une concentration convenable. De plus, on rappellera que le modèle utilisé pour la simulation du pH ne prend pas en compte la mobilité des espèces dérivées du tampon. Des évolutions du programme utilisé montrent que la prise en compte de la diffusion du tampon, pour des fréquences inférieures à 2 Hz, induit une relaxation du pH à une valeur très proche de 7,4.

IV.III.2. Mise en regard de ce travail par rapport à la littérature

On notera que cette volonté de mettre au point des dispositifs permettant la détection ampérométrique de l'exocytose et l'attribution spatiale des événements est partagée par d'autres groupes, mais sans l'utilisation de la microscopie. On mentionnera ainsi un réseau composé de trois²³⁰ ou quatre^{102, 231} électrodes de platine ou de diamant nanocristallin²³² de taille suffisamment faible (environ 3 microns de large) pour qu'une cellule unique y soit déposée avec le stress mécanique que cela implique. On notera également l'association de sept fibres de carbone (de 2,5 microns de diamètre chacune) afin de former un réseau d'électrodes recouvrant la cellule sécrétrice^{98, 99}. Dans tous les cas, la résolution spatiale (quadrillage de la cellule étudiée en 3, 4 ou 7 régions) reste bien inférieure à celle obtenue par notre protocole et notre dispositif. En outre, au stade actuel, l'augmentation du nombre d'électrodes indépendantes impose un nombre de potentiostats comparable, ce qui pose aujourd'hui bien plus de problèmes que la miniaturisation d'un réseau d'électrodes même si les évolutions techniques à venir rendent cette approche également prometteuse.

Au-delà du projet de cartographier les événements ampérométriques, le développement de dispositifs microfluidiques pour l'exocytose s'oriente majoritairement depuis plusieurs années vers l'analyse combinatoire, c'est-à-dire la mise au point de mesures sur plusieurs cellules simultanément. Les contributions récentes vont de l'utilisation d'une ou plusieurs microélectrodes dans un canal^{104, 229, 233, 234}, au piégeage des cellules dans un ou plusieurs puits contenant les électrodes.^{191, 232, 235-238} On mettra par ailleurs en évidence deux contributions récentes du groupe de K. D. Gillis (*Université du Missouri*) dans lesquelles les puits ne peuvent contenir qu'une cellule chacun, par le biais d'un traitement de surface adapté (les électrodes sont rendues cytophiles et la partie isolante, cytophobe)²³⁹ ou par un jeu d'aspiration,²⁴⁰ même si la question de l'effet du piégeage des cellules sur leur activité sécrétrice peut se poser.

Ce bref survol de la littérature sur l'analyse combinatoire de l'exocytose montre que notre dispositif contribue indirectement à cette thématique, même si cela n'était pas son but avéré. Quoi qu'il en soit, pour la première fois à notre connaissance, la démonstration de la détection simultanée optique/électrochimique d'événements d'exocytose a été effectuée sur cellule unique et ce, dans des conditions de culture acceptables. L'application de nos dispositifs à l'étude de questions biologiques constitue désormais une évolution naturelle de ce travail et nous y reviendrons au sein de la conclusion de cette partie. Par ailleurs, comme nous l'avons remarqué plus haut, la performance de la méthode pourrait être facilement accrue par l'utilisation d'une caméra plus rapide et l'installation du dispositif dans une cage de Faraday.

V. Conclusions et perspectives

La compréhension du mécanisme de fusion membranaire constitue un objectif majeur en biologie cellulaire et a stimulé au cours des 10 dernières années de nombreux travaux qui ont permis de mieux appréhender le mécanisme d'exocytose. Cependant, la dynamique du pore de fusion (fermeture, dilatation, stabilisation) soulève encore de nombreuses interrogations. De même, les facteurs gouvernant le devenir des vésicules (recyclage ou fusion avec la membrane plasmique) restent encore également méconnus.

L'ampérométrie sur cellule unique est une technique très sensible permettant la détection en temps réel des événements d'exocytose avec une résolution temporelle de l'ordre de quelques dixièmes de milliseconde lorsque le niveau de bruit peut être maîtrisé. Elle apporte de nombreuses informations cinétiques très riches sur la dynamique du pore de fusion mais seulement une fois la libération des molécules débutée. Ainsi, son couplage avec la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente, permettant de visualiser le mouvement et la localisation des vésicules de sécrétion avant le début de la libération et de confirmer indépendamment la libération vésiculaire, permet de corréler toutes ces informations.

La combinaison de ces techniques d'analyse apportera de nouvelles réponses quant à ce mécanisme. Par exemple, elle permettra de corréler le comportement du pore de fusion (dynamique d'ouverture, de fermeture, stabilité) mesuré par ampérométrie au déplacement d'une vésicule dans les trois dimensions de l'espace (visualisé en microscopie TIRF), à l'implication de différentes molécules au cours des étapes du mécanisme (en utilisant un double marquage), à la dynamique du cytosquelette, ou encore à la concentration en calcium.

Ce couplage nécessite que la double détection optique et ampérométrique soit réalisée au même pôle de la cellule. Des dispositifs adaptés, constitués d'électrodes planes et transparentes

d'ITO ont été conçus. Le choix de déposer des cellules BON BC21 transfectées avec de la sérotonine sur ces dispositifs a été justifié par des contraintes expérimentales (vésicules fluorescentes, bonne adhérence des cellules, qualité des images en microscopie TIRF, fréquence de sécrétion adaptée, intensité des événements suffisante...) que nous n'avons pu résoudre que par l'optimisation du choix cellulaire dans le cadre actuel de la mise au point et de la validation de notre concept. Cependant, comme nous l'avons vu, ces contraintes actuelles devraient aisément pouvoir être réduite en spécialisant l'appareillage TIRF.

Comme nous l'avons décrit plus haut, le dispositif mis en place au cours de ce travail doit désormais être appliqué en routine afin de répondre à plusieurs questions ou débats portant sur les mécanismes d'exocytose. Pour ce faire, la principale limitation pratique dans le cadre de ce travail, à savoir, la faible résolution temporelle (10 Hz, une image toutes les 100 ms) de la caméra CCD utilisée pour l'acquisition des images en TIRFM doit être améliorée. Au-delà, la problématique n'est plus d'ordre technique ou analytique puisqu'il est possible de détecter électrochimiquement, nous l'avons montré avec les cellules BON BC21, des événements de faible amplitude sous cage de Faraday. La question se pose alors plutôt en termes biologiques, particulièrement en ce qui concerne le choix du modèle cellulaire. Les cellules BON BC21, avec l'ionomycine en tant que sécrétagogue, constituent-elles le modèle adéquat pour tirer des conclusions sur l'exocytose à partir du couplage TIRFM/ampérométrie ? En l'état, probablement pas. Même si ce type cellulaire ne doit pas être exclu (il a été en effet montré que l'intensité des pics ampérométriques détectés sur cellules BON pouvait atteindre une ou plusieurs centaines de picoampères si l'exocytose était déclenchée par des épices²⁴¹) d'autres, au moins pour ce qui est de la détection électrochimique, sont nettement plus commodes. Tout modèle est analytiquement convenable tant que les molécules contenues dans leurs vésicules sont électroactives et que leur vésicules de sécrétion sont fluorescentes. Chromaffines, mastocytes, β -pancréatiques, PC12, modèles connus et acceptés pour l'étude du mécanisme d'exocytose, peuvent donc tous convenir de ce point de vue. L'arbitrage doit alors provenir de la sonde fluorescente et de sa nature. Sa capacité à être exprimée expérimentalement (protocole, rendement...) ou le développement de clones possédant cette dernière de manière constitutive, seront alors les facteurs déterminants.

Dans cette optique, si l'on tient compte de ces critères et de la facilité de culture, les cellules PC12 constitueraient un bon compromis, au moins à court terme.

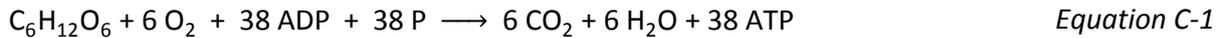
Partie C

**Mise au point d'un microsysteme pour la mesure
du stress oxydant**

PARTIE C : Mise au point d'un microsysteme pour la mesure du stress oxydant

I. Le stress oxydant cellulaire

Le fonctionnement normal d'une cellule aérobie repose principalement sur la respiration cellulaire. Ce processus lui permet de produire l'énergie nécessaire à sa reproduction, à son fonctionnement et à la communication intercellulaire. Cette énergie est obtenue par réaction entre un carburant (glucose, acides gras, ...) et un comburant, le dioxygène. Par exemple, la dégradation complète du glucose en présence de dioxygène conduit à la formation de dioxyde de carbone, d'eau et d'énergie sous forme d'ATP.



Il faut noter qu'il s'agit là d'un nombre maximal de molécules d'ATP produites car dans la pratique, une partie de l'énergie est dissipée par d'autres mécanismes afin de contrôler les flux d'électrons au niveau cellulaire. En outre, au contact de certaines protéines du système de respiration, l'oxygène moléculaire peut subir une réduction incomplète (monoélectronique) formant ainsi l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$.²⁴² Si dans les conditions physiologiques normales cette production reste faible et ne concerne qu'une infime quantité (environ 2 %) du dioxygène utilisé pour la respiration, elle peut s'amplifier lorsque la respiration s'intensifie ou dans le cas de désordres inflammatoires ou nutritionnels.

L'anion superoxyde et ses dérivés sont habituellement regroupés sous le terme générique de « formes réactives de l'oxygène ». Parmi ces espèces, on distingue les ROS (Reactive Oxygen Species) et les RNS (Reactive Nitrogen Species). Certaines peuvent être radicalaires comme l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$ (ROS), le radical hydroxyle HO^{\bullet} (ROS) ou le monoxyde d'azote NO^{\bullet} (ROS et RNS), ou non radicalaires, comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (ROS), l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (ROS) ou l'anion peroxynitrite ONOO^- (ROS et RNS). Les réactivités de ces espèces diffèrent selon leur nature : $\text{O}_2^{\bullet -}$ et NO^{\bullet} ne sont pas nécessairement très réactifs, ce qui permet à l'organisme de les utiliser comme médiateurs régulant des fonctions biologiques comme la vasodilatation ou la prolifération cellulaire, mais sont des précurseurs d'espèces plus réactives comme les radicaux peroxy ROO^{\bullet} et surtout le radical HO^{\bullet} qui peuvent oxyder la plupart des molécules des tissus vivants telles que l'ADN, les protéines ou les lipides, provoquant ainsi des dommages dérégulant le fonctionnement cellulaire. En effet, l'énergie de liaison « O – H » dans l'eau est bien plus grande que celle de toute liaison « R – H » où R est un reste organique ou bio-organique.

Cependant, sous certains aspects, les ROS/RNS peuvent constituer des produits essentiels au fonctionnement cellulaire. En effet, elles sont impliquées dans les mécanismes de défense immunitaire au sein des cellules phagocytaires ou dans la régulation de fonctions comme la mort cellulaire programmée ou apoptose. Cependant, si leur formation n'est pas finement localisée comme dans ces exemples, ou contrôlée à travers un équilibre antioxydants/espèces oxydantes, un excès de la production de ROS/RNS provoque un phénomène dit de « stress oxydant », à l'origine de nombreuses pathologies telles que plusieurs cancers ou la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, la schizophrénie... Différents systèmes de production et d'élimination des ROS/RNS sont alors impliqués dans la régulation de cet équilibre.

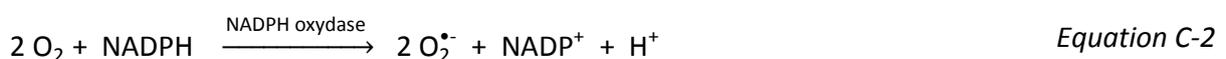
I.I. Production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS)

Les ROS/RNS sont principalement produites par les mitochondries (respiration), mais également dans les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires. Il existe aussi des facteurs environnementaux pouvant générer des radicaux libres : la pollution, l'exposition prolongée au soleil (rayonnement UV), le tabagisme, l'absorption d'alcool ou de médicaments...

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'ensemble des ROS/RNS dérive de deux espèces primaires : l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . Ces deux entités sont produites par des systèmes enzymatiques, les NADPH et les xanthases oxydases pour l'anion superoxyde et les NO synthases pour NO^{\bullet} . Notons que ces dernières, en l'absence de leur substrat, la L-arginine, peuvent aussi conduire à la production de $O_2^{\bullet-}$. Enfin, dans les mécanismes de pompes à protons générant les gradients de pH essentiels au fonctionnement des ATP-synthases, on estime qu'environ 2 à 6 % des électrons utilisés conduisent à la formation accidentelle de $O_2^{\bullet-}$ par réduction directe ou *via* les « cycles futiles » catalysés par le système quinone-hydroquinone.

I.I.1. Les NADPH oxydases et l'anion superoxyde

La NADPH oxydase est une enzyme qui catalyse la formation d'anions superoxyde $O_2^{\bullet-}$ *via* un transfert électronique entre un donneur, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et le dioxygène.

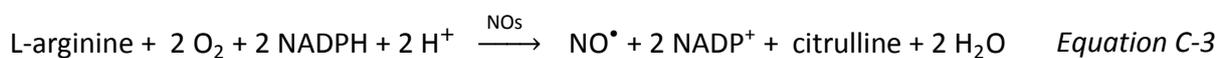


La NADPH oxydase a été mise en évidence sur les neutrophiles à la fin des années 1970, puis sur les fibroblastes depuis les années 1990. C'est un système enzymatique constitué de 5 sous-unités (gp91, p22, p67, p47 et p40) dont deux sont transmembranaires. L'oxydation de NADPH en NADP^+ par l'ion Fe^{2+} de l'hème présente dans l'une des sous-unités membranaires, s'accompagne d'un enrichissement en protons dans le compartiment cytosolique. Afin de maintenir le pH intracellulaire constant, des mécanismes d'élimination de ces protons sont nécessairement mis en jeu comme par exemple, des canaux ioniques qui échangent des Na^+ contre des H^+ , ou encore des enzymes spécialisées, les H^+ -ATPases qui utilisent le flux de protons pour synthétiser l'ATP.

Il existe plusieurs systèmes enzymatiques présentant les mêmes caractéristiques fonctionnelles que la NADPH oxydase. On trouve ainsi cinq enzymes, regroupées sous le terme générique Nox. L'activation de ce type d'enzymes se fait par association des différentes sous-unités dites constituants. Avant activation, le complexe Nox n'est pas assemblé hormis les deux sous-unités membranaires (gp91 et p22), les trois autres sous-unités étant libres dans le cytosol. En réponse à une stimulation appropriée, les unités libres sont transloquées vers la membrane plasmique et s'associent avec gp91 et p22 pour constituer le complexe enzymatique NADPH oxydase fonctionnel. Cet assemblage entraîne le transfert d'électron du substrat, le NADPH, à l'accepteur final, l'oxygène, pour produire $\text{O}_2^{\bullet-}$. Cet assemblage implique plusieurs ions phosphate dont les charges doivent être compensées par des ions calcium. Les ions phosphate étant déjà présents, l'assemblage est déclenché par l'entrée d'ions calciums dans la cellule *via* des canaux appropriés. Nous utiliserons cette propriété pour déclencher des réponses de stress oxydant dans nos études.

1.1.2. Les NO synthases et le monoxyde d'azote

Les NO synthases NOs sont des enzymes capables de produire du monoxyde d'azote NO^{\bullet} à partir de l'acide aminé L-arginine.



Il existe trois isoformes de ces protéines hémiques :

- **NOs I neuronale ou nNOs** : cette enzyme constitutive est présente dans certains neurones du cerveau. Son activité est contrôlée par la présence d'ions calcium et de calmoduline.
- **NOs II inducible ou iNOs** : cette enzyme, uniquement activée en réponse à un certain type de stimulation (par exemple : IFN- γ /LPS ou PMA), a été mise en évidence dans les macrophages, les leucocytes, les cellules hépatiques et les fibroblastes.

- **NOs III endothéliale ou eNOs** : cette enzyme constitutive est présente dans les cellules endothéliales. Son activité est elle aussi contrôlée par la présence d'ions calcium et de calmoduline.

Les sous-unités des NOs constitutives (eNOs et nNOs) sont déjà présentes dans le cytosol et sont opérationnelles après translocation vers la membrane, dans une gamme de temps de l'ordre de la seconde. Là encore, l'assemblage est déclenché par un flux local d'ion calcium. En revanche, la iNOs n'est active qu'après fabrication de différentes sous-unités par expression génétique. Son temps d'activation est de 2 à 16 heures. Elle n'interviendra donc généralement pas dans nos études de durée bien plus brève sauf si les cellules étaient pré-incubées avec un effecteur adéquat (IFN- γ / LPS, PMA).

I.I.3. Réactions chimiques menant à la formation de ROS/RNS

A partir des espèces primaires $O_2^{\bullet-}$ et NO^{\bullet} , de nombreuses réactions chimiques sont mises en jeu afin de produire d'autres ROS/RNS.

Le monoxyde d'azote NO^{\bullet} diffuse très rapidement, et à peu près aussi vite en milieu aqueux ($D = 4,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 37°C) qu'à travers les bicouches lipidiques ($D = 3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 37°C). Il peut donc traverser les tissus et réagir loin de son lieu de formation. Sa durée de vie dépend cependant de son environnement car il peut participer à de nombreuses réactions annexes.

En milieu aérobie, le **monoxyde d'azote** peut être oxydé par le dioxygène et ainsi produire du **dioxyde d'azote** :



Dans un tissu bien oxygéné, cette réaction limite la distance de diffusion de NO^{\bullet} entre 50 et 100 μm à partir de son point d'émission. Cela est intéressant car c'est ainsi que la concentration de NO^{\bullet} est maintenue à quelques $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sauf aux alentours immédiats de ses sites de production. A pH physiologique, cette réaction est en réalité la première étape de la transformation du monoxyde d'azote en anion **nitrite**, plus stable (Equation C-5) qui permet d'éliminer NO^{\bullet} en dehors de la zone sub-micrométrique où il sert de messager ou d'activateur.



$$k_{\text{NO}} = 2 \cdot 10^6 \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \quad (\text{avec } v = k_{\text{NO}} [\text{NO}^{\bullet}]^2 [\text{O}_2] = - \frac{d[\text{NO}]}{dt})$$

De même, une fois formé, l'**anion superoxyde** $O_2^{\bullet-}$ peut réagir selon deux voies. Lors de la première, sa dismutation spontanée ou catalysée conduit à la formation de **peroxyde d'hydrogène** (Equation C-6) dont la concentration est normalement maintenue à des niveaux nanomolaires par la catalase (qui catalyse sa dismutation en eau et oxygène) afin d'éviter une formation incontrôlée de radicaux hydroxyle (voir ci-dessous).



La formation spontanée de H_2O_2 correspond à une constante de vitesse apparente égale à $5.10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ à $\text{pH} = 7$ alors que la voie catalysée par une enzyme de type superoxyde dismutase (SOD) permet d'augmenter la valeur de la constante de vitesse à une valeur proche de la limite de diffusion ($k = 2,5.10^9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

La seconde voie majeure d'évolution de $O_2^{\bullet-}$ consiste en une réaction avec le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . Cette réaction conduit à la formation de l'anion **peroxynitrite** $ONOO^-$:



Cette réaction ne nécessite aucune enzyme pour être catalysée. La constante de vitesse de cette recombinaison de deux radicaux est égale à la vitesse limite de diffusion ($k = 2.10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$), ce qui lui permet de rentrer en compétition avec la dismutation catalysée de l'ion superoxyde dès que la concentration en NO^{\bullet} approche celle de $O_2^{\bullet-}$.

Enfin, le **radical hydroxyle** HO^{\bullet} , probablement l'espèce la plus toxique parmi toutes les ROS/RNS, peut être obtenu au moyen de différentes réactions. La première, dite réaction de Fenton, passe par la transformation de H_2O_2 par réaction avec un métal de transition, par exemple le fer :



Il est également possible de produire des HO^{\bullet} par décomposition de l'anion peroxynitrite en milieu apolaire (par exemple au sein des membranes lipidiques, voire de protéines hydrophobes) :



La réaction d'Haber-Weiss entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, catalysée par des métaux de transition (notamment le fer), conduit également à la formation du radical hydroxyle HO^{\bullet} :



Les mécanismes C-8 et C-10 impliquent une formation de OH^\bullet en milieu polaire (espèces chargées de part et d'autre) et vu la très forte réactivité de OH^\bullet , son « rayon d'action » est *a priori* trop faible pour lui permettre une réaction directe sur les composants cellulaires. Cependant, la réaction C-9 montre que OH^\bullet peut être synthétisé au sein même de la membrane cellulaire et dans ce cas, il n'est attaqué par aucun système antioxydant.

Le radical HO^\bullet est extrêmement réactif et sa durée de vie est alors très limitée (inférieure à la microseconde). Il réagit pratiquement au niveau de son lieu de production²⁴³ selon trois modes d'action.²⁴⁴ Il peut soit arracher un électron, soit arracher un atome d'hydrogène (dans ce cas, il y a création d'une nouvelle espèce radicalaire qui peut alors participer par exemple aux réactions en chaîne responsables de la peroxydation lipidique), soit s'additionner sur les doubles liaisons (entraînant par exemple l'hydroxylation de bases de l'ADN).

I.II. Effets bénéfiques, néfastes, et régulation des ROS/RNS

I.II.1. Effets bénéfiques

La participation des ROS/RNS à la régulation d'un grand nombre de phénomènes biologiques les rendent indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Il est vraisemblable que l'évolution ait maintenu la formation des ROS/RNS pour cette raison, malgré les dangers encourus du fait de ces espèces lorsque leur concentration n'est pas contrôlée.

a) Implication des ROS/RNS dans le mécanisme de défense immunitaire

Un des processus participant au mécanisme de défense immunitaire au sein des cellules est la phagocytose. L'élimination des espèces pathogènes par les macrophages et les neutrophiles consiste en la capture et l'ingestion de ces espèces. Au cours de ce mécanisme, une grande quantité de monoxyde d'azote est produite. Parallèlement, la présence de ces microorganismes pathogènes déclenche un flux important d'anions superoxyde qui se dismutent pour former du peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , et/ou de l'acide hypochloreux, HOCl . Ce mélange extrêmement réactif conduit à la formation d'autres ROS/RNS comme l'anion peroxynitrite ONOO^- , et c'est cet ensemble d'espèces, très corrosif et libéré de façon brutale (« burst oxydatif »), qui est responsable de l'élimination des microorganismes pathogènes dans la cellule. Les bactéries, elles-mêmes, utilisent une production de HOCl afin d'éliminer d'autres bactéries, mais cette fois-ci en l'émettant dans leur environnement immédiat.

b) Implication du monoxyde d'azote NO[•] dans le mécanisme de vasodilatation et la perméabilité vasculaire

Le relâchement vasculaire, c'est-à-dire la vasodilatation, repose en grande partie sur la production et la libération de monoxyde d'azote qui, de par son affinité avec les métaux contenus dans les protéines hémiques, va activer la guanylate cyclase. En réagissant avec le fer de cette enzyme, le monoxyde d'azote modifie sa conformation et rend son site actif accessible à la GTP (guanoside-triphosphate) qui est alors transformée en cGMP (guanilate-monophosphate-cyclique). La cGMP active à son tour une famille spécifique d'enzymes, les kinases, qui, suite à différents mécanismes, provoquent la relaxation des muscles lisses constituant la partie contractile des vaisseaux sanguins. La dilatation et la constriction de ces muscles permettent un contrôle fin des flux sanguins et participent en particulier à la régulation de la pression artérielle et de l'agrégation des plaquettes sanguines.

Par ailleurs, NO[•] joue également un rôle dans la perméabilité vasculaire en participant à la régulation de la transduction du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, vascular endothelial growth factor).

c) Implication des ROS/RNS dans la régulation cellulaire

L'anion superoxyde est un élément majeur modulant certaines voies de signalisation, de régulation, de prolifération et de différenciation cellulaire. Il est également impliqué, avec le monoxyde d'azote dans le mécanisme d'apoptose. Ces deux espèces peuvent jouer un rôle soit pro-apoptotique soit anti-apoptotique dans de nombreux types cellulaires^{245, 246} et permettent alors la destruction de cellules présentant des modifications structurales susceptibles de modifier leur bon fonctionnement afin de préserver celui du tissu et donc de l'organisme.

d) Implication des ROS/RNS dans la régulation des facteurs de transcription et le transfert de message nerveux

La transcription de nombreux gènes est régulée par des facteurs de transcription. L'anion superoxyde intervient dans ce mécanisme en activant ou non ces facteurs, régulant ainsi l'expression de différents gènes.

Le monoxyde d'azote joue également le rôle de messenger inter- et intracellulaire dans le système nerveux central. Il diffuse très facilement, ne nécessite pas de connexions synaptiques pour

exercer ses effets et est susceptible d'agir à de courtes distances de son site de libération. Il semble impliqué dans la nociception, l'apprentissage de la mémoire ou le comportement alimentaire.

I.II.2. Effets néfastes

Les ROS/RNS présentent un rôle ambigu et paradoxal puisqu'elles sont impliquées dans de nombreux processus bénéfiques d'une part, mais que d'autre part, leur production excessive peut provoquer des lésions directes d'architectures biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) essentielles au bon fonctionnement de l'organisme. Ces dommages sont d'autant plus importants que la réaction d'un radical avec un non radical conduit rapidement à une réaction en chaîne et que seule une réaction entre deux radicaux peut conduire à une (ou des) espèce(s) non radicalaire(s). Le NO^\bullet , par exemple, réagit dans ce sens avec la plupart des radicaux libres issus du stress oxydant d'où ses propriétés de « détoxification ».

a) Peroxydation lipidique

Parmi les lipides membranaires, les phospholipides sont les plus abondants. La partie hydrophobe des phospholipides est constituée d'acides gras saturés ou insaturés. Les acides gras polyinsaturés sont les plus sensibles aux attaques radicalaires. Leur peroxydation, spontanée ou catalysée par la peroxydase, conduit à la formation d'hydroperoxydes instables responsables de la diminution de la fluidité membranaire ou de la solidité de la barrière membranaire. Ces dommages peuvent être initiés par l'oxygène singulet et par l'ozone mais le radical hydroxyle HO^\bullet est la principale espèce capable d'attaquer les phospholipides membranaires.

Ce mécanisme est initié par l'attaque d'un groupe méthylène ($-\text{CH}_2-$) par une ROS/RNS dont la réactivité est suffisante pour arracher un hydrogène H^\bullet . Le radical alors formé par abstraction de cet hydrogène se réarrange en diène conjugué. Sa réaction directe avec l'oxygène conduit à la formation d'un radical peroxyde qui, en arrachant un hydrogène à un phospholipide voisin, propage la peroxydation (*Figure C-1*).

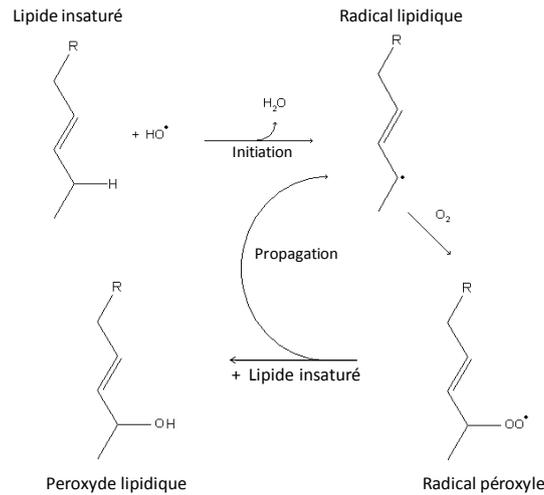


Figure C-1 : Mécanisme de peroxydation lipidique.

Pour minimiser l'énergie nécessaire au maintien des peroxydes polaires dans un environnement hydrophobe, les phospholipides se réarrangent afin de les exposer à un environnement aqueux. Ces réarrangements mènent à une désorganisation de la membrane qui n'est alors plus capable de conserver sa cohésion. Son rôle de compartimentation n'est alors plus assuré. La cellule devient « poreuse » et peut même aller jusqu'à se vider de son contenu et ainsi mourir rapidement.

b) Oxydation des protéines

La fonction et l'activité des protéines sont profondément affectées par les altérations de leur structure complexe, particulièrement l'oxydation. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine²⁴⁷ et peut être responsable, d'une part, de transformations structurales au sein de la chaîne protéique (réticulations intra- ou intermoléculaires, coupures de liaison peptidique) ou d'autre part, de modifications de certains acides aminés par addition de produits issus de la peroxydation lipidique. En général, les protéines oxydées sont inactives par perte de leur fonction catalytique.

c) Oxydation de l'ADN

L'ADN constitue également une cible importante pour les attaques radicalaires. Il existe, au sein de la cellule, deux « types » d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, et les espèces produites étant très réactives, elles agissent en majorité au voisinage de leur lieu de production. Ainsi, l'ADN mitochondrial,

moins protégé car libre au sein du cytoplasme mitochondrial, est dix fois plus sensible à l'oxydation que l'ADN nucléaire.²⁴⁸ L'oxydation des bases de l'ADN est à l'origine de mutation, de fragmentation et de coupure de brins.

Chacune de ces réactions est potentiellement mutagène et peut soit bloquer la réplication de l'ADN soit entraîner la production de messages génétiques erronés qui provoquent une détérioration des cellules.

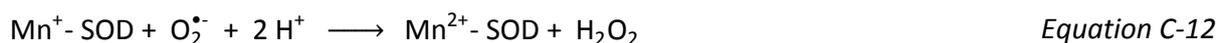
I.II.3. Régulation des ROS/RNS

Afin de maintenir le métabolisme de la cellule à un état redox normal, plusieurs systèmes de défense antioxydants ont été sélectionnés par la nature. Ils permettent de compenser ou réguler la production des ROS/RNS et ainsi assurer son contrôle. Pour ce faire, la cellule utilise de nombreuses enzymes de dégradation. Les superoxydes dismutases (SOD) dismutent l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Ensuite, la catalase dismute le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Globalement, cette cascade permet de recycler l'anion superoxyde produit de manière parasite en oxygène et en eau. De plus, les peroxydases catalysent la réduction des hydroperoxydes, et les protéases dégradent les protéines oxydées,... Il existe aussi différentes molécules (le glutathion, la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, le sélénium...) qui participent à la défense antioxydante. En outre, des modes de réparation de l'ADN endommagé sont mis en place afin de prévenir les risques de multiplication des cellules à ADN muté.

a) Systèmes de défense enzymatiques

Plusieurs enzymes sont capables de réduire fortement la concentration de certaines ROS/RNS. Notons que chaque système enzymatique est spécifique pour une espèce donnée, et concerne principalement l'élimination du radical superoxyde et des peroxydes.

La **superoxyde dismutase** (SOD) catalyse la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Elle existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a cependant été montré que la Cu/Zn-SOD est également présente dans l'espace intermembranaire.^{249, 250} Par exemple, l'action de Mn-SOD sur l'anion superoxyde peut s'écrire à l'aide des deux demi-équations globales suivantes :



La **glutathion peroxydase** (GPx) agit en association avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O . Lors de cette réaction, deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG).^{251, 252}



Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipides-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique.^{251, 253}

La **glutathion réductase**, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons.



En effet, la concentration cellulaire en glutathion global étant limitée, il est nécessaire de réduire constamment la forme oxydée pour que l'enzyme GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries. Notons que ce système est aussi impliqué dans la résistance aux médicaments par son rôle détoxifiant en fonctionnalisant les molécules indésirables par des groupes « GS – » ce qui permet leur extraction sélective par des canaux membranaires spécialisés. C'est en particulier le cas pour les dérivés quinoniques afin de réduire leurs effets liés aux « cycles futiles » (réduction de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 médiée par le couple quinone/hydroquinone).

La **catalase** est également responsable de l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2 . Elle est constituée de quatre chaînes polypeptidiques comportant chacune un groupe hème, sites actifs de l'enzyme. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupe hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O – O du peroxyde d'hydrogène, créant ainsi une molécule d'eau et un groupement Fe = O hautement oxydant :



Le groupement Fe = O peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour former du dioxygène :



Contrairement à l'enzyme GPx, l'affinité de la catalase pour H₂O₂ n'est élevée que lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues.^{251, 252} Néanmoins, elle s'inactive rapidement quand la concentration en H₂O₂ excède trop sa concentration moyenne intracellulaire (< 10 nmol.L⁻¹). Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges, et se trouve préférentiellement dans les peroxysomes (organites cytoplasmiques responsables de la dégradation du peroxyde d'hydrogène) et en plus faible quantité dans le cytosol.

b) Systèmes de défense non enzymatiques

Parmi les systèmes de défense antioxydants non enzymatiques, on distingue deux grandes catégories : d'une part les antioxydants d'origine cellulaire, comme les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c, et les vitamines E et C, et d'autre part, les antioxydants d'origine alimentaire, comme l'ascorbate, les caroténoïdes ou les polyphénols...

Les **oligoéléments** tels que le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels à la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. En effet, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique, de cuivre et de zinc, la catalase nécessite du fer et la GPx, de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent également avoir un rôle prooxydant (réactions de Fenton ou d'Haber-Weiss), et c'est en partie pour éviter ce rôle délétère que le fer est séquestré par des ligands très spécifiques lors de son transport dans les organismes.

Le **glutathion réduit** (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, réduisant ainsi la peroxydation lipidique.^{252, 254} Enfin, nous l'avons vu, il participe au marquage de composés exogènes toxiques en vue de leur recyclage par des pompes membranaires spécifiques.

Il a été décrit précédemment que les **ubiquinones**, jouent un rôle fondamental dans la production de ROS/RNS. Inversement, il a également été défini que la forme réduite « ubiquinol » agit comme antioxydant.²⁵² L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxydes. L'ubiquinone, quant à elle, est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS/RNS.²⁵⁴ En fait, il s'agit d'une dualité générale des polyphénols. D'une part, *via* leur capacité à transférer facilement deux atomes d'hydrogène (par l'intermédiaire d'un radical phenoxyphenol) ils contribuent à stopper les chaînes radicalaires.

Tandis que d'autre part, *via* leur capacité à transférer ces mêmes deux atomes d'hydrogène à un dioxygène, ils contribuent à la formation de H₂O₂ au sein de la plupart des compartiments cellulaires (cycles futiles).

Le **cytochrome c** présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron célibataire de O₂^{•-} produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron à la cytochrome c oxydase formant du cytochrome c oxydé et de l'eau.²⁵⁵ Néanmoins, lors d'un dysfonctionnement mitochondrial, il peut être libéré de son ancrage dans la membrane et conduire à la mise en place d'une cascade conduisant à la production de caspases dont la fonction est littéralement de découper la cellule concernée (apoptose).

Enfin, les **vitamines E** (α -tocophérol) et **C** (acide ascorbique) semblent participer de façon importante dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E, liposoluble, se fixe aux membranes et peut séquestrer les radicaux libres et alors empêcher la propagation des réactions de peroxydation lipidiques.^{254, 256} La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut capter directement O₂^{•-} et OH[•]. Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E.^{254, 256} A ces deux vitamines s'ajoutent de nombreux autres antioxydants non-enzymatiques (β -carotène, urate, glucose, bilirubine, taurine albumine...). Néanmoins, encore un fois, la vitamine C peut jouer un rôle négatif en réduisant le cuivre (II) en cuivre (I) lequel réagit avec le dioxygène afin de générer *in fine* de l'eau oxygénée. Ce processus, longtemps ignoré, semble déterminant dans la mise en place de la maladie d'Alzheimer et peut-être d'autres.

I.III. Etat de l'art de la détection des ROS/RNS

En raison de leur faible durée de vie et des infimes quantités libérées individuellement (femtomoles) par les cellules, la détection biologique de la libération des ROS/RNS en temps réel est très difficile. Afin d'obtenir une meilleure compréhension de ces systèmes complexes, le développement de techniques d'analyse sensibles et fiables est crucial. Les méthodes les plus couramment utilisées sont présentées ci-dessous.

I.III.1. Détection des ROS/NOS par chimiluminescence

La lumière produite par la décomposition de radicaux peut être mesurée directement, notamment pour les réactions impliquant l'anion peroxydite ou l'oxygène singulet, mais la faiblesse des signaux détectés nécessite un appareillage de très haute sensibilité. La

chimiluminescence est alors souvent utilisée en présence de sondes permettant, en réagissant avec les molécules d'intérêt, d'augmenter l'intensité du signal mesuré. Les sondes les plus utilisées sont le **luminol** et la **lucigénine**.^{257, 258} Mais, de par leur manque de spécificité, ces sondes permettent la détection globale des ROS/RNS sans les identifier. Ainsi, le luminol est souvent utilisé comme sonde à $O_2^{\bullet-}$, mais, des réactions concurrentes avec d'autres espèces réactives comme l'anion peroxyxynitrite, HO^{\bullet} et H_2O_2 en présence d'un catalyseur, conduisent également à une émission lumineuse.^{27, 257, 258} De même, bien que la lucigénine ne réagisse pas avec H_2O_2 à un pH inférieur à 8, la chimiluminescence mesurée est induite par $O_2^{\bullet-}$ et l'anion peroxyxynitrite. Enfin, l'oxydation monoélectronique du luminol²⁵⁸ ou de la lucigénine²⁵⁷ entraîne la formation de radicaux pouvant alors réagir avec l'oxygène moléculaire pour former $O_2^{\bullet-}$. En d'autres termes, ces sondes peuvent elles-mêmes être responsables de la production de radicaux libres qu'elles détecteront. Leur grand intérêt est donc plutôt de signaler la localisation des sources intracellulaires (par exemple les phagosomes chez les macrophages) que de caractériser la nature et la quantité des ROS/RNS produites.

La détection du monoxyde d'azote est également envisageable puisque ce dernier, en réagissant avec l'**ozone**, conduit à la formation de $NO_2^{\bullet*}$ à l'état excité selon la réaction suivante :



Son retour à l'état fondamental entraîne une émission de lumière dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en monoxyde d'azote. Bien qu'indirectement, le suivi de la chimiluminescence de la réaction permet de détecter des quantités de NO^{\bullet} très faibles, jusqu'à des concentrations de l'ordre de la $pmol.L^{-1}$.²⁵⁹ Cependant, la décomposition rapide de NO^{\bullet} en NO_2^- et NO_3^- nécessite une réduction préalable de ces espèces pour restaurer le NO^{\bullet} , par exemple en utilisant du vanadium (III).²⁶⁰ Néanmoins, bien que cette méthode permette la mesure de NO^{\bullet} dans les fluides biologiques *ex vivo* (urine, sérum sanguin...), la toxicité de O_3 la rend inutilisable pour l'analyse à l'échelle de la cellule unique.

I.III.2. Détection des ROS/NOS par fluorescence

Les méthodes de fluorescence, en particulier pour leur bonne sensibilité, sont des techniques courantes pour la détection des ROS/RNS.

Les sondes dites négatives, par définition initialement fluorescentes, perdent leur intensité en réagissant avec les ROS/RNS. Parmi ces sondes, la **resorufine**²⁵⁷ et la **scopoletine**²⁶¹ sont très utilisées pour la détection de H_2O_2 . Cependant, l'existence d'un fort bruit de fond dans ces conditions conduit généralement à utiliser des sondes positives (c'est-à-dire, celles dont le

produit d'oxydation est fluorescent).²⁵⁷ Parmi ces dernières, la **dihydrorhodamine 123** (DHR) et la **2,7-dichlorodihydrofluoreceine** (DCFH) sont les deux sondes les plus communes.²⁷ DCFH peut être oxydé en 2'7'-dichlorodihydrofluorecine (DCF) très fluorescente vers 525 nm lorsqu'elle est excitée à 488 nm.²⁵⁸ La dihydrorhodamine 123 est convertie en rhodamine 123, fluorescente. Elle s'accumule dans les mitochondries et sa fluorescence est observée à 529 nm lorsqu'elle est excitée à 505 nm.²⁶²

Cependant, les problèmes rencontrés en fluorescence sont globalement les mêmes que ceux rencontrés en chimiluminescence. Les sondes fluorescentes peuvent elles-mêmes conduire à la formation d'espèces réactives. Par exemple, DCFH traverse facilement la membrane cellulaire et peut être oxydée par les peroxydases et former un radical réagissant avec l'oxygène générant $O_2^{\bullet-}$.²⁷ De même, la rhodamine 123 est un générateur d'oxygène singulet.^{257, 259}

On notera que ces sondes présentent également de faibles spécificités envers les différentes ROS/RNS. DCFH peut être oxydée par $ONOO^-$, NO_2^{\bullet} , OH^{\bullet} , $CO_3^{\bullet-}$, les peroxydes, les alkyles,^{258, 262, 263} et DHR est sensible à $ONOO^-$, NO_2^{\bullet} , OH^{\bullet} et ClO^- , les composés hémiques et les espèces dérivées de différentes peroxydases.^{258, 262, 263} L'utilisation de sondes plus spécifiques est alors nécessaire. Des avancées ont permis de développer des sondes telles que MitoAR et MitoHR dont l'intensité de fluorescence augmente en quelques secondes en réagissant seulement avec OH^{\bullet} , $ONOO^-$ et ClO^- (pas de sensibilité envers H_2O_2 , NO^{\bullet} et $O_2^{\bullet-}$).²⁶⁴

I.III.3. Détection des ROS/NOS par réaction avec des biomolécules

L'anion peroxydite est capable de convertir la tyrosine en **3-nitrotyrosine** (3-NT).²⁵⁹ Alors responsable de la nitration de la tyrosine libre, il peut également agir au niveau des résidus tyrosine au sein des protéines. Cette réaction, pouvant être suivie par des méthodes d'immunohistochimie mais aussi par des techniques analytiques classiques (chromatographie, spectrométrie de masse), reflète donc la formation du peroxydite.²⁶⁵ Cependant, la 3-NT, bien que principalement issue de la nitration de la tyrosine par $ONOO^-$, peut également provenir d'autres mécanismes.^{27, 266} Par exemple, la réaction de la tyrosine avec les anions nitrite en milieu acide entraîne la formation de 3-NT et cette réaction peut devenir importante dans les zones acides telles que les bicouches lipidiques.²⁶³ L'acide hypochloreux HOCl peut également réagir avec les anions nitrite en formant $Cl-NO_2$, alors responsable de la nitration de la tyrosine en 3-NT.²⁶³

Les protéines Fer-Soufre sont également des cibles pour les ROS/RNS. C'est le cas, par exemple de l'**aconitase**, possédant dans sa structure un cluster fer-soufre [4Fe-4S], catalysant

l'isomérisation du citrate en isocitrate. L'oxydation du cluster par $O_2^{\bullet-259}$ entraîne la perte d'un atome de fer et l'inactivation de l'enzyme.²⁶⁷ Ainsi, le suivi de l'activité de l'aconitase reflète la production de ces ROS/RNS. Cependant, cette détection manque encore de spécificité. En effet, l'oxydation de l'aconitase peut également être provoquée par $ONOO^-$,²⁶⁷ ou, mais moins significativement, par O_2 et H_2O_2 .^{259, 263, 268}

Comme mentionné précédemment, le **glutathion** sous sa forme réduite (GSH) intervient dans la régulation du stress oxydant. Son oxydation en GSSG par les peroxydes conduit à leur élimination.²⁵¹ Le suivi du rapport des concentrations du GSH et du GSSG, peut être déterminé par CLHP (Chromatographie Liquide Haute performance) ou par électrochimie selon l'équation de Nernst avec $E^0 = -264 \text{ mV vs ESH à pH} = 7,4$ (les valeurs de potentiels sont en mV).

$$E = E^0 + 30 \log \frac{[GSSG]}{[GSH]^2} \quad \text{Equation C-18}$$

Le suivi de la réaction apporte alors des informations sur la formation des peroxydes, mais, le GSH joue également un rôle dans la réduction d'autres ROS comme le $NO^{\bullet 242}$ et le maintien des concentrations de l'ascorbate et de l' α -tocopherol dans leurs formes réduites.²⁶³

I.III.4. Détection des ROS/NOS par réaction de Griess

Le monoxyde d'azote NO^{\bullet} est très instable en milieu biologique où il conduit rapidement à la production d'anions nitrite et nitrate. La détection du NO^{\bullet} peut alors être réalisée de manière indirecte grâce au dosage des espèces résultant de cette décomposition.²⁵⁹ En 1879, Peter Griess a établi qu'en conditions acides, les anions nitrite réagissaient avec l'acide sulfanilique pour former un cation diazonium qui, associé à l' α -naphthylamine, forme un chromophore. A l'heure actuelle, la sulfanimide et la N-naphthyl-éthylènediamine ont classiquement remplacé les réactifs de Griess originaux. La sonde se formant alors est pourpre et son absorbance, mesurée à 543 nm ,²⁶⁹ permet la quantification de NO_2^- jusqu'à des concentrations de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.²⁷⁰ Néanmoins, l'origine des flux de NO^{\bullet} et leur cinétique sont complètement obliérées.

L'anion nitrate NO_3^- ne réagit pas directement et, pour être mesuré, doit subir une réduction préalable en NO_2^- . Sa conversion est généralement effectuée en présence de cadmium²⁶⁹ (Equation C-19) ou catalysée par la nitrate réductase utilisant le cofacteur NADPH^{259, 269} (Equation C-20) :



Cette technique présente quelques limites. Ainsi, l'inconvénient du cadmium est sa toxicité, responsable de la mort cellulaire.²⁷¹ Cet outil analytique ne peut donc pas être utilisé sur cellule vivante. Par ailleurs, NADPH interfère avec la réaction de Griess.^{259, 270} L'excès de NADPH doit alors être éliminé lors de l'utilisation de la seconde réaction. Aussi, la diazotation de NO[•] est 100 fois plus efficace que celle des anions nitrite. Sa présence entraîne alors une surestimation de la concentration en NO₂⁻. Enfin, cette technique ne permet pas de mesure en temps réel et n'apporte pas d'information sur la nature des espèces intermédiaires ni sur leur origine.

I.III.5. Détection des ROS/NOS par résonance de spin électronique (RSE)

La résonance de spin électronique est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique permettant la détection directe des espèces paramagnétiques caractérisées par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés tels que les radicaux. En présence d'un champ magnétique extérieur, les niveaux d'énergie de spin électronique se séparent et s'alignent de manière parallèle ($m_s = -\frac{1}{2}$) ou antiparallèle ($m_s = +\frac{1}{2}$) au champ magnétique appliqué (m_s : nombre quantique magnétique). Un électron non apparié peut alors transiter entre ces deux niveaux. Cette transition est décrite par l'équation suivante :

$$\Delta E = h\nu = g_e \mu_B B_0 \quad \text{Equation C-21}$$

où g_e est le facteur de Landé, reliant le moment magnétique au moment cinétique de l'état quantique de l'électron considéré, μ_B , le magnéton de Bohr ($\mu_B = 9,2741 \cdot 10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$) et B_0 , la valeur du champ magnétique.

Bien que cette technique permette la détection directe et spécifique des radicaux libres, seuls les radicaux suffisamment stables pour s'accumuler peuvent être mesurés.^{257, 258} Les espèces paramagnétiques plus instables peuvent être détectées à travers l'utilisation de piègeurs, qui en réagissant avec les radicaux fortement réactifs, forment des espèces radicalaires plus stables dont le spectre RPE est généralement caractéristique du radical piégé. Les piègeurs les plus communément utilisés sont des nitrones, des composés nitroso ou des complexes métalliques, tels que le 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO),²⁵⁷ le N-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN),²⁵⁷ le 5-ethoxycarbonyl-5-méthyl-1-pyrroline N-oxide (EMPO)²⁷² et le complexe dithiocarbamate-Fe(II).^{259, 273}

Un des inconvénients de cette technique est que le produit résultant du piégeage peut rapidement être éliminé dans les environnements biologiques. Par exemple, l'ascorbate réduit DMPO-OH[•] en une espèce silencieuse en RSE.²⁵⁸ Enfin, malgré une bonne sensibilité, cette

technique ne permet pas la différenciation des différents radicaux lorsque leur concentration reste trop faible.²⁵⁷ Elle a, en outre, une faible résolution spatiale et est ainsi peu adaptée à la détection sur cellule unique.

I.III.6. Conclusion

Comme mentionné précédemment, de par leur très court temps de vie, les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont difficilement détectables ou quantifiables en temps réel. De nombreuses méthodes sont cependant à disposition, mais parmi celles présentées précédemment, la majorité implique une approche indirecte et nécessite par ailleurs l'utilisation de composés toxiques les rendant difficilement utilisables *in vivo*. De plus, l'utilisation de sondes peut être à l'origine de nouvelles ROS/RNS conduisant à leur surestimation de leurs signaux de détection. Enfin, la limitation majeure de ces techniques est leur manque de spécificité. Pour pallier ces inconvénients, l'approche électrochimique permettra la détection directe et en temps réel de certaines ROS/RNS avec la possibilité, liée aux potentiels de détection, de différencier les espèces mises en jeu. Cependant, à son niveau de développement actuel, cette approche reste cantonnée à la détermination de flux de ROS/RNS émis extracellulairement sans que leur origine intracellulaire puisse être démontrée expérimentalement.

I.IV. Détection électrochimique des ROS/RNS : principes et limites

Parmi les différentes techniques électrochimiques à disposition, l'ampérométrie est souvent préférée pour les mesures sur cellule unique en particulier en raison de son excellente limite de détection et de son immunité aux courants capacitifs. En effet, même si la quantité de molécules produites par une cellule est faible (de l'ordre de la femtomole), l'utilisation d'UME en configuration « synapse semi-artificielle » permet, comme nous l'avons vu, de confiner les espèces émises par la cellule et rend ces quantités, à travers une concentration supérieure à la $\mu\text{mol.L}^{-1}$, parfaitement mesurables.

I.IV.1. Détection électrochimique des ROS/RNS

La détection électrochimique des ROS/RNS est principalement limitée par 3 paramètres :

- la durée de vie des espèces, qui peut être trop courte pour permettre leur diffusion depuis le site de production au sein de la cellule jusqu'à la surface de l'électrode.

- le potentiel d'oxydation des espèces : certaines espèces ne sont pas électroactives. Quand elles les sont, leurs potentiels d'oxydation ne doivent pas être trop proches pour que leurs flux individuels soient séparables et quantifiables
- la quantité de molécules produites doit être suffisante pour aboutir à des concentrations détectables en électrochimie.

A titre d'exemple, le **radical hydroxyle OH^\bullet** est une des espèces les plus réactives impliquées dans le stress oxydant. Il peut réagir à une vitesse comparable à sa vitesse de diffusion avec presque toutes les biomolécules de son voisinage, telles que les constituants de la membrane.²⁷⁴ Sa durée de vie très courte, de l'ordre de la nanoseconde, l'empêche donc d'atteindre la surface de l'électrode et d'être détecté électrochimiquement dans le cas échéant où il serait produit. Le cas des anions **nitrites NO_2^-** et des **nitrites NO_3^-** présente également certaines difficultés, ces deux espèces s'oxydant à des potentiels très élevés. Il a cependant été montré que les anions nitrites pouvaient être détectés sur UME de carbone platiné à un potentiel de + 850 mV vs ECSS. En raison d'un potentiel d'oxydation trop élevé, les anions nitrate ne peuvent être détectés qu'indirectement en procédant en premier lieu à leur réduction en anions nitrite, ce qui est impossible *in vivo* du fait de la réduction préalable de l'oxygène dont la concentration ($0,23 \text{ mmol.L}^{-1}$) surclasse largement celles des ROS/RNS et qui par ailleurs imposerait de soumettre la cellule à un flux d'eau oxygénée trop important biologiquement.

Cependant, selon le type d'électrode utilisé, plusieurs espèces importantes, telles que NO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ou ONOO^- , peuvent être détectées. Chacune de ces espèces est électroactive à un potentiel donné et plusieurs stratégies peuvent être mises en place pour déterminer sélectivement les contributions de ces différentes espèces lors de la production de ROS/RNS. Parmi les différentes espèces mentionnées précédemment, certaines peuvent être détectées sur des surfaces de carbone, de platine ou d'or. Lors de la détection ampérométrique du mélange, toutes les espèces s'oxydant à un potentiel égal ou inférieur au potentiel fixé vont être détectées sans être différenciées. Une des stratégies envisagées pour améliorer la spécificité de la détection électrochimique est la modification de la surface de l'électrode.

a) Détection de $\text{O}_2^{\bullet-}$

Il est possible de détecter l'anion superoxyde directement sur UME de carbone nu.²⁷⁵ Lors de la réaction xanthine/xanthine oxydase, la production de $\text{O}_2^{\bullet-}$ est accompagnée d'acide urique. La polarisation de l'électrode de carbone à 0,12 V vs ECS permet d'éviter l'oxydation de l'acide urique (qui s'oxyde à des potentiels plus anodiques, de l'ordre de 0,20 V vs ECS). Néanmoins, il est encore possible que d'autres espèces puissent interférer avec le signal de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Par ailleurs,

l'utilisation de ce type d'électrode *in vivo* est difficile. Suite à une pollution de la surface de l'électrode par des protéines présentes dans les milieux biologiques (« fouling » ou « biofouling »), sa sensibilité peut être fortement réduite.²⁷⁶ Ainsi, une des stratégies mises en œuvre pour obtenir une bonne spécificité vis-à-vis de $O_2^{\bullet-}$ tout en améliorant la sensibilité du capteur est l'utilisation d'électrodes modifiées à base **d'enzymes**.

Parmi les réactions enzymatiques, la dismutation catalysée par la **superoxyde dismutase** (SOD) de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène peut être utilisée pour quantifier la production d' $O_2^{\bullet-}$ par une cellule. Par exemple, une électrode de platine, recouverte d'un film de polypyrrole conducteur, contenant de la SOD est polarisée à 0,7 V vs SCE. Dans ce cas, l'anion superoxyde produit pénètre dans le film de polypyrrole où il est dismuté par la SOD. Le peroxyde d'hydrogène résultant de cette réaction est alors oxydé à la surface de l'électrode.²⁷⁷ Outre H_2O_2 essentiellement produit par la cellule, de nombreuses espèces, comme les catécholamines, le glucose, l'acide ascorbique... peuvent également être oxydées à ce potentiel. Cependant, il a été montré qu'en présence de ces dernières espèces à des concentrations supérieures aux conditions physiologiques, le courant de base n'est pas modifié.^{277, 278} Ce type d'électrode semble donc spécifique à l'anion superoxyde en l'absence de H_2O_2 .

De la même façon, une électrode de platine modifiée par un gel contenant de la SOD recouvert d'une membrane à dialyse, jouant un rôle d'exclusion stérique, puis d'une membrane en Téflon, considérée comme imperméable à H_2O_2 , a permis d'une part de réduire les interférences dues à d'autres molécules oxydables et d'autre part, de discriminer le peroxyde d'hydrogène généré dans le gel de celui résultant de la dismutation spontanée de $O_2^{\bullet-}$ au sein de la solution.²⁷⁹

Par ailleurs, un capteur à deux voies a également été élaboré pour la détection simultanée de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. Ce capteur est constitué d'une électrode de carbone vitreux dont la surface a été modifiée par un film de polypyrrole contenant de la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase) puis un film contenant de la superoxyde dismutase. L'anion superoxyde pénètre dans la première couche dans laquelle il est dismuté en peroxyde d'hydrogène par la SOD. Le peroxyde d'hydrogène alors produit entre dans la seconde couche où il est réduit par la peroxydase. Le potentiel de cette électrode, de l'ordre de 0 V vs WO_3 , conduit à la régénération de la peroxydase oxydée.²⁸⁰

D'autres capteurs **non-enzymatiques** ont également été développés. C'est le cas par exemple des électrodes recouvertes par une couche d'**immunoglobuline**.²⁸¹ Lors de l'étude de la production de $O_2^{\bullet-}$ chez les neutrophiles, cette couche a permis une forte adsorption de ces cellules à la surface d'électrodes millimétriques de graphite²⁸² et d'électrodes micrométriques d'or.²⁸³ Pour ces différentes électrodes, les variations de courant sont de l'ordre de quelques

picoampères, mais le courant capacitif, de seulement 0,1 picoampère rend possible la détection des signaux.

L'utilisation d'un dépôt de **ferricytochrome c** à la surface d'une électrode d'or est quant à elle, particulièrement efficace.²⁸⁴⁻²⁸⁶ Le potentiel de l'électrode de travail est fixé au potentiel d'oxydation du fer (II) en fer (III) soit 0,1 V vs Ag/AgCl.²⁸⁵ Dans ce cas, l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, en arrivant à la surface de l'électrode, vient réduire le fer (III) du cytochrome c en fer (II), immédiatement reconverti en fer (III) à la surface de l'électrode.²⁸⁷ L'effet catalytique du cytochrome c permet une sensibilité élevée de l'ordre de $2 \text{ pmol.L}^{-1} \cdot \text{pA}^{-1}$.^{286, 288} Ce potentiel d'oxydation est suffisamment faible pour éviter d'éventuelles interférences dues aux espèces présentes en milieux biologiques telles que l'acide urique ou l'acide ascorbique. En effet, même s'il est connu que le cytochrome c peut être réduit par une grande quantité d'espèces, ce type d'électrode n'est pas sensible à l'acide ascorbique jusqu'à des concentrations de 100 mmol.L^{-1} .^{284, 285} De même, aucun changement dans la réponse de l'électrode n'est observé en présence de catalase, ce qui permet d'éliminer la possibilité de la réduction, improbable à ce potentiel, du cytochrome c par H_2O_2 qui aurait conduit à une surestimation de la réponse.²⁸⁵ Cependant, la détection simultanée du NO^{\bullet} et du $O_2^{\bullet-}$ a montré que suite à une stimulation appropriée, seul NO^{\bullet} est détecté dans un premier temps. Ensuite, quand la quantité de NO^{\bullet} commence à diminuer, $O_2^{\bullet-}$ devient détectable. Il semblerait alors que la quantité de NO^{\bullet} produite initialement réagisse avec l'anion superoxyde pour former l'anion peroxinitrite $ONOO^-$, conduisant alors à une sous-estimation de la quantité de $O_2^{\bullet-}$ (et de NO^{\bullet}) produit par la cellule. De plus, $ONOO^-$ formé peut réoxyder le ferricytochrome c et conduire à une surestimation de la quantité d'anions superoxyde produite, ce qui rend donc ces mesures peu fiables.²⁸⁹ Cependant, afin d'éviter ces interférences, des piègeurs d'espèces réactives peuvent être utilisés.²⁵⁹

L'utilisation d'une électrode de carbone modifiée par un polymère conducteur contenant le complexe **porphyrine-fer** permet également de détecter la production de l'anion superoxyde. Sur le même principe que les électrodes modifiées avec du cytochrome c, l'anion superoxyde vient réduire le fer de la porphyrine qui est immédiatement oxydé à l'électrode.²⁹⁰

Néanmoins, quel que soit le capteur utilisé, il faut noter que la réaction de dismutation de $O_2^{\bullet-}$ est tellement rapide que les flux détectés, lorsqu'il s'agit bien de $O_2^{\bullet-}$, correspondent à des quantités très inférieures à celles produites. En effet, on se doit de considérer, par l'intermédiaire d'un couplage réaction/diffusion, la disparition de l'anion superoxyde *via* sa dismutation (cf. *Equation C-6*), caractérisée par sa vitesse de disparition (*Equation C-22*) ainsi que sa diffusion à partir de son point d'émission, caractérisée par la seconde loi de Fick (à une dimension) (*Equation C-23*). On pose par ailleurs $C = [O_2^{\bullet-}]$.

$$v = - \frac{\partial[\text{O}_2^{\bullet-}]}{2\partial t} = k[\text{H}^+][\text{O}_2^{\bullet-}]^2 = k'C^2 \quad \text{Equation C-22}$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{Equation C-23}$$

A l'état stationnaire :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - 2k'C^2 = 0 \quad \text{alors} \quad D \frac{d^2 C}{dx^2} = 2k'C^2 \quad \text{Equation C-24}$$

En posant $k'' = \frac{k'}{D}$, la résolution de cette équation donne : $\frac{1}{\sqrt{C}} = \sqrt{\frac{k''}{3}} x + \frac{1}{\sqrt{C^0}} \quad \text{Equation C-25}$

Si $D = 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ (soit $D = 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}$) et $k' = 5.10^5 \text{ mol}^{-1}.\text{L.s}^{-1}$ (soit $k' = 5.10^2 \text{ mol}^{-1}.\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) (ou $k' = 10^9 \text{ mol}^{-1}.\text{L.s}^{-1}$ dans le cas de la réaction catalysée), on a $k'' = 5.10^{11} \text{ mol}^{-1}.\text{m}$ (et, pour la réaction catalysée, $k'' = 5.10^{15} \text{ mol}^{-1}.\text{m}$). La figure C-2 représente alors l'évolution de C/C^0 pour plusieurs concentrations initiales dans le cas de la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ catalysée.

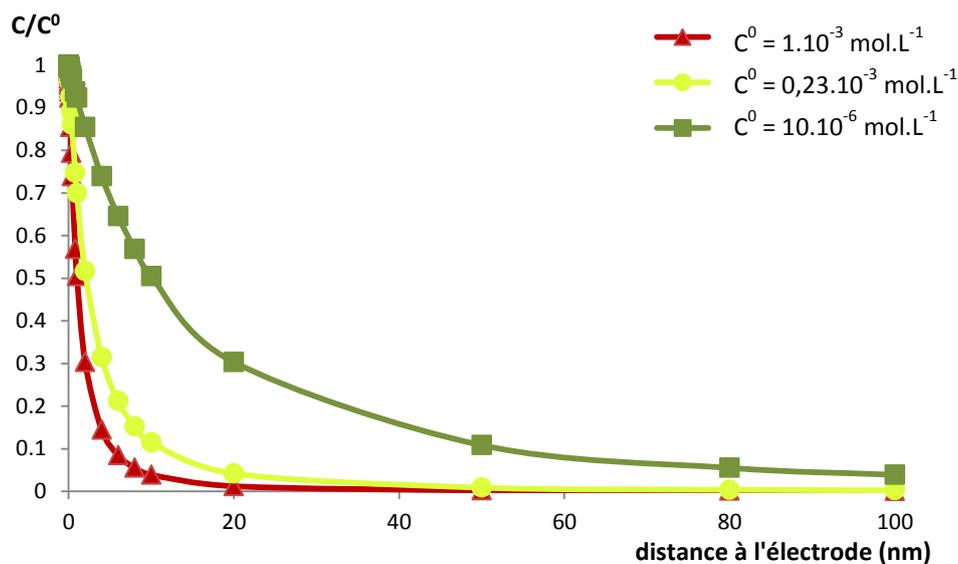


Figure C-2 : Evolution de C/C^0 de l'anion superoxyde en fonction de la distance par rapport au point d'émission pour une réaction catalysée.

Pour une concentration initiale de $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, l'anion superoxyde est décomposé à 50 % à 1 μm de son point d'émission si la réaction est spontanée et à 10 nm si elle est catalysée. Aussi, pour une concentration initiale de 1 mol.L^{-1} , 50 % de $\text{O}_2^{\bullet-}$ est décomposé à 32 nm de son point d'émission lors de la réaction spontanée et à 0,32 nm si elle est catalysée. (Tableau C-1)

C^0	Distance pour laquelle 50 % de l'anion superoxyde est dégradé à partir de l'émission pour une réaction non catalysée	Distance pour laquelle 50 % de l'anion superoxyde est dégradé à partir de l'émission pour une réaction catalysée
1 mol.L ⁻¹	32,1 nm	0,321 nm
1.10 ⁻³ mol.L ⁻¹	1,015 μm	10,15 nm
0,23.10 ⁻³ mol.L ⁻¹	2,12 μm	21,2 nm
10.10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹	10,15 μm	0,101 μm

Tableau C-1 : Distance pour laquelle 50 % de l'anion superoxyde est décomposé par rapport à son point d'émission pour une réaction catalysée ou non.

Ces résultats montrent en effet que même en plaçant l'électrode en contact avec la cellule, la quantité d'anion superoxyde détectée n'est pas nécessairement représentative de la quantité produite.

b) Détection de NO[•]

La détection du NO[•] dans les systèmes biologiques est extrêmement difficile d'une part à cause de sa faible durée de vie en milieu aérobie, et d'autre part à cause de sa faible concentration (de l'ordre du nanomolaire)²⁹¹. Les techniques électrochimiques sont alors très utilisées en particulier pour leur faible temps de réponse et leur bonne sensibilité.

Des capteurs à NO[•] de **type Clark** ont ainsi été commercialisés.²⁸⁶ Ils sont constitués d'un fil de platine, jouant le rôle d'électrode de travail et d'un fil d'argent jouant le rôle de référence ($\Delta E = 0,8$ V), insérés au sein d'un capillaire de verre poli et rempli d'une solution de chlorure de sodium (30 mmol.L⁻¹) et d'acide chlorhydrique (0,3 mmol.L⁻¹) se terminant par une membrane en néoprène (polychloroprène) perméable au gaz (*Figure C-3*).²⁹² Ce type d'électrode a une très bonne sensibilité (de l'ordre de la nmol.L⁻¹) et une très bonne sélectivité pour NO[•] puisqu'il ne laisse passer que les gaz. Cependant, la large extrémité de cette électrode (initialement 250 μm et plus récemment réduit à 50 μm²⁹³) ne permet ni un positionnement précis ni une mesure *in situ* dans des tissus ou sur une cellule unique isolée en culture. Par ailleurs, son temps de réponse est long (de l'ordre de la seconde) par rapport aux changements rapides de concentration au sein des systèmes biologiques. Enfin, les électrodes de type Clark sont susceptibles de subir une accumulation des produits d'oxydation du NO[•] dans la solution interne, pouvant eux-mêmes réagir avec NO[•]. La réponse en courant n'est donc plus linéaire pour des concentrations supérieures à 1 mmol.L⁻¹.²⁹⁴

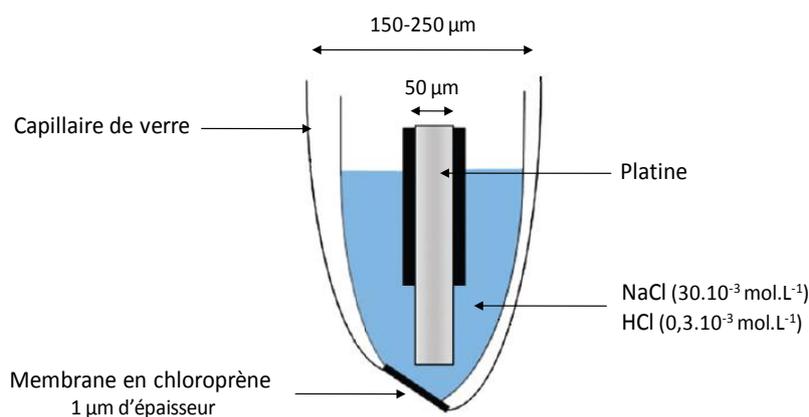


Figure C-3 : Electrode spécifique au NO^\bullet de type Clark, présentée par K. Shibuki.^{292, 295}

D'autres électrodes de platine ont alors été développées et une modification de leur surface a été nécessaire pour augmenter leur sélectivité envers le NO^\bullet . Par exemple, un dépôt dendritique de **noir de platine** peut être utilisé pour augmenter le nombre de sites électrocatalytiques sur la surface des électrodes et donc leur sensibilité.^{27, 296}

Une autre approche, basée sur l'utilisation d'une membrane déposée à la surface des électrodes a également été mise en place. Différents types de films peuvent être déposés à la surface d'électrode de carbone,^{27, 291, 294, 295, 297-299} d'or^{294, 295} ou de platine.²⁹⁴⁻²⁹⁷ Le maximum de sensibilité de l'électrode est atteint lorsque son potentiel est fixé à 0,7 V vs Ag/AgCl.¹² Cependant et à nouveau, de nombreuses espèces (acide ascorbique, dopamine, acide urique, nitrite...) présentes dans les milieux biologiques s'oxydent dans cette gamme de potentiel et viennent parasiter le signal électrochimique recueilli. Le **Nafion®**, chargé positivement, est souvent utilisé pour créer une barrière électrostatique empêchant l'accès aux anions tels que NO_2^- à l'électrode.^{291, 294, 298, 299} D'autres types de films comme la o-phenylène diamine,^{291, 299, 300} le polypyrrole,^{278, 300} l'acétate de cellulose,²⁹⁷ la polyméthylcellulose³⁰⁰, ou encore la phtanocyanine tétrasulfonée²⁹⁹ jouent un rôle d'exclusion stérique, empêchant l'accès à l'électrode aux grosses molécules telles que l'acide ascorbique tout en laissant le NO^\bullet diffuser.

Par ailleurs, le dépôt de complexe métallique à la surface de l'électrode permet non seulement de contrôler sa topologie, mais aussi d'augmenter sa sensibilité.²⁹⁵ Par exemple, l'effet catalytique de complexes à base de **porphyrine** (de centre métallique Ni, Cu, Co ou Mn) permet de détecter des concentrations de NO^\bullet jusqu'à quelques nanomolaires.^{275, 290, 291, 295, 297, 298} Le mode d'action de la porphyrine, très complexe, n'est pas entièrement compris. Il est possible qu'elle permette une modification de la surface de l'électrode par l'intermédiaire de la complexation de son centre métallique avec une molécule de NO^\bullet , sans avoir un comportement chimique particulier. Elle permet en tout cas, le déplacement du potentiel d'oxydation du NO^\bullet à environ 0,6 V vs ECS et augmente l'amplitude du courant d'un facteur 2 à 3.^{295, 300}

c) Détection de H₂O₂

Contrairement aux molécules précédemment citées, le peroxyde d'hydrogène est relativement stable *in vitro* dans le domaine de concentration (< mmol.l⁻¹) qui nous concerne. Sa durée de vie *in vivo* dépend quant à elle, de sa réaction potentielle avec le fer (II) (réaction de Fenton) ou avec la catalase qui entraîne sa dismutation. Sa détection électrochimique est relativement difficile sur électrodes de carbone ou de platine nus, son oxydation conduisant à la formation d'oxydes et de peroxydes responsables de signaux instables et donc peu reproductibles.

Une façon de pallier ce manque de stabilité est l'utilisation de **protéines** à la surface de l'électrode. Aussi, l'utilisation de nanotubes de carbone adsorbés à la surface de l'électrode permet de faciliter le transfert électronique entre la protéine et la surface de l'électrode. Différents matériaux d'électrodes tels que le carbone^{301, 302} ou l'ITO³⁰³ ainsi que différentes protéines (cytochrome c,^{302, 303} catalase,³⁰¹ peroxydase de raifort³⁰⁴ ...) sont couramment utilisés. Ces capteurs peuvent alors être utilisés en réduction (- 0,2 vs ECS) ou en oxydation (0,2 à 0,3 V vs ECS) pour détecter H₂O₂. Cependant, le signal ampérométrique de l'oxydation du peroxyde d'hydrogène peut lui aussi subir des interférences des espèces telles que l'acide ascorbique ou la dopamine. Enfin, on a vu précédemment que pour les études en milieu biologique, la réduction des espèces est difficilement envisageable, l'oxygène dissous dans le milieu venant parasiter le signal détecté.

Dans notre laboratoire, du fait de nos contraintes temporelles, le choix a été fait de détecter l'oxydation de H₂O₂ sur électrode de carbone platiné, son oxydation ayant alors lieu à 0,25 V vs ECSS. Le dépôt de platine permet d'une part de stabiliser les signaux recueillis, et d'autre part, par sa nature dendritique, d'augmenter considérablement la surface active de l'électrode et le nombre de sites électrocatalytiques, palliant ainsi une désactivation globale de l'électrode.³⁰⁵ On obtient ainsi une très grande sensibilité, permettant d'atteindre une limite de détection de l'ordre de quelques nmol.L⁻¹.

d) Détection de ONOO⁻

Plusieurs stratégies, toujours basées sur l'utilisation d'électrodes modifiées, sont couramment utilisées pour détecter l'anion peroxynitrite, espèce extrêmement instable, comme déjà mentionné précédemment.

Par exemple, Koh et al. ont déposé un complexe de manganèse (manganèse-[poly-2,5-di-(2-thienyl)-1Hpyrrol]-1-(p-benzoic acid)) sur une électrode de platine à la surface de laquelle, la

réduction de ONOO^- a lieu à 0,2 V vs Ag/AgCl.³⁰⁶ Afin d'éviter les interférences, l'ajout d'un film de polyéthylène imine, chargé positivement, empêche l'accès à l'électrode des autres anions et la passivation de cette dernière par des protéines des milieux biologiques. Par ailleurs, un dépôt de tétraaminophthalocyanine de manganèse (II) permet d'étudier la réduction de ONOO^- à 0,0 V vs Ag/AgCl bien que le mécanisme de la réaction reste encore à caractériser. Travailler à ce potentiel permet d'éviter les interférences des espèces présentes dans les milieux biologiques (qui s'oxydent en général vers 0,2 V vs Ag/AgCl). L'ajout d'un film de poly(4-vinylpyridine) empêche l'accès aux autres anions.³⁰⁷ On notera que des électrodes modifiées avec de la porphyrine sont également utilisées. Par exemple, un dépôt de Mn(II)-2,2-paracyclophénylporphyrine permet la détection de ONOO^- à - 0,35 V vs Ag/AgCl.³⁰⁸ Globalement, le potentiel de réduction du ONOO^- à la surface de ce type d'électrode est trop faible pour éviter l'interférence de la réduction de l'oxygène dissous ou du peroxyde d'hydrogène *in vivo*.

Une autre stratégie, basée sur l'utilisation d'une électrode constituée d'un film de mercure, permet la détection de ONOO^- à - 0,1 V vs Ag/AgCl. Dans un premier temps la surface de l'électrode est oxydée par ONOO^- en HgO. La réduction de HgO en Hg (0) est alors responsable du pic de courant permettant de doser ONOO^- .³⁰⁹ Cependant, pour assurer la stabilité de ONOO^- , cette approche ne peut être utilisée qu'en conditions alcalines et n'est donc pas applicable à la détection du peroxynitrite en milieu biologique neutre.

Plus récemment, une nouvelle approche électrochimique pour détecter ONOO^- dans les systèmes biologiques sans être gêné par les interférences a été développée par F. Bedioui et al. Cette approche est basée sur le fait qu'à un pH donné, la quantité relative de ONOOH par rapport à ONOO^- peut être calculée à partir du pKa du couple. Ainsi, à pH = 7,1, la quantité de ONOOH maximale attendue représente environ 33% de la quantité totale de peroxynitrite. Ainsi, la présence de ONOO^- peut être détectée spécifiquement sur une électrode d'or à disque tournant pour des potentiels allant de -0,5 à + 0,7 V vs ECS soit à travers la réduction de ONOOH , soit via l'oxydation directe de ONOO^- , l'optimum de détection se situant à une valeur de - 0,1 V vs ECS.³¹⁰ Dans le cadre d'une évolution de cette approche, la détection simultanée du NO^\bullet et de ONOO^- a pu être réalisée sur un réseau d'électrodes. L'utilisation d'une électrode d'or polarisée à - 0,1 V vs Ag/AgCl prévient toutes interférences des espèces telles que la dopamine, le peroxyde d'hydrogène, l'acide ascorbique, les nitrites ou le NO^\bullet et est donc adaptée en principe pour le suivi en temps réel de la production de ONOO^- *in vivo*.³¹¹

e) Conclusion

L'électrochimie, et plus particulièrement l'approche ampérométrique, constitue une voie analytique parfaitement adaptée à la détection des ROS/RNS dans le cadre de nos objectifs, notamment de par sa sélectivité en potentiel. Cependant, le souci d'augmenter sa sensibilité et de limiter les interférences conduit la plupart du temps à utiliser des électrodes « modifiées » au détriment du temps de réponse.

Ainsi, différentes modifications sont couramment utilisées pour offrir un effet catalytique et/ou déplacer les potentiels d'oxydation des espèces (noir de platine, systèmes enzymatiques), ou pour jouer le rôle d'une barrière sélective (membrane échangeuse d'ion ou à exclusion stérique) permettant alors de se prémunir des interférences potentielles dues aux espèces présentes en milieu biologique.

Il est alors possible de combiner plusieurs types de modification de la surface active, mais plus l'épaisseur des films et/ou plus le nombre de couches augmentent, plus le temps de réponse de l'électrode augmente. Ce dernier point peut alors poser un problème lorsque la durée de vie des espèces détectées est plus courte que leur temps de diffusion jusqu'à la surface de l'électrode ou pour la détection dynamique et quantitative (facteur de collecte de 100%) d'émissions très rapides.

I.IV.2. Détection des ROS/RNS par ampérométrie à potentiel constant

La stratégie développée au laboratoire pour détecter les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote est basée sur la configuration **synapse « semi-artificielle »** (cf. *Partie A : Utilisation des UME pour la détection de molécules libérées par une cellule unique*).

L'utilisation d'**UME de carbone platiné** (cf. *Partie D : Partie expérimentale ; p.211*) permet de suivre en temps réel la production des ROS/RNS. Ce type d'électrode offre une réponse linéaire en courant par rapport à la concentration entre $100 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ et $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et un temps de réponse inférieur (de l'ordre de la centaine de milliseconde) à la cinétique du processus biologique étudié (de la seconde lors de stress mécanique jusqu'à plusieurs heures en cas de stimulation biochimique).³¹² On notera également que la sensibilité peut être adaptée à la concentration des espèces à détecter en augmentant la charge coulométrique lors du dépôt du noir de platine à la surface de l'électrode de carbone. Mais la contrepartie de l'augmentation de ce dépôt est aussi celle du bruit capacitif. Il s'agit donc de trouver, en fonction de l'expérience, le bon compromis entre la sensibilité recherchée et le rapport signal sur bruit.

a) Identification des espèces impliquées dans la réponse cellulaire

Les premières études réalisées au laboratoire dans le but de détecter les espèces dérivées de $O_2^{\bullet-}$ et NO^{\bullet} ont été réalisées sur les fibroblastes en culture issus de peau humaine. Expérimentalement, suite à un stress mécanique responsable d'une dépolarisation locale de la membrane cellulaire, les systèmes enzymatiques localisés sont activés et les cellules produisent des ROS/RNS. Il a alors été montré que la mesure ampérométrique de ces espèces à un potentiel ne suffisait pas pour caractériser quantitativement la réponse globale de la cellule. En effet, en présence de catalase (responsable de la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2), l'intensité du courant mesuré diminue dramatiquement mais ne retourne pas à zéro. Le peroxyde d'hydrogène semble être l'espèce majoritairement libérée, mais environ 10 % de la réponse globale correspond à d'autres ROS/RNS,³¹³ et cette fraction dépend de la distance cellule/électrode.

Il a alors été nécessaire d'identifier ces espèces et d'établir leur « signature électrochimique ». Pour ce faire, des mesures ampérométriques à différents potentiels ont été réalisées (de +175 à +850 mV vs ECSS, tous les 50 mV) sur un nombre statistiquement significatif de mesures pour s'affranchir de la variabilité cellulaire. L'étude des variations de flux maximaux d'espèces détectées en fonction du potentiel imposé a permis de reconstruire un voltamogramme stationnaire présentant 3 vagues électrochimiques (notées I., II. et III. sur la figure C-3). La comparaison de ce voltamogramme avec les voltamogrammes stationnaires des espèces supposées impliquées dans la réponse a permis d'identifier les quatre espèces participant à la réponse cellulaire (Figure C-4).^{314, 315}

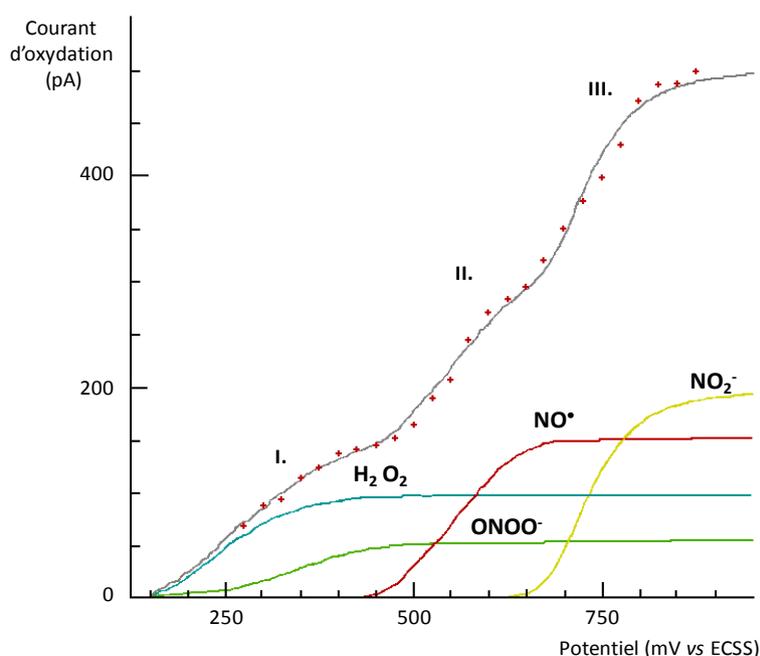


Figure C-4 : Comparaison du voltamogramme reconstruit à partir du flux maximal d'espèces détecté à différents potentiels et des voltamogrammes obtenus pour H_2O_2 ($1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), $ONOO^{\bullet-}$ ($1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), NO_2^- ($4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) et NO^{\bullet} ($19 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).

L'existence de trois vagues électrochimiques d'oxydation dont les potentiels de demi-vague sont respectivement + 290, + 555 et + 730 ± 5 mV vs ECSS suggère la participation d'au moins trois espèces à la réponse d'un fibroblaste isolé. Les vagues II. et III. (Figure C-4) correspondent respectivement à celles de NO^\bullet et de NO_2^- . Elles présentent en effet le même potentiel de demi-vague et la même cinétique de transfert de charge que les voltamogrammes stationnaires *in vitro* de ces deux espèces pures dans des conditions expérimentales équivalentes (analyses dans le PBS avec les mêmes ultramicroélectrodes de carbone platiné que pour les mesures *ex vivo*).

La première vague, quant à elle, ne correspond pas directement à l'oxydation des molécules dont la présence est suspectée ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ONOO^-). La participation de l'anion superoxyde peut être exclue d'une part car son potentiel de demi-vague est plus cathodique que celui observé sur le voltamogramme reconstruit, et d'autre part car sa dismutation en H_2O_2 et/ou sa réaction avec NO^\bullet pour former ONOO^- sont beaucoup trop rapides pour lui permettre de diffuser jusqu'à l'électrode. Par ailleurs, l'oxydation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion peroxinitrite se produit dans des gammes de potentiel très proches, correspondant à la zone de potentiel de la première vague. Cette première vague ne correspond donc pas à l'oxydation d'une seule espèce, mais à la superposition des deux vagues d'oxydation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion peroxinitrite.³¹⁴

La comparaison du voltamogramme reconstruit à partir des mesures *ex vivo* avec ceux obtenus *in vitro* pour les espèces supposées impliquées, a donc permis de démontrer que la réponse cellulaire correspondait à l'émission simultanée des composés suivants : H_2O_2 , ONOO^- , NO_2^- et NO^\bullet .

b) Quantification des ROS/RNS libérées

La quantification de ces quatre espèces impliquées dans la réponse cellulaire oxydative de ces différents modèles cellulaires a été réalisée à partir de mesures ampérométriques à quatre potentiels différents sur les macrophages (+ 300, + 450, + 650 et + 850 mV vs ECSS). Les macrophages sont des cellules immunitaires qui phagocytent et inactivent les bactéries, virus et particules qui tentent de pénétrer l'organisme. Les voies d'inactivation sont enzymatiques mais aussi, et surtout, se font par production dans le phagosome (vacuole où est ingéré l'élément étranger) d'espèces oxydantes ou nitrantes dérivées de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et NO^\bullet .

Le courant ampérométrique mesuré à chaque potentiel (I_{300} ; I_{450} ; I_{650} et I_{850}) peut être exprimé comme une combinaison linéaire des réponses de chacune des quatre espèces, en supposant que ce sont les seules espèces électroactives libérées par la cellule au voisinage de l'électrode.

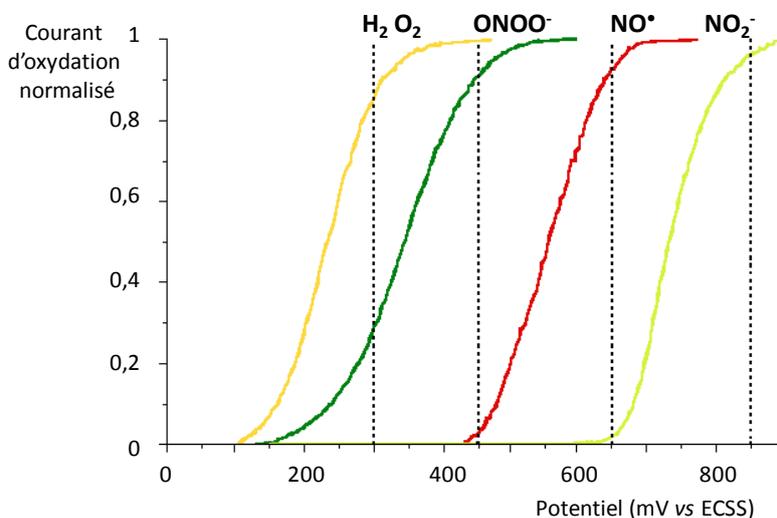


Figure C-5 : Voltammogrammes stationnaires normalisés des différentes espèces produites lors d'une réponse cellulaire de stress oxydant.

La figure C-5 présente les voltammogrammes normalisés des quatre espèces détectées. On peut constater que les vagues d'oxydation de NO^\bullet et NO_2^- sont bien séparées en potentiel des deux autres vagues. La différence entre I_{650} et I_{450} , ainsi que celle entre I_{850} et I_{650} , correspondent donc aux courants résultant respectivement de l'oxydation du NO^\bullet et du NO_2^- . En revanche, on ne peut pas déterminer les courants résultant de l'oxydation de H_2O_2 ou de ONOO^- de la même façon, car leurs vagues d'oxydation se recouvrent partiellement. Néanmoins, on remarque que les réponses I_{300} et I_{450} sont en fait des réponses cumulées de ces deux espèces, mais avec des poids différents du fait de la position relative des deux vagues. En résumé, nous pouvons poser les équations suivantes :

$$I_{850} = I_{\text{H}_2\text{O}_2} + I_{\text{ONOO}^-} + I_{\text{NO}^\bullet} + I_{\text{NO}_2^-} \quad \text{Equation C-26}$$

$$I_{650} = I_{\text{H}_2\text{O}_2} + I_{\text{ONOO}^-} + I_{\text{NO}^\bullet} \quad \text{Equation C-27}$$

$$I_{450} = 0,99 \times I_{\text{H}_2\text{O}_2} + 0,90 \times I_{\text{ONOO}^-} \quad \text{Equation C-28}$$

$$I_{300} = 0,85 \times I_{\text{H}_2\text{O}_2} + 0,29 \times I_{\text{ONOO}^-} \quad \text{Equation C-29}$$

Ce système de quatre équations linéaires est alors résolu pour déconvoluer les courants dus à chacune des quatre espèces réactives. Les flux d'émission ($\phi_{\text{H}_2\text{O}_2}$; ϕ_{ONOO^-} ; ϕ_{NO^\bullet} et $\phi_{\text{NO}_2^-}$)

correspondant à ces espèces peuvent ainsi être calculés à partir de leurs intensités de courant, en utilisant la loi de Faraday :

$$\Phi_{\text{espèce}} = \frac{I_{\text{espèce}}}{n_{\text{espèce}} \times F} \quad \text{Equation C-30}$$

où F est la constante de Faraday (96485.34 C.mol⁻¹) et n_{espèce}, le nombre d'électrons par molécule transférée pour l'oxydation d'une espèce (n_{espèce} = 2 pour H₂O₂ et NO₂⁻ ; n_{espèce} = 1 pour NO[•] et ONOO⁻).^{17, 314}



Les équations C-26 à C-29, de par la définition du courant, sont transposables à la charge coulométrique Q et donc *via* la loi de Faraday, aux quantités de matière émises par une cellule. On peut donc également, sur l'ensemble du processus d'émission, calculer la quantité de chacune des espèces impliquées.

Cette méthodologie a permis de **quantifier la production de H₂O₂, ONOO⁻, NO[•] et NO₂⁻** pour différents types cellulaires, en particulier les fibroblastes,^{25, 313} les macrophages,^{17, 27} les cellules myéloïdes³¹⁶ et les lymphocytes.^{317, 318} Ces études ont contribué à l'amélioration de la compréhension du stress oxydant primaire. Par exemple, l'utilisation de cette approche pour la détection des espèces produites par un fibroblaste isolé a montré que la libération de H₂O₂ dépendait de la consommation de O₂. En effet, lors de la détection ampérométrique, réalisée en absence d'oxygène dans le milieu de culture, la libération d'H₂O₂ diminue.³¹³ Par ailleurs, l'implication des protéines tat et gp160 (protéines respectivement impliquées dans la réplication virale du VIH et constituant l'enveloppe virale du virus), dans le mécanisme de stress oxydant a également été mise en évidence : tat et gp160 contribuent à l'hyperactivation de l'état inflammatoire et influencent le métabolisme cellulaire par l'intermédiaire de la NADPH oxydase chez les lymphocytes, ce qui entraîne l'augmentation de la réponse cellulaire.³¹⁸ Enfin, il a également été montré que l'acide ascorbique (vitamine C), selon sa concentration et le type cellulaire, pouvait jouer un rôle anti- ou prooxydant chez les macrophages et les cellules myéloïdes.³¹⁶

D'autres études ont permis d'affiner le rôle des systèmes enzymatiques responsables de la production de ces espèces. Par exemple, une étude menée chez les macrophages murins RAW 264.7 montre que l'intensité détectée, correspondant au flux de molécules libérées, augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale en 1 seconde puis redescend lentement (50 secondes) jusqu'à la ligne de base. Cette forme de pic ampérométrique peut être attribuée à une libération passive et à la diffusion des espèces libérées. Si ces espèces étaient stockées puis libérées, elles diffuseraient en moins d'une seconde jusqu'à l'électrode. **Il n'existe donc pas de réservoir à NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$** qui libèrent les espèces suite à la stimulation. La cinétique du « burst » est déterminée par la soudaine activation des enzymes suite à la stimulation.¹⁷ Par ailleurs, la quantification de peroxyde d'hydrogène libéré par un lymphocyte unique est de l'ordre de quelques femtomoles. Le stockage de H_2O_2 au sein de la cellule dans de telles proportions n'étant pas possible car cela correspondrait à des conditions léthales pour la cellule, le flux détecté implique donc la production de H_2O_2 lors de la stimulation.³¹⁸

Par ailleurs, chez les fibroblastes et les lymphocytes, la détection en présence d'inhibiteurs des systèmes enzymatiques responsables de la production des ROS/RNS montre que les sites de productions sont différents. En effet, en présence de NEM (N-ethylmaleimide), inhibiteur de la NADPH oxydase, mais également suspecté d'inhiber les NO synthases, les quantités d'espèces libérées diminuent (70 % de diminution pour H_2O_2 et 50 % de diminution pour NO^\bullet , NO_2^- et ONOO^-). De même, en présence de NMMA (N^G -monomethyl-L-arginine), inhibiteur spécifique des NO synthases, seules les quantités de NO^\bullet , ONOO^- et NO_2^- diminuent alors que la quantité de H_2O_2 produite augmente. **Les deux systèmes enzymatiques sont donc différenciés.**²⁵

Ceci a également été montré lors de la stimulation des macrophages avec de l'interferon γ et du lipopolysaccharide LPS qui permettent d'induire l'expression de la forme inducible de la NO synthase. Le résultat est une production de grande quantité de NO^\bullet sur des périodes prolongées. Lors de la détection ampérométrique de la réponse, la quantité de molécules libérées, détectée à + 450, + 650 et + 850 mV vs ECSS, est supérieure lorsque les cellules sont préalablement incubées en présence d'IFN γ /LPS. La quantité de H_2O_2 n'est pas significativement modifiée par ce traitement alors que la production de NO^\bullet , ONOO^- et NO_2^- est exacerbée. De la même façon, un traitement au PMA (phorbol 12-myristate 13 acetate), responsable de l'activation de la NADPH oxydase, conduit à une augmentation du courant détecté à + 300 mV vs ECSS donc de la production de H_2O_2 , sans modifier la production des autres espèces.²⁷

c) Conclusion

Compte tenu des contraintes liées à nos objectifs (réponse rapide et collecte quantitative) l'approche développée et utilisée au laboratoire pour la détection des ROS/RNS produites par une cellule isolée est réalisée en configuration synapse « semi-artificielle » sur UME de carbone platinée. La détection ampérométrique, réalisée à quatre potentiels différents (+ 300, + 450, + 650 et + 850 mV vs ECSS), permet la détection de la dynamique de libération ainsi que la quantification de H_2O_2 , ONOO^- , NO^\bullet et NO_2^- . Différentes études ont alors permis de mieux appréhender les mécanismes du stress oxydant. Cette méthodologie présente en effet de nombreux avantages (temps de réponse, sélectivité en potentiel, dimension du capteur) qui permettent d'identifier les paramètres influençant la production des différentes ROS/RNS, en discriminant les effets sur chacune de ces espèces, le tout à l'échelle de la cellule unique. La contrepartie réside dans une procédure expérimentale fastidieuse. La nécessité de s'affranchir de la variabilité cellulaire et d'aboutir à un traitement statistique pertinent et fiable impose un grand nombre de mesures, et donc un temps de manipulation qui peut être colossal (quelques mois) pour l'étude d'un seul paramètre (une valeur de potentiel par cellule).

II. Améliorations de la mesure par microélectrode de carbone platinée sur cellule unique

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré que la libération cellulaire des ROS/RNS peut être directement détectée par ampérométrie à potentiel constant avec des microélectrodes de carbone platiné. Bien que cette méthode se montre utile en nous donnant des indices sur l'identité ainsi que la source des ROS/RNS, elle présente deux limitations majeures :

- l'étude de mécanismes biologiques à l'échelle de la cellule unique, de par la variabilité cellulaire, nécessite un grand nombre de mesures afin de pouvoir caractériser de manière statistique les tendances observées.
- les légères différences de sensibilité d'une UME à l'autre. Cette variabilité « analytique », moins importante que la variabilité cellulaire, est néanmoins non négligeable et ajoute une difficulté pour comparer directement les réponses obtenues d'une cellule à l'autre.³¹⁴

Des évolutions méthodologiques ont donc été mises en œuvre afin d'optimiser le protocole de détection électrochimique et limiter le nombre de mesures.

II.1. Détection par chronoampérométrie à triple saut de potentiel des ROS/RNS produites par un macrophage immunostimulé

Une première alternative envisagée au laboratoire dans le cadre du doctorat d'Alaric Koh a été d'utiliser la même UME pour faire des mesures successives à différents potentiels sur une même cellule. Une méthode chronoampérométrique à sauts de potentiel a été développée. Dans cette méthode, la variation du courant en fonction du temps est enregistrée alors que différentes valeurs de potentiel sont appliquées entre l'UME et la référence (*Figure C-6*).

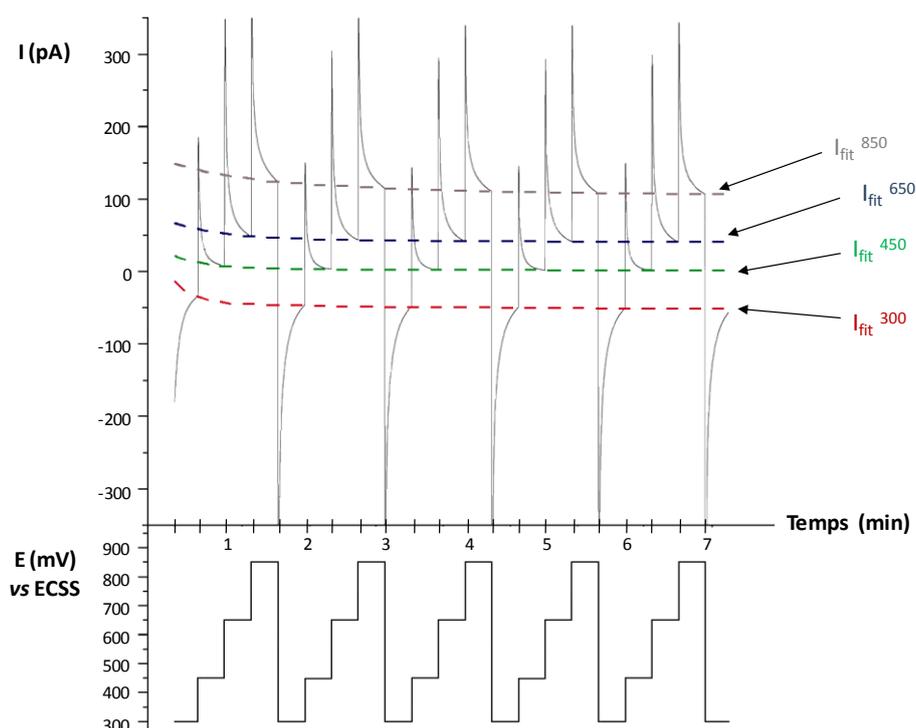


Figure C-6 : Courant mesuré (en haut, ligne continue) en fonction du temps par une UME de carbone platiné lors de l'imposition successive de plusieurs sauts de potentiel (en bas) ; Simulation de la ligne de base (en haut, ligne pointillée) calculée pour chaque potentiel à partir des courants initiaux et finaux obtenus à potentiel constant.

a) Protocole de mesure

Cette méthode requiert une **durée optimale pour chaque saut de potentiel**, elle-même fonction de la quantité de noir de platine déposé. En effet, lors des mesures ampérométriques, le courant mesuré est la somme d'un courant faradique et d'un courant capacitif. Le dépôt dendritique de noir de platine à la surface de l'électrode de carbone utilisée, bien que nécessaire pour améliorer sa sensibilité, est en contrepartie responsable d'une augmentation de la capacité, elle-même responsable de l'augmentation de la constante de temps ($\tau = R \times C$).

D'après les réponses cellulaires obtenues lors des mesures ampérométriques réalisées à quatre potentiels différents, la réponse attendue en chronoampérométrie est de l'ordre de quelques picoampères ou moins. La durée de chaque saut de potentiel doit donc répondre à deux critères :

- Elle doit être suffisamment longue pour que le bruit d'origine capacitive soit inférieur à un picoampère.
- Elle doit être inférieure à la cinétique du phénomène étudiée et la plus courte possible. En effet, plus la durée du saut augmente, plus la résolution temporelle sur l'ensemble des espèces diminue.

Ainsi, **un saut de potentiel de 20 secondes** a constitué un bon compromis dans cette thèse.³⁰⁵

Les **valeurs de potentiels** ont ensuite été choisies d'après les études ampérométrique réalisées à quatre potentiels différents. Comme précisé précédemment, la détection de H_2O_2 , ONOO^- , NO^\bullet et NO_2^- peut être réalisée sur électrode de carbone platiné à + 300, + 450, + 650 et + 850 mV vs ECSS. Cependant, dans les conditions de mesures chronoampérométriques, le signal est fortement perturbé lors qu'un potentiel de + 850 mV est appliqué entre l'UME et la référence (ECSS). Les mesures à + 850 mV vs ECSS, avec celles réalisées à + 650 mV vs ECSS, fournissent des informations sur la libération des nitrites. Or, les nitrites sont des espèces très stables et leur accumulation peut facilement être mesurée par des techniques classiques telles que la chimiluminescence ou la réaction de Griess. De plus, NO_2^- est aussi beaucoup moins réactif que NO^\bullet ou que d'autres ROS/RNS telles que ONOO^- . Aussi, en raison de son plus faible intérêt analytique, de la forte dispersion de signal à + 850 mV et du gain en résolution temporelle (un point toutes les 60 secondes au lieu de 80 s), il a été choisi de ne réaliser des mesures qu'à **trois potentiels différents** : + 300, + 450 et + 650 mV vs ECSS.

Des mesures ampérométriques *in vitro* réalisées à + 300, + 450 et + 650 mV vs ECSS lors de l'ajout des différentes ROS/RNS ont été comparées à des mesures chronoampérométriques à triple saut de potentiel *in vitro*. Les résultats obtenus sont similaires bien que la résolution temporelle de la chronoampérométrie soit plus faible. Ces mesures ont alors montré que des variations de courant faradique de l'ordre du picoampère peuvent être détectées avec une sensibilité et une précision suffisantes.

b) Détection des ROS/RNS produites par un macrophage immunostimulé

D'après les mesures obtenues par ampérométrie à potentiel constant, la réponse des macrophages immunostimulés est quasi-stationnaire et dure suffisamment longtemps (quelques minutes à quelques dizaines de minutes) pour être détectée par chronoampérométrie. Cette

technique a alors été appliquée à la détection des ROS/RNS produites lors de la phagocytose induite de macrophages murins RAW 264.7. La réponse de ces cellules a été stimulée par incubation dans un mélange d'IFN- γ /LPS et PMA, respectivement responsables de l'activation des NO synthases et de la NADPH oxydase.

Au début de chaque expérience, l'UME de carbone platiné, positionnée loin de toute cellule, est d'abord cyclée pendant environ 20 minutes. Ensuite, l'UME est placée au dessus de la cellule à étudier. La réponse chronampérométrique dans cette configuration de synapse « semi-artificielle » est alors enregistrée pendant 30 minutes. Ensuite, l'UME est à nouveau positionnée loin des cellules pendant 10 à 20 minutes. Afin d'éliminer les contributions capacitives du courant, les données obtenues pour des parties initiales et finales de la mesure sont utilisées pour calculer un courant de fond, correspondant à la polarisation de l'UME (Figure C-6, I_{fit}). La décroissance du courant est ensuite soustraite de la réponse globale de la cellule et permet de ne conserver que la composante faradique du signal.

La figure C-7 représente trois exemples d'ampérogrammes reconstitués à partir des réponses chronoampérométriques obtenues à + 300, + 450 et + 650 mV vs ECSS.

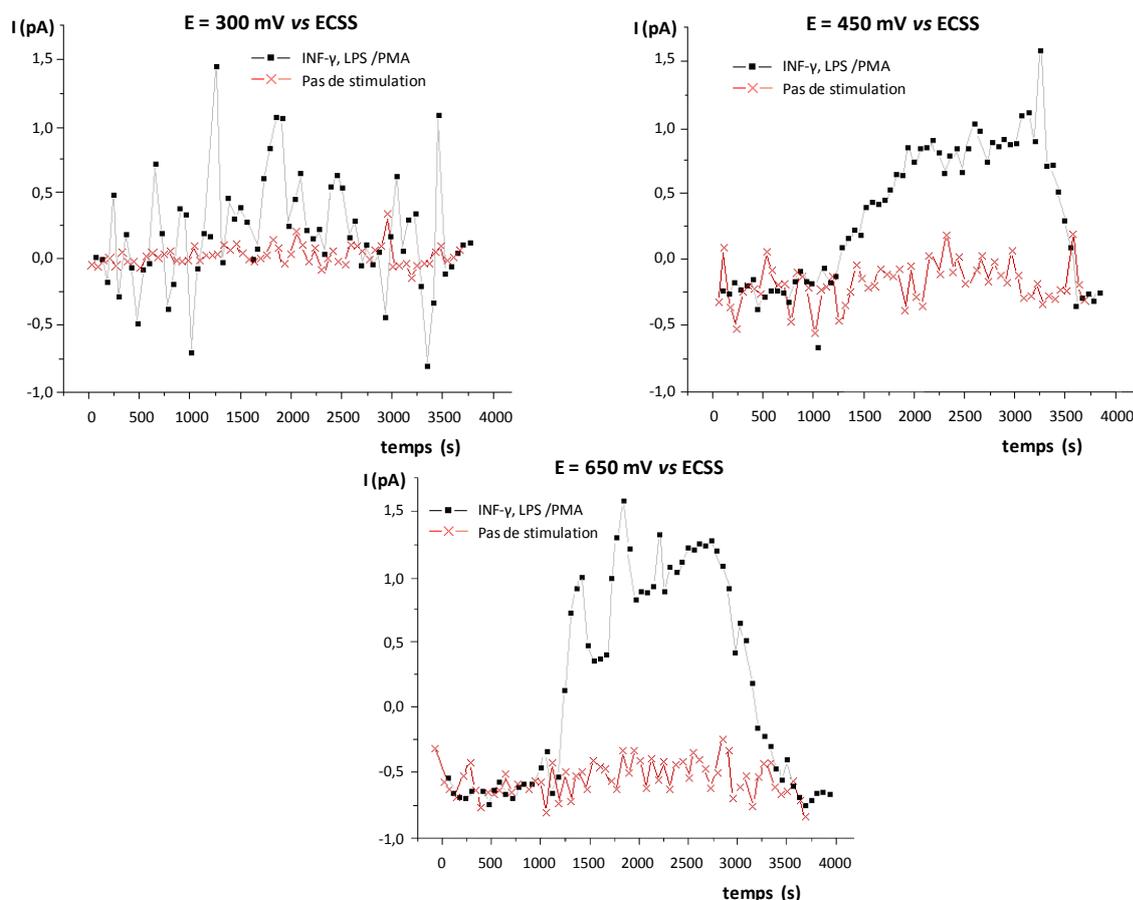


Figure C-7 : Exemples d'ampérogrammes reconstitués pour $E = + 300$ mV ; + 450 mV et + 650 mV vs ECSS obtenus lors de la libération de ROS/RNS par un macrophage immunostimulé par IFN- γ /LPS/PMA (ligne noire) et non stimulé (ligne rouge).³⁰⁵

c) Conclusion

Cette méthode permet donc d'obtenir simultanément trois ampérogrammes séparés pour les trois potentiels choisis sur la même cellule. Même si les réponses varient fortement d'une cellule à l'autre, la comparaison directe des réponses devient alors possible pour une cellule donnée sans se préoccuper de la variabilité cellulaire ou d'une éventuelle différence de sensibilité de l'électrode.

Dans la plupart des cas, les courants mesurés à + 650 mV vs ECSS sont nettement plus élevés que ceux mesurés à + 300 et + 450 mV vs ECSS. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une fois activées, les NO synthases sont capables de produire de grandes quantités de NO[•] sur des périodes de temps prolongées et qui traversent librement la membrane cellulaire. Cependant, principalement à cause du rapport signal sur bruit insuffisant, cette méthode manque de précision pour que les flux de ONOO⁻ et H₂O₂ soient déterminés avec précision.

On remarquera que l'étude de la libération des ROS/RNS par des macrophages immunostimulés par ampérométrie à potentiel constant a précédemment montré que la réponse était constituée de deux types de signaux : un pic large (une dizaine de minutes) peu intense et des pics plus fins (moins d'une seconde) superposés au premier signal. Cette méthode permet encore de visualiser le pic large mais seuls les pics fins de largeur à mi-hauteur suffisante (plusieurs dizaines de secondes) peuvent être observés en raison de l'enregistrement discontinu (un point toute les 60 secondes).

Cette méthode permet donc d'évaluer la production de chaque espèce et la comparaison directe de leur flux d'émission sur la même cellule unique, mais sa résolution temporelle est limitée par la valeur du « pas » de temps minimum à observer pour chaque potentiel. Elle est donc trop faible pour caractériser les variations de production au cours du temps pour une même espèce voire, en l'état, pour étudier des dynamiques rapides.

II.II. Intérêt des microsystemes pour l'étude du stress oxydant

Dans le but de conserver une bonne résolution temporelle tout en limitant les problèmes de variabilité cellulaire, une autre approche, d'ordre combinatoire, a donc été envisagée au cours de cette thèse. La mise au point de microsystemes constitués de quatre chambres de mesure, offrirait en effet la possibilité de réaliser plus rapidement des analyses simultanées à différents potentiels sur plusieurs cellules en même temps. Au-delà d'un temps d'analyse divisé par quatre,

les quatre mesures aux différents potentiels seront réalisées sur quatre populations de cellules provenant de la même culture. Ce dispositif permettrait également la modification et l'étude de l'effet de paramètres extérieurs d'une chambre à l'autre.

Le travail décrit dans la suite de ce manuscrit présente la mise au point de ces dispositifs pour la détection simultanée de H_2O_2 , $ONOO^-$, NO^\bullet et NO_2^- libérés lors de la phagocytose induite de macrophage RAW 264.7.

III. Fabrication des microsystemes

III.I. Contraintes expérimentales

Le but du travail présenté dans cette partie est de développer un système miniaturisé permettant la détection ampérométrique à quatre potentiels constants simultanément des flux de H_2O_2 , $ONOO^-$, NO^\bullet et NO_2^- libérés sur une ou plusieurs cellules vivantes stimulées.

Le premier point à résoudre est le choix du modèle cellulaire. Les cellules étudiées doivent être « robustes » et ne nécessiter qu'un maintien minimal en culture. Des précédentes études au laboratoire ont été réalisées sur des **macrophages murins RAW 264.7**, cellules du système immunitaire. Nous avons donc choisi de travailler avec ce modèle cellulaire car leur culture, relativement aisée, ainsi que les caractéristiques de leur sécrétion sont connues et maîtrisées grâce aux travaux antérieurs de l'équipe. D'autres modèles cellulaires sont par ailleurs tout à fait envisageables (fibroblastes, lymphocytes... ou même des organismes dont la sécrétion n'est pas du stress oxydant) mais nécessiteront au préalable une caractérisation qui va au-delà de la preuve de concept présentée ici.

Les macrophages produisent et libèrent les quatre ROS/RNS identifiées précédemment et la détection de ces espèces est habituellement effectuée par ampérométrie à potentiel constant à des valeurs de + 300, + 450, + 650 et + 850 mV vs ECSS. Pour permettre la détection simultanée de ces quatre espèces, le système doit être constitué de **quatre chambres distinctes et indépendantes**. Chacune de ces chambres permettra l'isolement de quelques cellules. Par ailleurs, le système doit être alimenté par des connexions fluidiques pour permettre le chargement des cellules et le contrôle de leur stimulation.

Chaque chambre doit également contenir un jeu de trois électrodes (travail, référence et auxiliaire) afin d'imposer indépendamment les quatre potentiels choisis. Il est également

important de prendre en compte la sensibilité du détecteur et son temps de réponse. Nous avons vu précédemment que grâce à leurs propriétés, les UME présentent un temps de réponse suffisamment faible pour la détection directe d'espèces libérées par une cellule (cf. *Partie A : Utilisation des ultramicroélectrodes pour la détection de molécules libérées par une cellule unique*). D'après les précédentes études menées au laboratoire, la libération des espèces produites par un macrophage conduit à un courant de quelques picoampères. Afin d'optimiser la sensibilité de ces dispositifs, nous avons choisi des **électrodes de type bande**. Ainsi, le rapport signal sur bruit de la détection est suffisant pour détecter des signaux de cet ordre de grandeur en courant.

Enfin, afin de miniaturiser le système, et en raison de la configuration des dispositifs envisagés, l'électrode de référence ne peut plus être une ECSS, difficilement compatible avec des chambres ou des canaux micrométriques. Par ailleurs, pour que la détection de la dynamique de sécrétion en temps réel ne soit pas altérée par des problèmes de diffusion, il est préférable que les cellules soient déposées sur l'électrode de travail. Les matériaux d'électrodes doivent donc être biocompatibles. Nous avons ainsi choisi de travailler avec une électrode **de référence type bande en argent chloruré** et une **électrode de travail en platine**. Par ailleurs, et contrairement à ce qui se faisait pour l'étude de l'exocytose (cf. *Partie B : Mise au point du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie de fluorescence pour l'étude de l'exocytose*), un montage à deux électrodes n'est pas concevable car le contrôle de potentiel doit être précis et indépendant du flux détecté. Or, la bande Ag/AgCl utilisée comme référence ne peut pas débiter en garantissant son potentiel. Le contrôle fin du potentiel nécessaire pour différencier les espèces émises nécessite donc l'utilisation d'une **contre électrode que nous avons choisie en platine**.

III.II. Procédé de fabrication des dispositifs

III.II.1. Preuve de concept et premiers dispositifs : historique

Dans un premier temps, un premier dispositif a été élaboré au laboratoire en 2007 (*Figure C-8*) à partir d'un substrat de verre. Il est constitué de trois électrodes de type bande. Les électrodes de travail et auxiliaire sont en platine et l'électrode de référence est en argent sur laquelle du chlorure d'argent a été déposé par oxydation électrochimique. La partie supérieure, permettant de fermer le système, est un bloc de PDMS (polymethylsiloxane) dans lequel une chambre et des canalisations permettant le chargement des cellules et leur stimulation sont créées. Les électrodes ainsi que le moule permettant d'imprimer le PDMS ont été réalisés par des techniques photolithographiques.³¹⁹

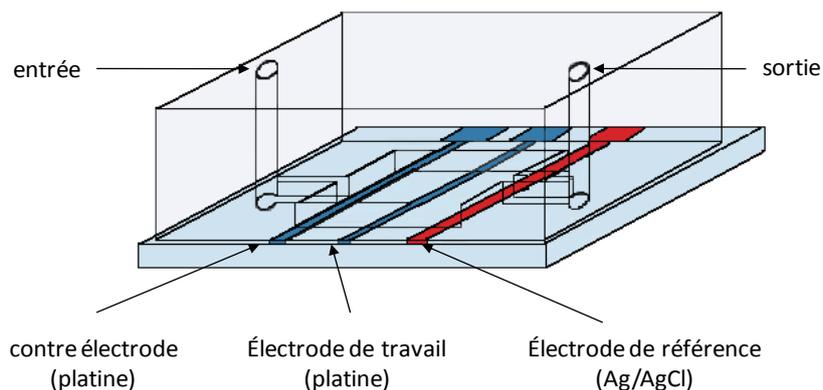


Figure C-8 : Schéma du premier dispositif pour la détection du stress oxydant.²⁸

Les électrodes de travail et auxiliaire, en platine (épaisseur 20 nm ; couche d'accroche en titane : 5 nm), mesurent respectivement 20 μm et 500 μm de largeur, et l'électrode de référence, en argent (épaisseur 40 nm ; couche d'accroche en chrome : 5 nm), mesure 500 μm de largeur. La partie supérieure, en PDMS, est constituée d'une chambre de 5 mm de large, 1 cm de long et 100 μm de hauteur. Les canalisations mesurent 100 μm de largeur, 1 cm de longueur et 100 μm de hauteur. Les trois UME bandes sont perpendiculaires à la canalisation. Leur longueur exposée à la solution est alors délimitée par la taille de la chambre.

Afin d'améliorer la sensibilité de l'électrode de travail, un dépôt de noir de platine (30 μC) est réalisé à sa surface (cf. *Partie D : Partie expérimentale ; p.211*). L'électrode d'argent est convertie en Ag/AgCl en imposant le passage du courant à travers une solution de chlorure de sodium (1 mol.L⁻¹) pendant quelques secondes (l'électrode de platine de 500 μm de largeur est alors utilisée comme référence pour cette étape).

Les premiers essais ont été réalisés sur une population de 20 à 30 macrophages RAW 264.7 déposés et stimulés (calcium ionophore A23187 ; 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) dans la chambre. La réponse ampérométrique de cette population a été enregistrée à + 890 mV vs Ag/AgCl (*Figure C-9*).

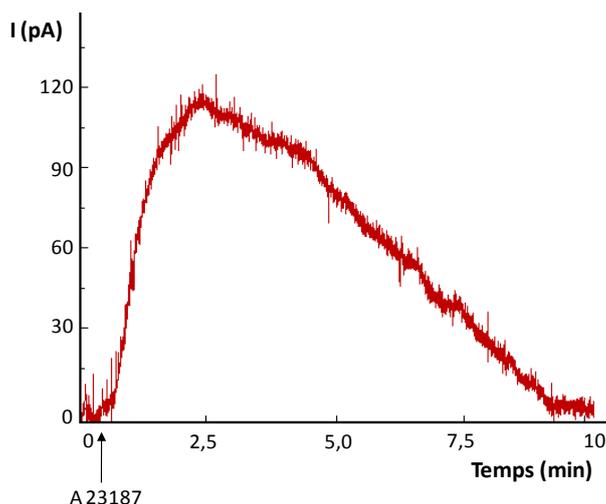


Figure C-9 : Réponse ampérométrique détectée à + 890 mV vs Ag/AgCl d'une population de macrophages (environ 20 cellules) déposés dans le microsysteme et stimulés par une solution de calcium ionophore ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Le courant de la figure C-9 correspondant à l'oxydation des ROS/RNS libérées augmente rapidement suite à la stimulation (deux à trois minutes) puis redescend plus lentement pour atteindre la ligne de base après dix minutes. Le signal, enregistré à + 890 mV vs Ag/AgCl correspond donc à la détection totale et non différenciée de H_2O_2 , ONOO^- , NO^\bullet et NO_2^- .²⁸ Sur le même principe que les études réalisées sur UME de carbone platiné, et en utilisant le système d'équations (Equation C-26 à C-29) à adapter pour ces types d'électrodes, il serait alors théoriquement possible de déterminer la proportion de chacune de ces espèces en réalisant quatre mesures aux potentiels d'oxydation des quatre espèces.

Par ailleurs, cette étude montre que la sensibilité du dispositif est suffisante. Le bruit de fond est de l'ordre de quelques picoampères alors que l'intensité du signal mesuré dépasse la centaine de picoampères puisqu'il représente les émissions de plusieurs cellules. Ce premier dispositif constitue donc une **preuve de concept** pour la détection des ROS/RNS libérées par des macrophages dans un microsysteme. Cependant, la quantification de ces espèces et la mise en place d'un système de routine demande encore de nombreuses manipulations car ce dispositif ne contient qu'une seule et unique chambre de mesure. Il n'est donc pas possible de réaliser plusieurs enregistrements à différents potentiels simultanément.

III.II.2. Evolution des dispositifs : but de cette thèse

Nous avons choisi de réaliser nos dispositifs sur des wafers en verre quatre pouces nous permettant d'obtenir quatre dispositifs par wafer. Chaque dispositif est constitué de 4 chambres

de mesure, et chacune contient les trois électrodes décrites plus haut. La figure C-10 est la superposition des trois masques utilisés pour réaliser ce dispositif. Un seul dispositif est représenté, les quatre étant réalisés simultanément. La première couche, en rouge, permet d'obtenir les électrodes de travail et auxiliaire, la seconde, en vert foncé, permet d'obtenir les électrodes de référence, et la dernière, en vert clair, est celle utilisée pour la chambre et les canalisations imprimées dans le PDMS.

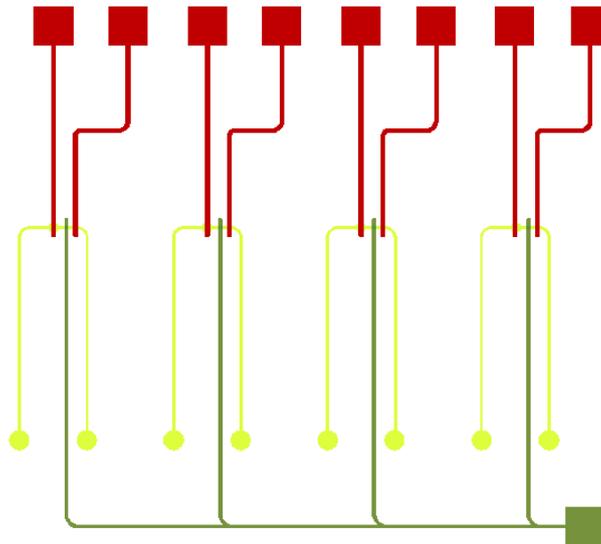


Figure C-10 : Superposition des trois masques utilisés pour réaliser les dispositifs.

- Première couche : électrode de travail et auxiliaire
- Deuxième couche : électrode de référence
- Troisième couche : chambre et canalisations

a) Création des électrodes

La première étape de fabrication de ces microsystèmes consiste à déposer les électrodes. Les électrodes de travail et auxiliaires sont toutes les deux en platine et peuvent donc être préparées simultanément. Par contre, les électrodes d'argent sont réalisées dans une deuxième étape. Pour ce faire, deux masques différents sont utilisés mais le protocole utilisé est le même.

Tout d'abord, une résine photosensible réversible (AZ 5214) est déposée par « spin-coating » sur un wafer en verre (Figure C-12, étape a). Après un premier recuit, la résine est insolée aux UV à travers le premier masque (Figure C-12, étape b). Ce masque est constitué de quatre fois deux électrodes de 200 μm de large qui correspondront aux électrodes de travail et auxiliaire (Figure C-11).

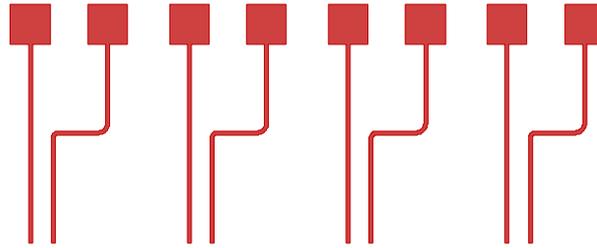


Figure C-11 : Masque utilisé pour fabriquer les électrodes de travail et auxiliaire en platine.

La résine subit ensuite un second recuit pour inverser sa polarité et rendre alors la zone précédemment insolée inerte au développeur. La totalité de la résine est ensuite insolée aux UV pour rendre la zone préalablement masquée soluble dans le développeur. Ainsi, après développement, le motif des électrodes est « gravé » dans la résine (Figure C-12, étape c).

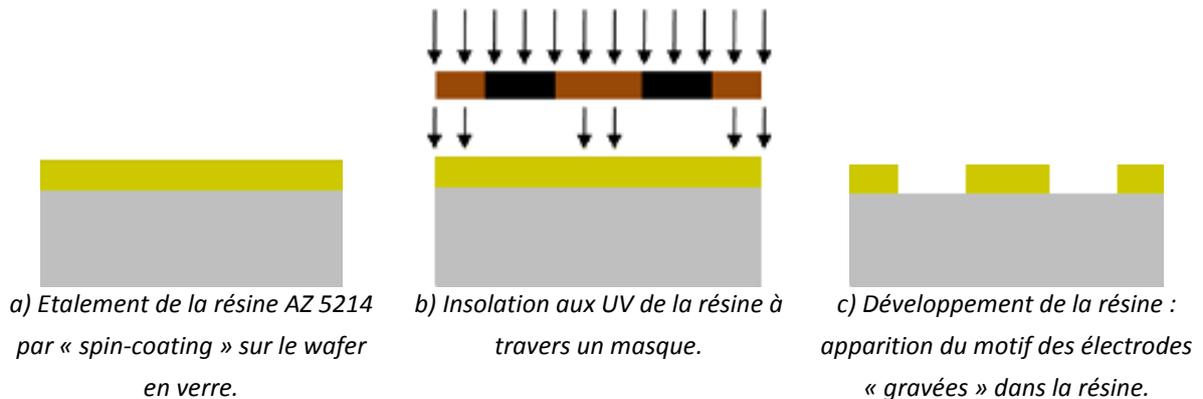


Figure C-12 : Première étape de la fabrication des dispositifs : motif des électrodes.

A la suite de cette étape, l'ensemble de la surface du dispositif est métallisé par pulvérisation cathodique magnétron. Les métaux n'ont pas toujours de bonnes propriétés d'adhérence avec le matériau sur lequel ils sont déposés. Ceci peut entraîner un décollement des couches métalliques au cours du procédé de fabrication. Pour pallier cet inconvénient, des couches d'accroche peuvent être utilisées. Ces couches sont des métaux possédant de bonnes propriétés d'adhérence avec les autres matériaux. Les plus communément utilisées sont le chrome et le titane. Pour la fabrication des électrodes de travail et auxiliaire, nous avons choisi une couche d'accroche de titane (épaisseur : 20 nm) avant de déposer 30 nm de platine.

Une fois le dépôt métallique effectué, la résine est éliminée par « lift-off ». Cette méthode consiste à dissoudre à l'aide d'acétone la résine recouverte par les métaux déposés. Le choix de la résine AZ 5214 est alors justifié pour faciliter cette étape. En effet, une fois développée, cette résine possède une orientation positive qui, lors de la métallisation, permet de déconnecter le

film de métal sur la résine de celui du substrat et faciliter l'accès de l'acétone à la résine (Figure C-13). Suite à cette révélation, seules les zones initialement non recouvertes de résine sont recouvertes de métal.



A la fin de cette étape, les électrodes de platine sont créées. Le procédé est à nouveau réalisé pour obtenir les électrodes d'argent. Après le dépôt de résine AZ 5214 sur le dispositif obtenu précédemment, l'insolation de la résine est réalisée sous le second masque (Figure C-14) qui permet d'obtenir quatre électrodes de 160 μm de largeur. Afin de faire coïncider les deux niveaux, l'utilisation d'un aligneur est indispensable.

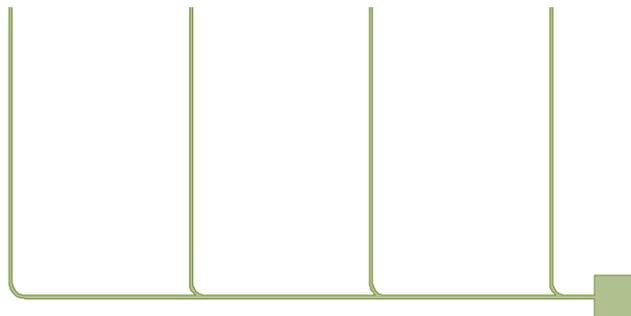


Figure C-14 : Masque utilisé pour fabriquer les électrodes de référence en argent.

Après développement, la surface du dispositif est métallisée. Pour les électrodes de référence, 100 nm d'argent sont déposés. La couche d'accroche utilisée est composée de 10 nm de titane et 20 nm de platine.

A la fin de cette étape, les trois électrodes de chaque cellule de mesure ont été élaborées. Les références sont ensuite converties en Ag/AgCl par oxydation de l'électrode d'argent par une solution de chlorure de Fer (III) et les contacts électriques sont montés et isolés (cf. partie D : Partie expérimentale ; p.218).

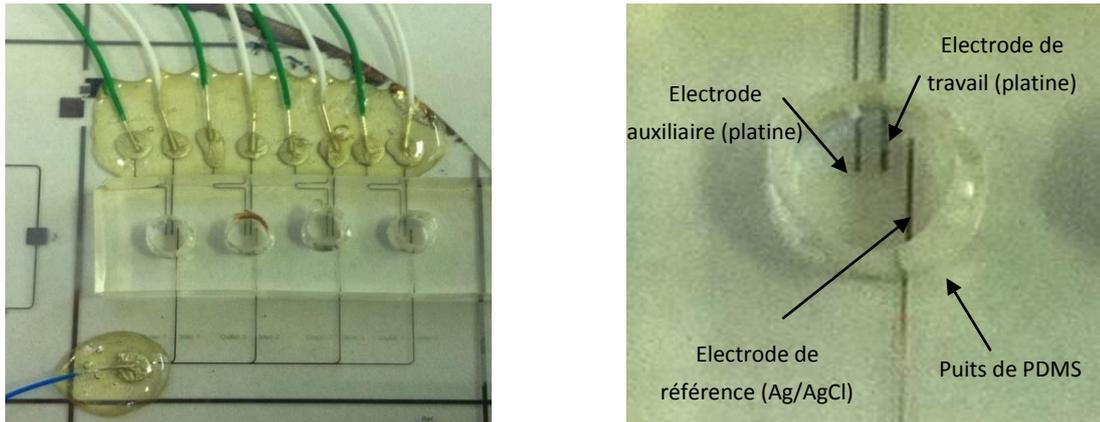


Figure C-15 : A gauche, photo du dispositif final. Les fils de connexions verts correspondent aux électrodes de travail, les blancs, aux électrodes auxiliaires et le bleu, aux électrodes de référence. A droite, zoom sur les électrodes dans le puits de PDMS utilisé pour les mesures.

b) Préparation des canalisations

La seconde étape de fabrication des dispositifs consiste à réaliser la structure des chambres et des canalisations. La réalisation d'un canal microfluidique est effectuée en PDMS (polydimethylsiloxane). L'utilisation du PDMS, pour la confection des structures plastiques,³¹⁹⁻³²¹ nécessite une fabrication en deux étapes : la fabrication du moule puis la fabrication des canaux.

Le moule présente en négatif les structures que l'on désire obtenir. Il est réalisé sur un wafer en silicium par photolithographie. Dans un premier temps, la résine utilisée SU8 3050 (qui conduit à une épaisseur de motif de l'ordre de 50 μm) est déposée par « spin-coating » sur la surface du wafer. Après un premier recuit, la résine est insolée sous le troisième masque (*Figure C-16*). Ce masque est constitué de 4 canalisations indépendantes de 100 μm de largeur et chaque canalisation contient une chambre carrée de 400 μm de côté. Dans notre cas, les canalisations sont transparentes et le fond du masque, noir, permet de bloquer les UV. La résine subit ensuite un second recuit qui permet à la résine insolée (canalisations et chambres) de polymériser. Après développement, seules les parties non insolées sont éliminées. Nous obtenons donc les canalisations en SU8 sur le wafer en silicium.

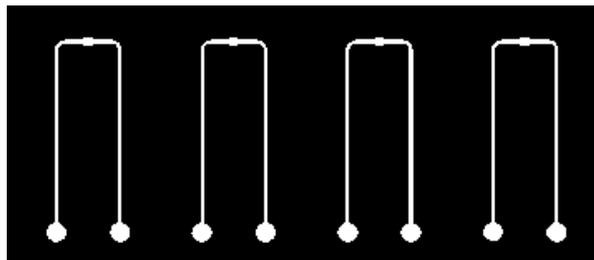


Figure C-16 : Masque utilisé pour la fabrication du moule en SU8 permettant d'obtenir les canalisations en PDMS.

Le PDMS (cf. *Partie D : Partie expérimentale ; p.218*) est ensuite coulé sur ce moule puis placé à 75 °C pour le réticuler. Après démoulage, les canalisations et les chambres apparaissent « gravées » en creux dans le bloc de PDMS qui est alors percé au niveau de l'extrémité des canalisations pour connecter le dispositif à l'extérieur. L'affinité du PDMS avec le verre est suffisante pour qu'une fois en contact, les deux éléments restent collés. La figure C-17 représente les trois électrodes au sein de la chambre microfluidique en PDMS.

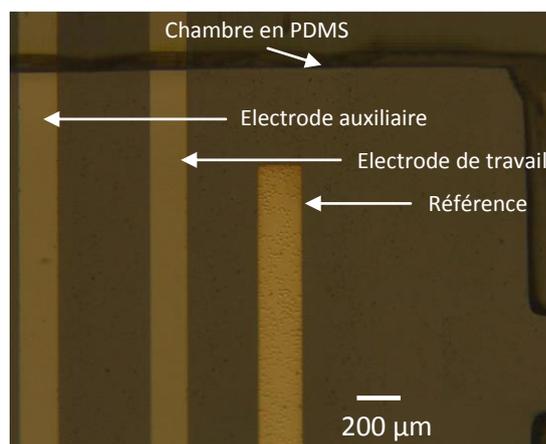


Figure C-17 : Chambre microfluidique en PDMS contenant les trois électrodes

III.III. Caractérisation électrochimique des dispositifs

III.III.1. Caractérisation de l'électrode de travail

Les études antérieures du laboratoire ont montré qu'un dépôt de noir de platine à la surface d'UME de carbone permet d'augmenter significativement (facteur 100 à 1000) la sensibilité de la détection électrochimique vis-à-vis des espèces libérées par une cellule lors du stress oxydant. En effet, ce dépôt de type dendritique, permet d'augmenter considérablement la surface active de l'électrode, ce qui se traduit donc par des signaux de plus forte amplitude. Nous avons donc cherché à établir si un traitement similaire sur les électrodes de platine en bande avait le même effet.

Afin d'avoir une vision globale du fonctionnement des dispositifs et de pouvoir les perfectionner au besoin, nous avons choisi de travailler à partir de deux espèces libérées par les macrophages, à savoir H_2O_2 et NO_2^- , qui, d'après les précédentes études s'oxydent au potentiel le plus bas et le plus élevé respectivement sur UME de carbone platiné. Par ailleurs, ces espèces sont aussi les plus faciles à étudier expérimentalement puisque assez stables en solution aqueuse (quelques heures pour H_2O_2 et plusieurs semaines pour NO_2^-). Nous avons alors étudié les vagues

d'oxydation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion nitrite sur électrode de platine nu (Figures C-20 et C-21) et sur électrode de platine platiné (30 μC) (Figures C-18 et C-19).

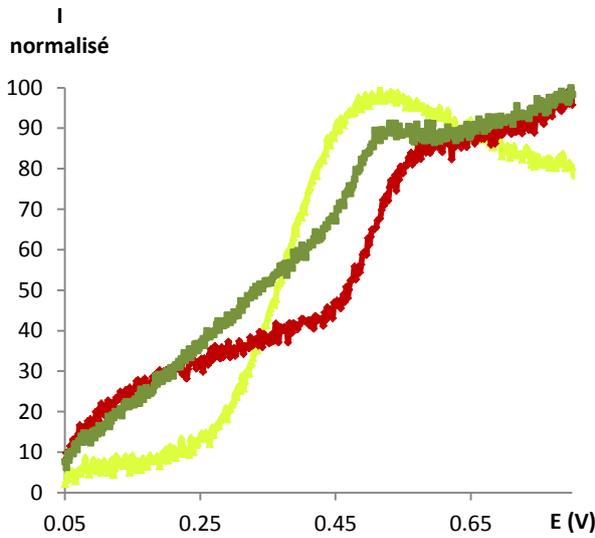


Figure C-18 : Oxydation de H_2O_2 sur UME de **platine platiné** ; $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

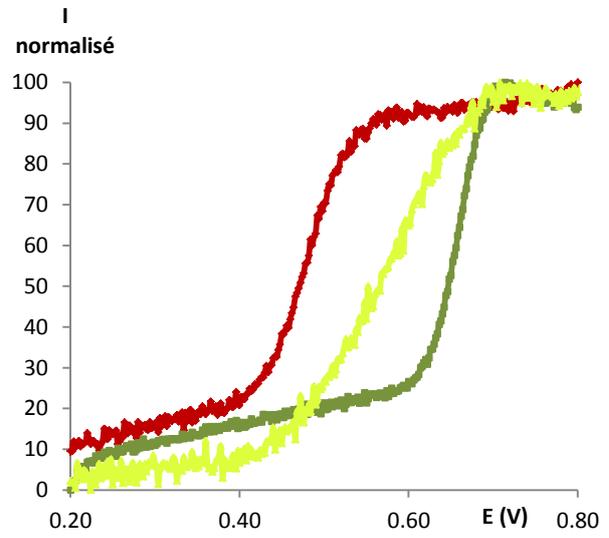


Figure C-19 : Oxydation de NO_2^- sur UME de **platine platiné** ; $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $C_{\text{NO}_2^-} = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

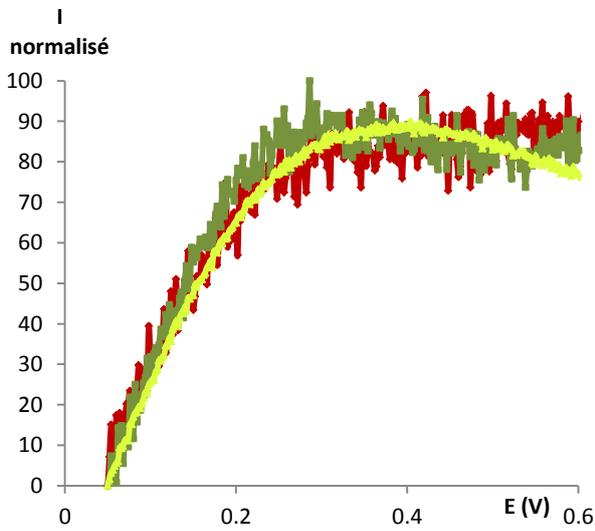


Figure C-20 : Oxydation de H_2O_2 sur UME de **platine nu** ; $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

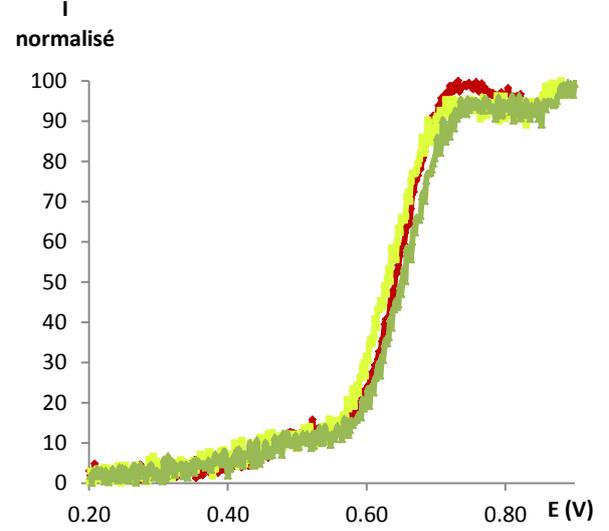


Figure C-21 : Oxydation de NO_2^- sur UME de **platine nu** ; $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $C_{\text{NO}_2^-} = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

D'après les voltammogrammes présentés ci-dessus, on remarque que l'oxydation de H_2O_2 et NO_2^- n'est pas reproductible sur UME de platine platiné contrairement à leur oxydation sur UME de platine nu. Ce manque de reproductibilité provient probablement de légères différences entre

les différents dépôts de noir de platine. En effet, la quantité de noir de platine est relativement faible par comparaison avec l'étendue de la surface de platine et contrôlée avec une précision moyenne (\pm quelques μC). Il est aussi possible que la surface active des différentes électrodes varie légèrement lors de la microfabrication. Nous avons par ailleurs remarqué un manque de stabilité mécanique du dépôt de platine à la surface de la bande au cours des expériences quand la quantité de platine a été fortement augmentée (de l'ordre de 1 mC).

En réalité, l'extension du protocole de platination sur ultramicroélectrode de carbone à des bandes de platine est loin d'être triviale puisque la surface à platiniser diffère dans les deux cas, que se soit en nature ou en dimension. Deux possibilités s'offrent alors à nous :

- soit la quantité de noir de platine déposée n'est pas modifiée (environ 30 μC) même si la surface active de l'électrode de platine bande reste bien plus élevée que celle d'une électrode de carbone,
- soit on tient compte d'un facteur de conversion correspondant à l'augmentation de cette surface active.

Nous avons choisi de suivre la première alternative comme cela a été fait lors des travaux préliminaires réalisés avec les dispositifs à une seule chambre et de déposer « seulement » 30 μC de noir de platine à la surface de nos bandes. Dans ces conditions, l'intensité moyenne des plateaux d'oxydation de H_2O_2 et NO_2^- ne semble pas être modifiée par rapport aux signaux obtenus sur platine nu. La comparaison de ces valeurs est cependant assez délicate en raison des différents paramètres exposés plus haut.

Il serait alors intéressant d'adapter la quantité déposée à la surface de l'électrode bande par rapport à la surface d'une ultramicroélectrode de carbone. Cette étude fait actuellement l'objet d'une seconde thèse en cours au laboratoire.

Malgré la non reproductibilité des résultats obtenus sur bande de platine platiné, on remarque que le dépôt de noir de platine entraîne un léger décalage des potentiels d'oxydation vers les vers les potentiels plus positifs dans le cas de H_2O_2 . Il est plus difficile d'observer ce décalage lors de la détection de NO_2^- mais il semble cependant que les valeurs de potentiels soient identiques ou inférieures lors de la détection sur UME de platine platiné. Ce qui pourrait être un avantage pour la détection de NO_2^- , limitant les interférences dues à l'oxydation du solvant, devient finalement un inconvénient dans le contexte de notre étude. En effet, le but étant de discriminer les différentes espèces libérées lors du stress oxydant, le rapprochement des vagues d'oxydation les plus séparées pourrait entraîner une superposition des signaux des quatre espèces si leur vague respective n'est pas bien séparée des autres.

Enfin, le dernier paramètre à prendre en considération est le gain de signal éventuel résultant d'un dépôt dendritique de platine. Dans les études précédentes, l'UME de carbone utilisée, de diamètre de l'ordre de la dizaine de micron, voit sa sensibilité multipliée par un facteur 100 à 1000. Cette augmentation du signal est nécessaire pour la détection des espèces envisagées par comparaison avec le carbone nu. Dans notre cas, le passage du platine nu au platine platiné semble moins critique et nécessaire même si des études de platination en tenant compte du facteur de surface entre l'UME de carbone et la bande de platine mériteraient d'être effectuées. Cependant, dans le cas de nos dispositifs, les cellules sont en contact direct avec la surface de l'électrode de travail. De plus, les UME de platine utilisées sont des bandes de 200 x 400 μm . Cette surface active est alors largement suffisante pour permettre la détection des ROS/RNS libérées par une population de cellules.

En vue de ces différents paramètres, nous avons choisi d'utiliser les électrodes de platine de nos dispositifs sans dépôt de noir de platine.

III.III.2. Choix des potentiels de mesure

Comme précisé précédemment, la détection ampérométrique à potentiel constant dans les microsystemes sera réalisée sur UME de platine nu avec comme référence une électrode d'argent chloruré. Les voltammogrammes présentés précédemment (*Figures C-20 et C-21*) nous ont permis de d'identifier les potentiels de plateau d'oxydation de H_2O_2 et NO_2^- . Nous avons alors vérifié que leur présence simultanée en solution n'influencerait pas leur oxydation sur les bandes en question. Le voltammogramme de la Figure C-22 représente ainsi les vagues d'oxydation des deux espèces seules et mélangées ($C = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

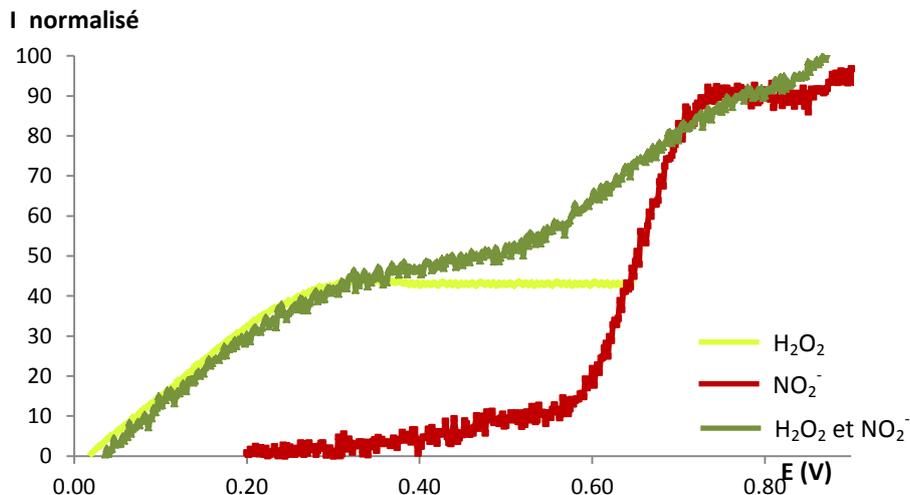


Figure C-22 : Superposition des voltammogrammes correspondants à l'oxydation de H_2O_2 et NO_2^- , seuls ou mélangés dans le PBS ; $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$; référence Ag/AgCl.

D'après ces voltammogrammes, on remarque que les vagues d'oxydation (potentiel de plateau et potentiel de demi-vague) de ces espèces ne sont pas modifiées que ces espèces soient seules ou mélangées. Les mesures ampérométriques à potentiel constant doivent être réalisées à la valeur de potentiel correspondant au plateau atteint lors de l'oxydation de chacune des espèces en voltammétrie. Le plateau est atteint pour un potentiel de + 300 et + 800 mV vs Ag/AgCl respectivement pour H₂O₂ et NO₂⁻. Nous avons choisi de se placer à des potentiels légèrement plus positifs, à savoir + 400 et + 850 mV vs Ag/AgCl pour être certains d'oxyder la totalité des espèces.

En comparaison avec les études réalisées sur UME de carbone platiné, on observe un décalage de 50 mV vers les potentiels cathodiques lors de la détection dans les microsystemes, sur UME de platine avec Ag/AgCl comme référence. Il semble donc que la nature des électrodes affecte et déplace légèrement les potentiels d'oxydation des différentes espèces. Identiques pour les deux espèces dont les potentiels d'oxydation sont les plus éloignés, ce décalage est probablement le même pour les deux potentiels intermédiaires, correspondant à l'oxydation de ONOO⁻ et NO[•].

Ainsi, compte tenu d'éventuelles superpositions des vagues d'oxydations des différentes espèces, en particulier pour H₂O₂ et ONOO⁻, la détection ampérométrique dans les microsystemes pourrait être réalisée pour les valeurs de potentiels suivantes : **+ 300, + 400, + 600 et + 800 mV vs Ag/AgCl**. Il n'est resté pas moins que cela devra être vérifié expérimentalement *in vitro* à travers la signature électrochimique de ONOO⁻ et NO[•] dans les mêmes conditions.

IV. Fonctionnement du dispositif

Les premières détections ont été réalisées afin de valider notre principe de détection en chambre. Les potentiels d'oxydation de ONOO⁻ et NO[•], n'ayant pas été vérifiés, les mesures de principe ont alors été effectuées à + 400 et + 850 mV vs Ag/AgCl, correspondant à l'oxydation de H₂O₂ et NO₂⁻. Par ailleurs, dans un souci de facilité, les premiers essais n'ont pas été réalisés en chambres microfluidiques, mais dans quatre puits de PDMS ouverts, et placés au dessus des différents jeux d'électrodes. Dans ces conditions, la détection est réalisée sur deux cents à trois cents cellules.

La veille des manipulations, les cellules sont décollées de la flasque où elles sont maintenues en culture (cf. *Partie D : Partie expérimentale ; p.230*) et environ 0,5 mL de cellules en suspension sont déposées dans les puits de PDMS. Les cellules sont alors incubées pendant 24 heures dans les puits pour permettre leur adhésion, croissance et repos dans ces nouvelles conditions.

Lors de l'expérience, le milieu de culture est remplacé par un tampon physiologique PBS, les trois électrodes sont reliées au potentiostat, et le signal est enregistré pendant une à deux minutes dans ces conditions. Ensuite, le PBS est remplacé par une solution de stimulation contenant le calcium ionophore A 23187 ($2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹), connu pour entraîner une augmentation locale de la concentration en calcium intracellulaire et assure l'activation des enzymes NADPH oxydase et NO synthases constitutives, responsables de la production des ROS/RNS. A la fin de la sécrétion des cellules qui dure 10 à 15 minutes, la solution de calcium est remplacée par du PBS et le signal est enregistré pendant encore une à deux minutes. Les parties du signal enregistrées dans le PBS permettront de simuler la décroissance exponentielle du courant correspondant à la polarisation de l'électrode. Cette décroissante capacitive sera ensuite soustraite au signal global, permettant ainsi d'accéder au courant faradique seul.

Les figures C-23 et C-24 représentent deux exemples de mesures réalisées à + 400 et + 850 mV. La détection réalisée à + 850 mV vs Ag/AgCl correspond à l'oxydation de l'ensemble des ROS/RNS libérées par les macrophages présents sur l'électrode. Le signal augmente rapidement et atteint une valeur maximale de l'ordre de 45 nA. Après environ 10 minutes de sécrétion, le courant revient à la ligne de base. Par contre, la détection à + 400 mV vs Ag/AgCl correspond seulement à la détection de H₂O₂ et éventuellement de ONOO⁻ si sa vague d'oxydation est proche. On remarque en effet que l'intensité moyenne du signal est d'environ 6 nA. Dans ce cas, la sécrétion est plus courte : le courant revient à la ligne de base après environ deux minutes.

L'intensité moyenne des signaux enregistrés à + 850 mV vs Ag/AgCl est de 33 ± 13 nA et celle des signaux enregistrés à + 450 mV vs Ag/AgCl est de 5 ± 1 nA. On remarque une augmentation du signal d'environ un facteur 100 par rapport aux signaux enregistrés dans les premiers dispositifs (*Figure C-9*), probablement dû à l'augmentation du nombre de cellules dans la chambre.

L'ampérogramme obtenu à + 400 mV vs Ag/AgCl présente également quelques pics plus fins dont la durée est de l'ordre de quelques secondes. Ce type de réponse est caractéristique de la stimulation biochimique (une stimulation mécanique conduit quant à elle, à l'obtention d'un pic unique, large et bien défini) comme cela a déjà été observé lors de la détection des ROS/RNS produites par des macrophages immunostimulés (IFN- γ /LPS et PMA). Le temps de réponse de ces électrodes est en tout cas largement suffisant pour permettre la détection de ce type de signal. Il s'agirait d'événement de type exocytose superposés à l'enveloppe globale du signal de diffusion des ROS/RNS.³²² Cela démontre l'utilité de ce type de dispositifs en illustrant les différents régimes temporels des émissions de ROS/RNS lors de stimulations biochimiques.

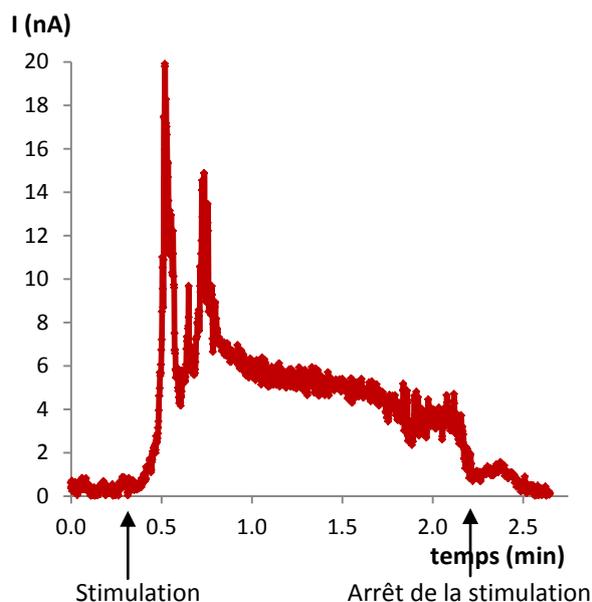


Figure C-23 : Détection ampérométrique à + 400 mV vs Ag/AgCl de la réponse de 200 à 300 macrophages stimulés avec du calcium ionophore ($2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

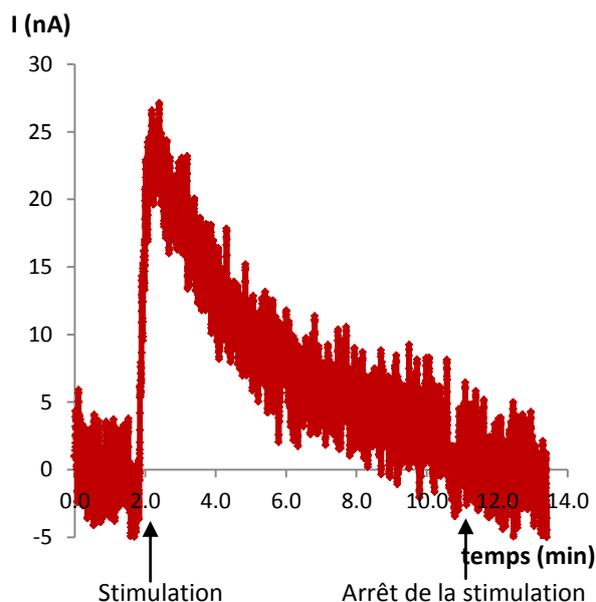


Figure C-24 : Détection ampérométrique à + 850 mV vs Ag/AgCl de la réponse de 200 à 300 macrophages stimulés avec du calcium ionophore ($2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Le dispositif présenté dans ce travail offre donc la possibilité de suivre en temps réel sur une population de quelques dizaines de cellules, l'évolution, à ce jour, de deux espèces caractéristiques de la situation de stress oxydant, H_2O_2 et NO_2^- .

On notera par ailleurs que grâce aux progrès récents quant à leur fabrication et la rapidité de détection, l'utilisation de microsystemes pour la mesure du stress oxydant est de plus en plus répandue. Ces systèmes, particulièrement adaptés à l'immobilisation, au transport et à la manipulation de molécules biologiques ou de cellules répondent généralement à un cahier des charges très spécifique, rendant la nature des espèces étudiées très variée. On citera par exemple un réseau microfluidique permettant la stimulation contrôlée de cellules endothéliales dont la réponse oxydative est suivie par fluorescence,³²³ ou un immunosystème permettant de détecter la 3-nitrotyrosine, la catalase et la superoxyde dismutase, également par le biais de la fluorescence.³²⁴

D'autres systèmes, basés sur des techniques séparatives sont également développés. Par exemple, le dosage de marqueurs du stress oxydant peut être réalisé en microsysteme par nano-chromatographie liquide avec une détection par spectrométrie de masse.³²⁵ Un autre dispositif, permettant la séparation de différentes espèces telles que l'acide ascorbique, les anions nitrite ou le peroxyde d'hydrogène a également été élaboré. La détection de ces espèces, par ampérométrie et après séparation, permet la caractérisation et la quantification de ces dernières

avec une forte sensibilité, mais n'apporte pas d'information sur la dynamique de la réponse cellulaire.³²⁶ L'application de microsystème à la détection électrochimique du stress oxydant est, à notre connaissance tout au moins, nettement plus rare. A ce titre, on peut mentionner le microsystème élaboré par Bedioui et al. qui permet la détection de NO^\bullet et ONOO^- simultanément et en temps réel. La détection de NO^\bullet se fait sur un réseau d'UME d'or modifiées par un film de polyeugénol et polyphénol à + 0,8 V vs Ag/AgCl, et la détection de ONOO^- se fait par un réseau d'UME d'or non modifiées à - 0,1 V vs Ag/AgCl pour suivre la réduction de ONOOH .³¹¹

V. Conclusions et perspectives

Le travail présenté dans cette partie concernait l'élaboration d'un microsystème permettant les mesures ampérométriques à quatre potentiels différents dans quatre chambres de mesures.

Les premières expériences, réalisées aux potentiels d'oxydation de H_2O_2 et NO_2^- ont permis de mettre en évidence la faisabilité de la méthode sur les dispositifs que nous avons conçus. Le bruit de fond du signal enregistré est inférieur à quelques nanoampères et le signal mesuré est au minimum, dans le cas des détections à + 400 mV vs Ag/AgCl, de 6 nanoampères. Grâce à leur bonne sensibilité, ces systèmes permettent la détection des ROS/RNS et démontrent en particulier que les différentes ROS/RNS ne sont pas émises avec la même cinétique. Cela reste à préciser mais apporte déjà un éclairage nouveau.

Ces travaux, satisfaisants d'un point de vue qualitatif, nécessitent cependant d'être complétés pour aboutir à une quantification précise des flux de chaque espèce. En effet, il sera essentiel de caractériser *in vitro* l'oxydation des deux autres espèces libérées lors du stress oxydant, d'une part pour déterminer leur potentiel d'oxydation, et d'autre part, pour ajuster le système d'équations permettant leur quantification (*Equations C-26 à C-29*) présenté précédemment en cas de recouvrement des vagues.

Pour cela, l'utilisation de solutions pures de NO^\bullet est assez délicate. En effet, elles nécessitent des précautions particulières, comme l'absence totale d'oxygène pour éviter toute réaction parasite qui risquerait de fausser les concentrations en solution. De même, il est très difficile d'obtenir des solutions de ONOO^- stables à moins de travailler en conditions alcalines. Ainsi, des donneurs de NO^\bullet , comme le DEA NONOate qui se décompose spontanément en solution à pH physiologique, et des donneurs de ONOO^- , tels que SIN-1 (3-morpholino-syndronimine) qui libère simultanément NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$, pourraient éventuellement être utilisés.³²⁷

Par ailleurs, lors des premières expériences, les canalisations et les chambres de mesures ont été substituées, pas souci de simplification, par un puits de PDMS. Dans ce cas, le remplacement du PBS par la solution de stimulation puis son changement par du PBS, nécessaire pour simuler la décroissance exponentielle du courant, entraîne de forte perturbation du signal recueilli. Ces mesures en chambres devraient être à même de minimiser ces perturbations et de mieux maîtriser la stimulation.

Conclusion générale

Conclusion générale & Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à l'étude de deux phénomènes biologiques majeurs que sont l'exocytose vésiculaire et le stress oxydant cellulaire. Ils ont été rendus possibles totalement ou en partie grâce à l'utilisation d'ultramicroélectrodes dont les propriétés (excellente sensibilité, temps de réponse très court), directement ou indirectement liées à leur taille micrométrique, permettent l'étude en temps réel de mécanismes de sécrétion. Cet outil électrochimique permet de suivre la dynamique de libération d'espèces à l'échelle de la cellule unique *via* leur oxydation (ou leur réduction) à la surface de l'électrode.

Cette technique, développée et utilisée au laboratoire depuis une quinzaine d'années est extrêmement performante. Nous avons alors cherché, dans un premier temps, à la compléter *via* la mise au point de nouveaux dispositifs de mesures, afin de répondre à certaines questions relatives au mécanisme d'exocytose, inaccessibles à l'ampérométrie seule, en la couplant avec une technique de fluorescence. Dans un second temps, nous avons exploré une voie susceptible d'améliorer sa mise en œuvre pratique lors de son application à l'étude du stress oxydant en l'intégrant dans un microsystème.

Le **deuxième chapitre** de ce manuscrit décrit ainsi l'ensemble des expériences réalisées pour coupler l'électrochimie à la microscopie de fluorescence. En effet, lors de la détection ampérométrique des événements d'exocytose sur ultramicroélectrodes, le capteur, placé dans le milieu extracellulaire, ne donne d'information sur la dynamique du mécanisme qu'une fois le pore de fusion formé et la libération débutée. La microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente, quant à elle, permet la visualisation du mouvement des vésicules avant la fusion et l'ouverture du pore de fusion. Nous avons donc développé un microsystème permettant de coupler ces deux types d'informations. Ce système, constitué de quatre électrodes de travail en ITO (matériau transparent et conducteur) sur lesquelles les cellules étudiées sont déposées, permet la détection d'un même événement exocytotique dans sa globalité au même endroit de la cellule avec deux techniques analytiques complémentaires. Nous avons démontré que le traitement de ces dispositifs avec du collagène (type IV), améliorant l'adhésion des cellules, ne gênait en rien la détection pour des concentrations de dépôt suffisamment faibles. Nous avons ensuite choisi d'étudier la sécrétion des cellules BON BC21 (cellules entérochromaffines), clones dont les vésicules sont fluorescentes et contiennent de la sérotonine, électroactive. Une étude ampérométrique de ce modèle nous a alors permis

d'établir qu'un chargement en sérotonine par électroporation permettait d'augmenter le contenu intravésiculaire et conduisait à des événements de quelques picoampères, alors détectables par électrochimie. Cependant, la détection ampérométrique, *via* l'oxydation des molécules à la surface de l'électrode, conduit à la formation de protons dans la bande limitée par la membrane cellulaire et l'électrode collectrice. Nous avons alors montré, par l'intermédiaire de simulations, que la quantité de molécules libérées par événement, combinée à une fréquence de sécrétion de l'ordre de 0,1 Hz pour ces cellules, n'entraînait pas une diminution notable du pH local entre l'électrode et la membrane cellulaire et ne perturbait donc pas le mécanisme de sécrétion. La dernière partie de ce chapitre présente les résultats du couplage où un événement unique est repéré simultanément sous la forme d'un flash (ou une extinction) de fluorescence et d'un pic ampérométrique, correspondant à la libération du contenu vésiculaire, montrant alors la validité de notre dispositif pour une analyse combinée de l'exocytose.

D'autres simulations ont montré qu'une fréquence de sécrétion et une quantité de molécules libérées plus élevées, comme c'est le cas par exemple des cellules chromaffines, n'étaient pas non plus limitantes pour la détection couplée de l'exocytose. Ainsi, utilisée sur cellules BON ou sur d'autres modèles cellulaires, la combinaison analytique proposée apportera de nouvelles informations quant au mécanisme d'exocytose. Elle permettra notamment d'étudier le comportement et les caractéristiques du pore de fusion en fonction du déplacement d'une vésicule, ou de manière plus générale, toute corrélation entre propriétés de la libération (vitesse, dimension et contenu vésiculaire) et localisation de la fusion. Cependant, avant toute étude, il sera nécessaire d'améliorer la résolution temporelle de la microscopie TIRF, limitée par la caméra, dans notre cas à 10 Hz, à une valeur de 100 Hz voire 1 kHz pour parfaitement décrire un événement d'exocytose (100 ms de moyenne pour les cellules BON, mais plus bref pour les cellules chromaffines). On notera enfin que ce microsysteme, délibérément orienté vers l'étude d'un phénomène biologique, pourra être à même d'étudier d'autres mécanismes plus physico-chimiques reliant transfert électronique et fluorescence.

Le **troisième chapitre** de ce manuscrit présente les expériences réalisées pour l'amélioration de la détection électrochimique du stress oxydant. La méthode jusque-là utilisée au laboratoire consiste à détecter par ampérométrie à potentiel constant les différentes espèces produites et libérées par une cellule à la surface d'une ultramicroélectrode de carbone platiné. Ce type d'expériences nécessite de travailler à quatre potentiels différents. Ainsi, pour obtenir une information statistique sur ces émissions de ROS/RNS, un grand nombre de manipulations doivent être effectuées afin de s'affranchir de la variabilité cellulaire et des légères différences de sensibilité des électrodes. Une première approche a précédemment été développée au

laboratoire pour pallier cet inconvénient. La détection chronoampérométrique à saut de potentiel permet en effet de détecter les espèces libérées par une seule cellule, mais cette technique manque de sensibilité pour suivre les variations de production d'espèces au cours du temps. Nous avons donc choisi, afin de minimiser le temps d'expérience, d'élaborer un microsystème permettant cette détection à quatre potentiels simultanément. Nous avons alors développé des dispositifs constitués de quatre chambres de mesures, chacune contenant un jeu de trois électrodes. Après avoir caractérisé, dans les chambres en question, l'oxydation *in vitro* de deux des espèces impliquées dans la réponse oxydative d'un macrophage, à savoir le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'anion nitrite NO_2^- , nous avons réalisé leur détection sur une population de cellules au sein d'un microsystème ouvert (dans un puits de PDMS).

Ces premières expériences nous ont permis de valider cette approche. Nous avons pu observer la production de ces espèces au cours du temps avec une excellente résolution temporelle. Nous avons remarqué que les potentiels d'oxydation de H_2O_2 et NO_2^- étaient légèrement différents dans nos microsystèmes (électrode de travail en platine et référence en argent chloruré) par rapport à leur détection sur UME de carbone platiné (référence ECSS). Il sera donc nécessaire de caractériser l'oxydation du peroxinitrite ONOO^- et du monoxyde d'azote NO^\bullet , participant également à la réponse oxydative des macrophages. Une fois les quatre potentiels d'oxydation optimaux déterminés, il sera possible d'établir un système d'équations permettant la quantification des quatre espèces. Enfin, les premiers résultats ont été obtenus en système ouverts. Des expériences en chambre permettront une stimulation plus douce et mieux maîtrisée. L'extension de ce système est bien sûr envisageable à d'autres cellules participant à la défense immunitaire et inflammatoire telles que les lymphocytes ou les fibroblastes, mais aussi à d'autres modèles cellulaires impliqués dans des mécanismes de sécrétion différents pourvu que les espèces libérées soient électroactives ou au test de molécules supposées exacerber ou atténuer les états de stress oxydant.

Partie D

Partie expérimentale

PARTIE D : Partie Expérimentale

I. Fabrication des électrodes et des microsystèmes pour l'étude de l'exocytose et du stress oxydant

I.I. Fabrication des ultramicroélectrodes à fibre de carbone

Certains travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés à l'aide d'ultramicroélectrodes de carbone. La construction manuelle relativement aisée de ce type d'électrode est effectuée au laboratoire à partir de fibres de carbone composées de 99% de carbone et 1% de résine époxy, commercialisées sous forme de bobines constituées de brins comportant environ 10 000 fibres de diamètre 7 ou 10 μm (Cytec, Thornel[®], référence P-55S, Blacksburg, Etats-Unis) (Figure D-1).

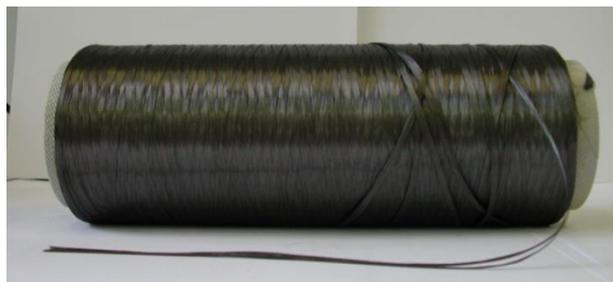


Figure D-1 : Bobine de fibres de carbone de diamètre 10 μm .

Les ultramicroélectrodes que nous utilisons sont constituées d'une fibre de carbone unique enchâssée à l'intérieur d'un capillaire de verre. Les différentes étapes de leur fabrication sont détaillées ci-dessous.

I.I.1. Isolement de la fibre de carbone

La première étape de fabrication des électrodes consiste à isoler une fibre unique du brin initial. Un brin d'environ 15 cm est coupé de la bobine et placé sur une feuille blanche. Le contraste avec le noir des fibres de carbone facilite ainsi la visualisation des fibres individuelles à l'œil nu. Ces fibres, extrêmement cassantes dans le sens de la largeur, sont au contraire, très rigides dans le sens de la longueur. Chaque fibre est alors séparée du brin en la faisant glisser dans le sens de la longueur.

Au cours de cette étape, il est important de ne pas disperser les fibres qui possèdent un caractère très irritant pour les yeux et le système respiratoire. Le port d'un masque est donc fortement recommandé pour s'en protéger.

I.1.2. Insertion de la fibre isolée dans un capillaire de verre

Une fois isolée, la fibre de carbone est aspirée dans un capillaire de verre, de diamètre interne 0,7 mm et de diamètre externe 1,2 mm (*Clark Electromedical Instruments, référence GC-120F-10, Pangbourne, Royaume Uni*). La particularité de ces capillaires est le filament de verre qu'ils contiennent. Ce filament facilitera plus tard le remplissage et le vidage du mercure lors des étapes suivantes de la fabrication. La fibre de carbone précédemment sélectionnée est insérée en connectant une extrémité du capillaire à une trompe à eau pour créer une dépression à l'intérieur de celui-ci. L'autre extrémité est approchée de la fibre qui glisse alors dans le capillaire. Pour éviter que la fibre ne traverse entièrement le capillaire, son extrémité libre est maintenue par simple pression du doigt, et n'est relâchée qu'une fois le capillaire déconnecté de la trompe à eau.

I.1.3. Fabrication de l'ultramicroélectrode de carbone

Après avoir vérifié la présence de la fibre de carbone dans le corps du capillaire à la loupe binoculaire (grossissement $\times 4$) (*Zeiss, référence Stemi 2000, Standort Göttingen-Vertrieb, Allemagne*), ce dernier est placé dans une microétireuse verticale (*Narishige, référence PB-7, New York, Etats Unis*) (*Figure D-2*) pour réaliser un scellement entre la fibre et le capillaire. L'extrémité supérieure du capillaire de verre est fixée à un bloc immobilisé, tandis que l'extrémité inférieure est attachée à un contrepoids mobile. La partie centrale du capillaire passe dans une bobine parcourue par un courant électrique générant par effet joule, une température suffisante pour faire fondre le verre. Le contrepoids tire alors l'extrémité inférieure entraînant l'amincissement puis la rupture du verre au centre.

A la fin de cette étape, la fibre de carbone est scellée au capillaire et la partie centrale de la fibre, mise à nu lors de l'étirage est coupée à l'aide d'une simple paire de ciseaux. Cette procédure permet ainsi d'obtenir deux électrodes identiques.

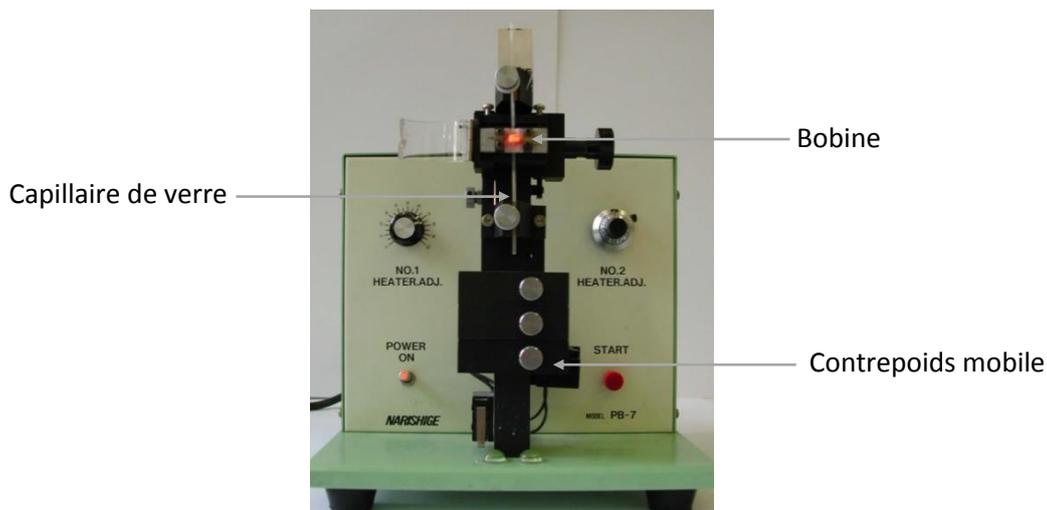


Figure D-2 : Microétireuse pendant l'étirage d'un capillaire contenant une fibre de carbone.

I.1.4. Isolation électrique des fibres de carbone

L'électrode obtenue est cylindrique alors que l'on souhaite une surface active de forme disque ou ellipse. La partie de la fibre de carbone dépassant du capillaire de verre doit donc être isolée électriquement afin de réduire le bruit électrique et pour que seule l'extrémité de la fibre (ultérieurement polie) soit conductrice. Cette isolation se fait par l'intermédiaire d'un dépôt de polyoxyphénylène par voie électrochimique. Avant l'électrodéposition, une petite quantité de mercure est introduite à l'aide d'une seringue dans chaque ultramicroélectrode par son « culot » pour assurer le contact électrique entre la fibre de carbone et le fil métallique utilisé pour la polymérisation. La présence du filament de verre à l'intérieur du capillaire permet de faire circuler l'air emprisonné et facilite ainsi le flux de mercure vers le bas de l'électrode. Cette technique, décrite par Wightman et al., repose sur le principe d'oxydation, sur la fibre de carbone, des monomères présents en solution.⁸

Les électrodes sont donc plongées dans une solution constituée de $0,23 \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-allylphénol, monomère, $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ d'allylamine, co-monomère et de $0,23 \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-butoxyéthanol, agent réticulant dans un mélange eau/méthanol (*Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*) (1/1).

	2-allylphénol	allylamine	2-butoxyéthanol	Eau/méthanol
Volume (mL)	3	3	3	91

Tableau D-1 : Volumes des composants de la solution de polymérisation à prélever.

La solution n'est stable qu'environ une heure, et sa préparation doit absolument respecter l'ordre suivant : quelques millilitres du mélange eau/méthanol sont d'abord placés dans un

bécher de 100 mL. Le 2-allylphénol est ajouté puis, l'allylamine, prélevée à l'aide d'une pipette en verre, et enfin, le 2 butoxyéthanol. Le reste du mélange eau/méthanol n'est ajouté qu'à la fin.

Une différence de potentiel de + 4 V est appliquée entre l'électrode de travail (l'UME) et une contre-électrode en platine pendant environ 3 minutes. De telles conditions conduisent à un dépôt de polyoxyphénylène d'une épaisseur de l'ordre du micron. Ensuite, l'électrode est rincée à l'eau et la présence de bulles de polymère sur la fibre, signe d'une bonne polymérisation et bonne isolation, est vérifiée à la loupe binoculaire. Il est possible de réaliser le dépôt sur cinq ou six électrodes de carbone simultanément. Les électrodes sont ensuite vidées de leur mercure et placées 3 heures à l'étuve à 150 °C afin d'évaporer le solvant, de réticuler le polymère, d'améliorer sa résistance mécanique, de réduire sa conductivité et ainsi le rendre totalement isolant. Après cette étape, les électrodes sont à nouveau remplies de mercure pour assurer le contact électrique lors de leur utilisation ultérieure sur cellules.

I.1.5. Polissage de la fibre de carbone

Le film polymère isolant, déposé sur l'ensemble de la fibre de carbone, empêche la conduction électrique. Il est donc nécessaire de faire apparaître une surface active conductrice (carbone nu). Les électrodes sont placées sous une loupe binoculaire, et leur fibre de carbone est coupée avec un scalpel entre deux bulles de polymère. Cette étape permet d'une part de faire apparaître une surface conductrice, et d'autre part de contrôler la longueur de la fibre qui, trop longue, est susceptible de vibrer lors des mesures et d'introduire une source de bruit supplémentaire. Pour que la surface active soit reproductible d'une électrode à l'autre, l'électrode est placée à 45° en contact avec une micropolisseuse munie d'un disque de résine diamantée (*Narishige, référence EG-4, New York, Etats Unis*) et dont la vitesse de rotation est fixée à 50 tr.min⁻¹. Après 5 minutes de polissage la face supérieure du capillaire de verre de l'électrode est marquée au feutre pour repérer la surface propre et elliptique de carbone conducteur (*Figure D-3*).

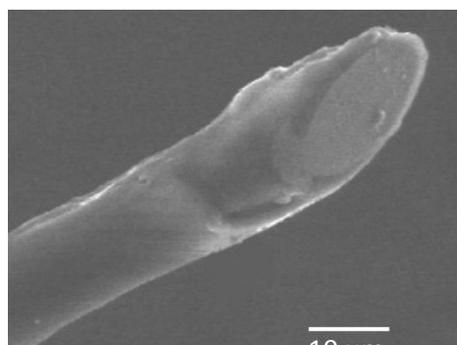


Figure D-3 : Photo en microscopie électronique à balayage d'une pointe d'une ultramicroélectrode à fibre de carbone de diamètre 10 µm.

I.1.6. Platination de la surface active

Les électrodes utilisées lors de la détection électrochimique des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) nécessitent une étape supplémentaire pour améliorer la sensibilité de détection. Un dépôt de noir de platine est alors effectué à la surface de l'électrode de carbone. Cette étape de platination, adaptée des travaux de Ikariyama et al.,³²⁸ se fait par électrodéposition. La solution utilisée est constituée de 1 mL d'acide hexachloroplatinique (H_2PtCl_6 , 8% wt dans l'eau, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1,6 mg d'acétate de plomb ($(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb}$, $3\text{H}_2\text{O}$, 99,9%, Sigma) dissous dans 6,4 mL de tampon phosphate PBS (Pastilles, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). L'acétate de plomb favorise le renouvellement de nouveaux germes de cristallisation et provoque le développement d'une surface dendritique très active électrochimiquement (Figure D-4).

Le processus d'électrodéposition consiste à appliquer un potentiel constant de - 60 mV entre l'électrode de travail (l'UME) et la référence (une électrode au calomel saturé en chlorure de sodium, ECSS). Le mécanisme de la réduction à quatre électrons de l'acide hexachloroplatinique sur la surface de carbone est le suivant :



D'après la loi de Faraday, la quantité d'électricité ayant traversé l'UME est proportionnelle à la quantité de platine électrodéposée. Le dépôt est arrêté quand le courant de réduction atteint une valeur déterminée (suivie par un potentiostat), correspondant à la charge déposée voulue en platine et généralement optimisée entre 5 et 30 μC (selon le mode de stimulation) pour la détection des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Lors de cette électrolyse, le courant de réduction mesuré augmente avec le temps car au cours de l'expérience, la surface active de l'UME augmente avec la quantité de platine déposée. Une fois platinée, l'électrode est conservée au réfrigérateur à + 4°C pour éviter une perte de sensibilité.

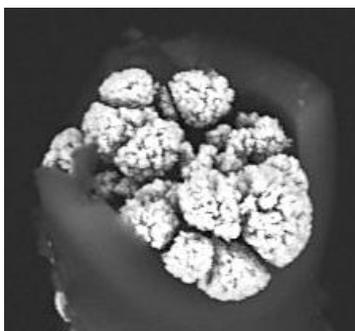


Figure D-4 : Photo en microscopie électronique à balayage d'une pointe d'une ultramicroélectrode à fibre de carbone platinée (diamètre 10 μm).

I.II. Fabrication des dispositifs pour la détection couplée du mécanisme d'exocytose

Les dispositifs utilisés lors du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie TIRF sont constitués d'électrodes conductrices et transparentes d'ITO microusinées sur un substrat de verre pour permettre une détection optique et électrochimique simultanée.

I.II.1. Préparation du substrat

Une lamelle de verre recouverte d'ITO par pulvérisation cathodique (épaisseur 100 à 150 nm ; résistance carrée $\leq 20 \text{ ohm.}\square^{-1}$; ACM, Villiers Saint Frédéric, France) est préalablement rincée à l'acétone puis à l'eau déionisée. Elle est ensuite séchée à l'air comprimé filtré puis traitée par plasma O_2 à 350 mTorr (100 W) (Harrick Plasma, New York, Etat Unis) pendant 1 minute pour éliminer toutes les poussières susceptibles de s'y être déposées.

I.II.2. Création des électrodes

La première étape de fabrication de ces dispositifs consiste à faire apparaître les électrodes d'ITO sur le substrat de verre. Elle est réalisée par photolithographie puis gravure chimique.

a) Motif des électrodes

Environ 1 mL de résine positive AZ 9260 (Clariant GmbH, Wiesbaden, Germany) est déposé sur le substrat verre/ITO (Figure D-5, étape 1). L'étalement de la résine se fait par « spin-coating » à 3800 tr.min^{-1} pendant 30 secondes avec une accélération de $500 \text{ tr.min}^{-1}.\text{s}^{-1}$. La résine subit ensuite un premier recuit à $110 \text{ }^\circ\text{C}$ sur une plaque chauffante pendant deux minutes pour évaporer le solvant, puis une insolation aux UV (900 mJ.cm^{-2}) à travers un masque (Figure D-5, étape 2). Le temps d'insolation est déduit de cette valeur à partir de la puissance de la lampe, donnée par le constructeur. La face imprimée du masque est placée contre la lamelle de verre pour optimiser la précision des contours. La résine est ensuite développée dans un mélange de développeur AZ 400K/eau (2/1) (Clariant GmbH, Wiesbaden, Germany) pendant 30 secondes, puis rincée à l'eau déionisée et séchée à l'air comprimé filtré (Figure D-5, étape 3). La présence du motif des électrodes en résine sur l'ITO est alors vérifiée au microscope.

b) Gravure chimique de l'ITO

La surface d'ITO non recouverte de résine protectrice est gravée chimiquement en trempant la lamelle dans une solution commerciale d'HCl (37 % en volume ; *Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*) pendant 6 à 7 minutes puis la résine est éliminée à l'aide d'acétone (*Figure D-5, étape 4*). La lamelle est ensuite rincée à l'eau déionisée puis séchée à l'air comprimé filtré. A la fin de cette étape, la lamelle est à nouveau traitée par plasma O₂ (350 mTorr) pendant 1 minute.

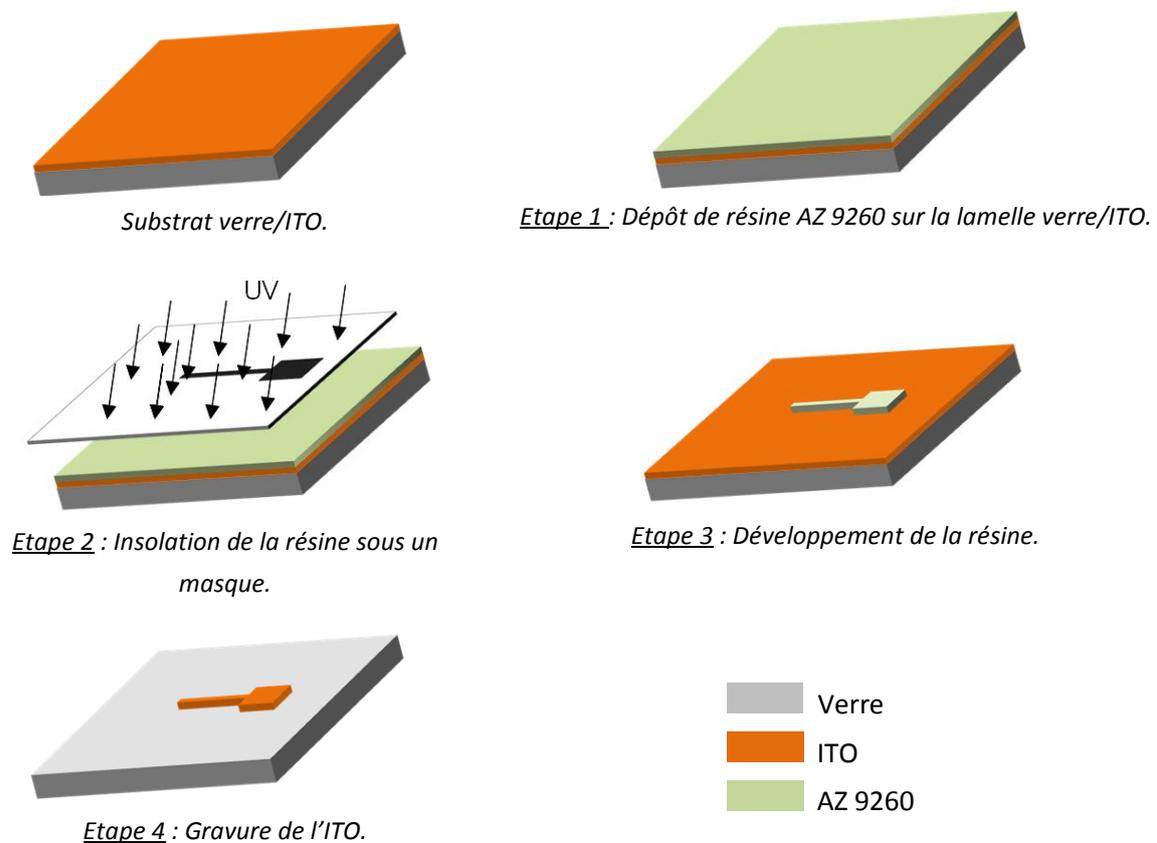


Figure D-5 : Création du motif des électrodes d'ITO : photolithographie et gravure chimique.

I.II.3. Isolation électrique des électrodes

La seconde étape de fabrication de ces dispositifs consiste à isoler électriquement une partie des électrodes d'ITO. Elle est réalisée par photolithographie.

Environ 1 mL de résine négative SU8 3010 (*MicroChem®*, *Newton, Etats Unis*) est déposé sur la lamelle (*Figure D-6, étape 1*). L'étalement se fait par « spin-coating » à 3000 tr.min⁻¹ pendant 30 secondes avec une accélération de 500 tr.min⁻¹.s⁻¹. La résine subit un premier recuit à 65 °C

pendant 2 minutes puis à 95 °C pendant 3 minutes pour évaporer le solvant. Le recuit est effectué en deux étapes car l'augmentation progressive de la température permet de limiter les contraintes mécaniques au sein de la SU8. La résine est ensuite insolée aux UV (100 mJ. cm⁻²) à travers un masque (*Figure D-6, étape 2*). L'alignement du second masque sur les motifs des électrodes présentes sur le substrat se fait manuellement. La résine subit ensuite un second recuit à 65 °C pendant 1 minute puis à 95 °C pendant 3 minutes, pour assurer sa polymérisation. La résine est ensuite développée en plongeant la lamelle dans un bain de PGMEA (Propylene Glycol Methyl Ether Acetate, Acétate de 2-méthoxy-1-méthyléthyle) (*MicroChem®*, *Newton, Etats Unis*) pendant 30 secondes (*Figure D-6, étape 3*). Le bain doit être agité manuellement pour faciliter la dissolution de la résine. A la fin de cette étape, la lamelle est rincée à l'isopropanol puis à l'eau afin de stopper le développement, et subit finalement un nouveau traitement au plasma O₂ pendant 1 minute à 350 mTorr.

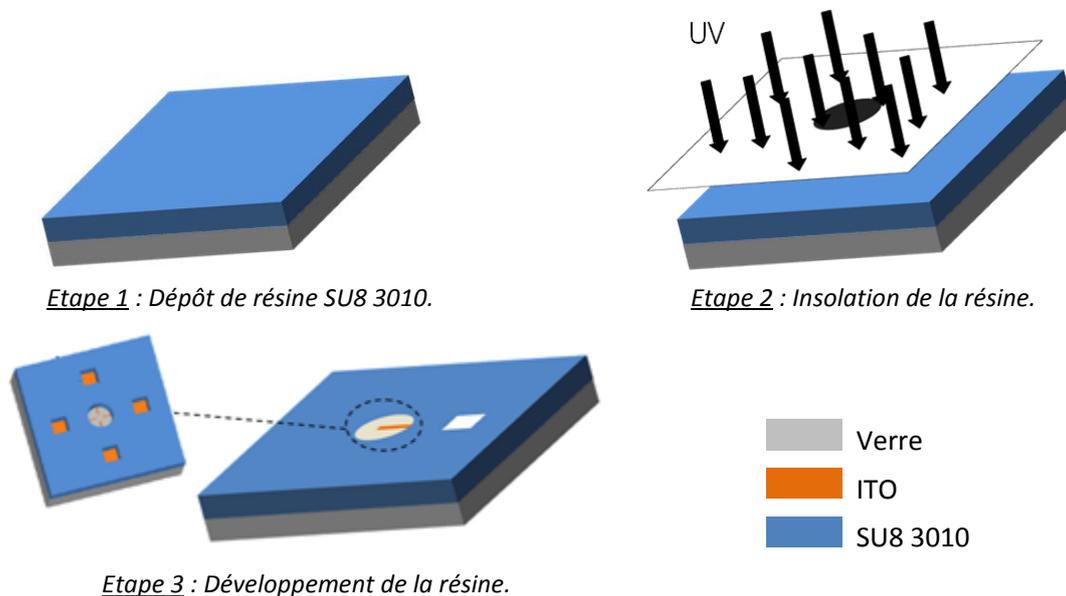


Figure D-6 : Isolation électrique d'une partie des électrodes d'ITO.

I.II.4. Connexion électrique des électrodes

Un fil conducteur est connecté à l'extrémité de chaque électrode à l'aide d'une laque d'argent (*Silver Conducting Paint, RS Component, Northants, Royaume Uni*), et le contact résultant est isolé à l'aide d'une colle époxy (*Mélange Résine/durcisseur, UHU, Bühl/Baden, Allemagne*). La laque d'argent et la colle époxy mettent respectivement 3 à 4 heures et 12 heures pour sécher à température ambiante. Le dispositif est ensuite fixé à une boîte de Petri à fond en verre non traité, compatible avec l'appareillage TIRFM (*MatTek Cultureware, P50G-1.5-14-F, Ashland, Etats Unis*) à l'aide d'une colle silicone (*Dow Corning®, 3140 RTV coating, Midland, Etats Unis*) (*Figure D-7*).

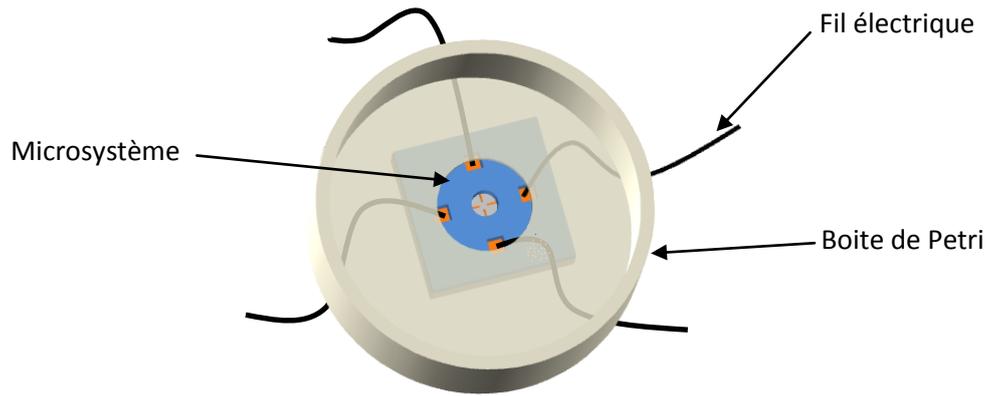


Figure D-7 : Schéma du dispositif de couplage.

I.II.5. Traitement du dispositif

Un dépôt de collagène est ensuite effectué sur la zone de travail du dispositif afin d'améliorer l'adhérence des cellules. 250 μL d'une solution de collagène (type IV) à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un mélange eau/éthanol (*Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*) (70/30) sont déposés au centre du dispositif. Après 3 heures d'évaporation, le dispositif est rincé avec 1 mL de PBS puis stocké à $+ 4^\circ\text{C}$ pendant maximum quelques jours.

I.III. Fabrication des microsystèmes pour l'étude du stress oxydant

La fabrication des microsystèmes pour la détection des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote est réalisée en 3 étapes : la création des électrodes, le dépôt de chlorure d'argent à la surface de l'électrode de référence et la préparation des canalisations.

I.III.1. Création des électrodes

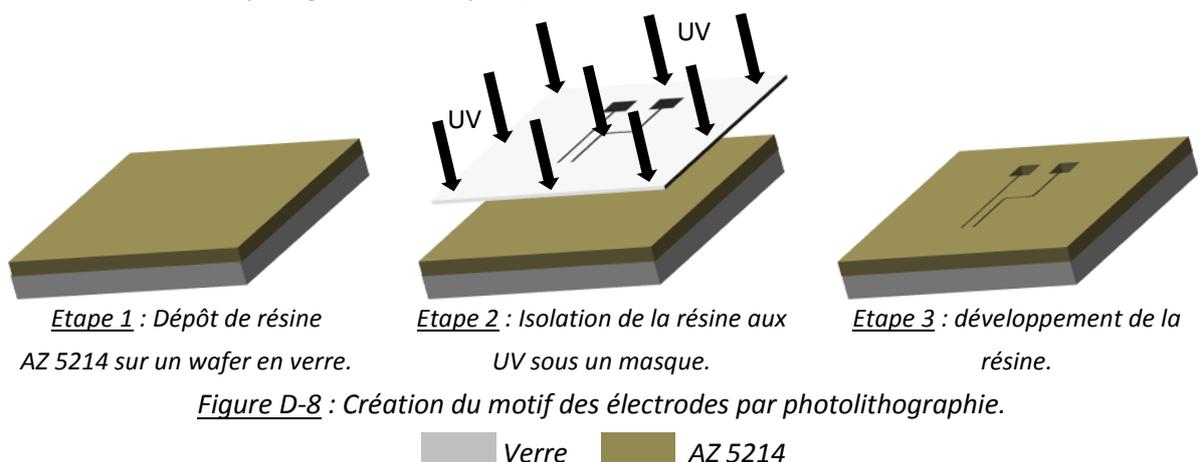
a) Préparation du substrat

Les dispositifs sont préparés sur un wafer en verre de 4 pouces (*ACM, Villiers Saint Frédéric, France*). Avant toute chose, le wafer est rincé à l'acétone puis à l'eau déionisée. Il est ensuite séché à l'air comprimé filtré puis traité par plasma O_2 à 350 mTorr pendant 1 minute pour éliminer toutes les poussières susceptibles de s'y être déposées.

b) Création du motif des électrodes

Les électrodes de travail et auxiliaires sont préparées simultanément car elles sont toutes les deux en platine. L'électrode de référence, en argent est fabriquée dans un second temps.

La résine utilisée pour cette étape de lithographie est une résine photosensible réversible, de type AZ 5214, qui présente la propriété de changer de polarité suite à une étape de recuit thermique d'inversion. 5 à 6 mL de résine AZ 5214 (*MicroChemicals GmbH, Ulm, Allemagne*) sont déposés sur le wafer en verre (*Figure D-8, étape 1*) à l'aide d'une pipette. L'étalement de la résine se fait par « spin-coating ». Pendant les 5 premières secondes de l'étalement, l'accélération est fixée à $500 \text{ tr.min}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et la vitesse, à 1500 tr.min^{-1} . Ensuite, la vitesse atteint 4000 tr.min^{-1} avec une accélération de $1000 \text{ tr.min}^{-1}.\text{s}^{-1}$, pendant 35 secondes. La résine subit un premier recuit à $125 \text{ }^\circ\text{C}$ sur une plaque chauffante pendant 1 minute et 45 secondes pour évaporer le solvant puis une insolation aux UV (120 mJ.cm^{-2}) à travers le premier masque (*Figure D-8, étape 2*), rendant ainsi la résine insolée soluble dans le développeur. Le masque en verre utilisé est placé, face vers le bas, dans le bâti d'un aligneur (*Karl SUSS MicrTech, EVG MJB4, Garching, Allemagne*). Le wafer subit ensuite un recuit d'inversion pendant 1 minute et 45 secondes à $125 \text{ }^\circ\text{C}$. Ce second recuit a pour but de durcir la résine précédemment insolée et de la rendre inerte au développeur. Le wafer est à nouveau insolé sous les UV (400 mJ.cm^{-2}), sans masque. Cette étape rend la résine auparavant masquée soluble dans le développeur. Le développement est réalisé pendant 20 secondes dans le développeur MIF 726 (*MicroChemicals GmbH, Ulm, Allemagne*). A la fin de cette étape, le wafer est rincé à l'eau déionisée et séché à l'air comprimé filtré. La présence du motif des électrodes « imprimées » dans la résine est alors vérifiée au microscope (*Figure D-8, étape 3*).



c) Métallisation des électrodes

La métallisation (*Figure D-9, étape 1*) se fait par pulvérisation cathodique magnétron (*Quorum technologies, Sputter K 675 XD, Ontario, Etats Unis*). Le wafer à métalliser est placé dans un

réacteur au sein d'une atmosphère raréfiée. Une différence de potentiel, appliquée entre la cible (le métal à déposer) et les parois du réacteur, permet la création d'un plasma froid, composé d'électrons, d'ions et de photons. Sous l'effet du champ électrique, les ions du plasma (Ag^+) sont attirés et entrent en collision avec la cathode (le métal à déposer). En transférant leur énergie, les ions provoquent la pulvérisation des atomes de la cathode qui, neutres, ne sont pas sensibles au champ magnétique, et se condensent sur le substrat (le wafer).

d) Révélation : « Lift-Off »

Une fois de dépôt métallique effectué, la résine est éliminée par « lift-off » : le wafer est placé dans un bain d'acétone pour dissoudre la résine (*Figure D-9, étape 2*). Cette révélation permet d'éliminer le métal déposé sur la résine et ne laisser que les électrodes en métal déposées directement sur le wafer en verre.

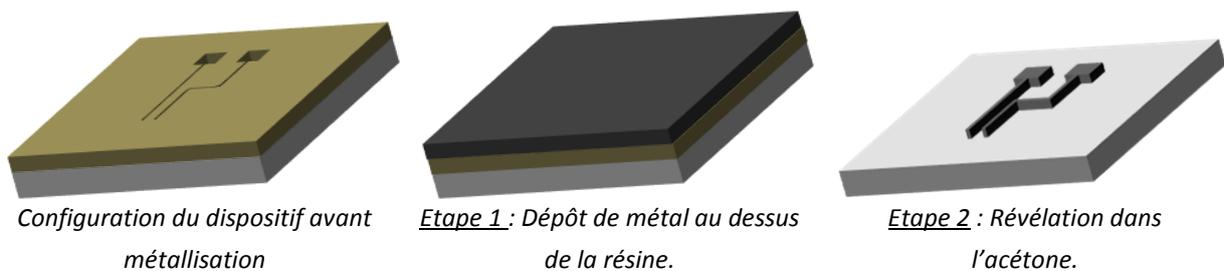


Figure D-9 : Méthode de métallisation et « lift-off ».

■ Verre ■ AZ 5214 ■ Métal

Ensuite, le procédé est à nouveau réalisé pour fabriquer les électrodes de référence. Lors de l'insolation sous le second masque, un aligneur est utilisé pour faire coïncider les deux niveaux. A la fin de ces deux étapes, les trois électrodes apparaissent sur le wafer en verre (*Figure D-10*).

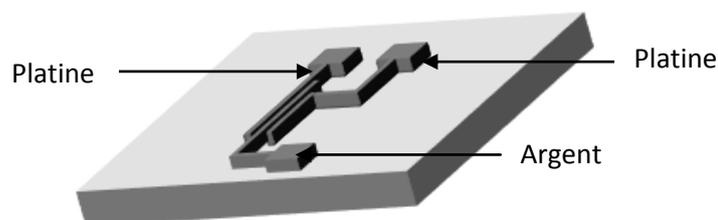


Figure D-10 : Configuration finale d'un dispositif.

■ Verre ■ Métal

I.III.2. Chloration des électrodes de référence

La chloration de l'électrode d'argent se fait par oxydation de l'électrode d'argent par une solution de chlorure de Fer (III). Cette méthode décrite par Polk et al. est très rapide et conduit à un dépôt stable.³²⁹ Un morceau de PDMS avec un puits d'environ 3 mm de diamètre est placé au dessus de l'électrode d'argent à chlorurer. La solution utilisée est composée de chlorure de fer (*Chlorure de fer (III) hexahydraté, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*) à 5 mmol.L⁻¹. Une goutte de la solution est placée dans le puits du PDMS puis retirée après 10 secondes. Le wafer est ensuite rincé à l'eau déionisée.

I.III.3. Connexion électrique des électrodes

Un fil conducteur est connecté à l'extrémité de chaque électrode à l'aide d'une laque d'argent (*Silver Conducting Paint, RS Component, Northants, Royaume Uni*), et le contact résultant est isolé à l'aide d'une colle époxy (*Mélange Résine/durcisseur, UHU, Bühl/Baden, Allemagne*).

I.III.4. Préparation des canalisations

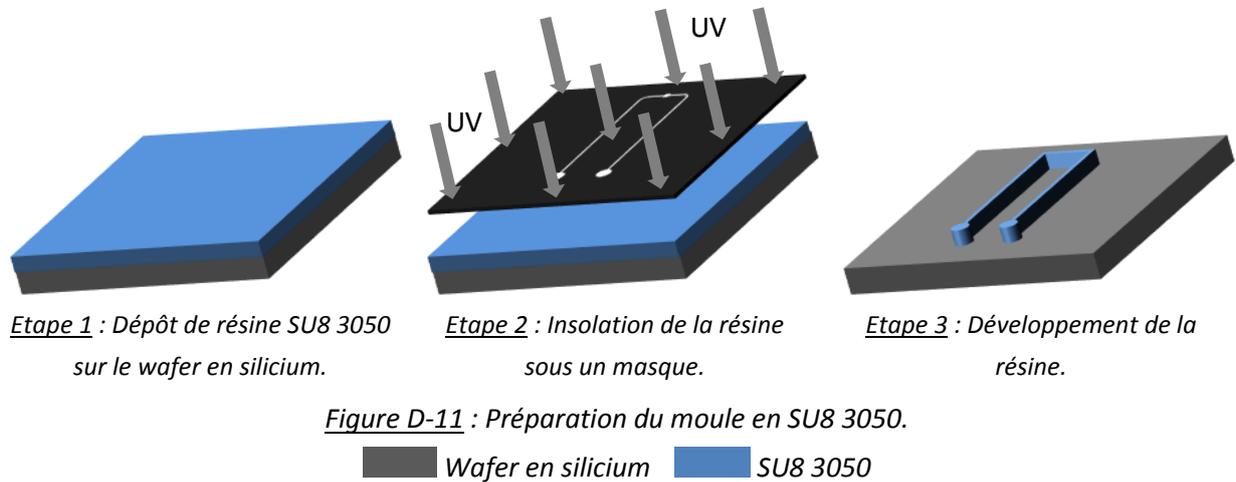
La préparation des canalisations et de la chambre de mesure se fait en deux étapes : la création d'un moule représentant en négatif la structure voulue puis la fabrication des canalisations proprement dites en PDMS, ce dernier étant « coulé » dans la structure négative lors de la dernière étape.

a) Préparation du moule

Dans un premier temps, un wafer en silicium (*ACM, Villiers Saint Frédéric, France*) est rincé à l'acétone puis à l'eau déionisée. Il est ensuite séché à l'air comprimé filtré puis traité par plasma O₂ à 350 mTorr pendant 1 minute. Une fois propre, le wafer est placé sur la tournette et 8 mL de résine SU8 3050 (*MicroChem®, Newton, Etats Unis*) y sont déposés à l'aide d'une pipette (*Figure D-11, étape 1*).

L'étalement de la résine se fait par « spin-coating » avec les paramètres suivants : pendant les 10 premières secondes de l'étalement, l'accélération est fixée à 100 tr.min⁻¹.s⁻¹ et la vitesse, à 500 tr.min⁻¹.s⁻¹. Ensuite, l'étalement est réalisé à 3000 tr.min⁻¹ pendant 30 secondes avec une accélération de 300 tr.min⁻¹.s⁻¹. La résine subit un premier recuit pendant 5 minutes à 65°C puis

15 minutes à 95°C. Elle est ensuite insolée aux UV (300 mJ.cm^{-2}) (Figure D-11, étape 2). La résine subit un second recuit pendant 2 minutes à 65°C puis 5 minutes à 95°C. Le développement est réalisé pendant 4 minutes dans un bain de PGMEA puis le wafer est rincé à l'isopropanol, à l'eau puis séché à l'air comprimé (Figure D-11, étape 3).

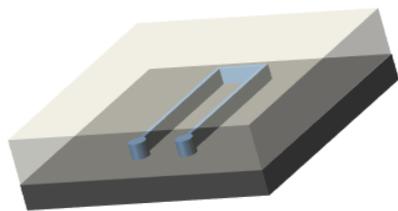


b) Préparation des canalisations en PDMS

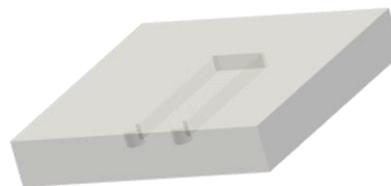
Le moule est ensuite mis en présence de TMCS (triméthylchlorosilane) (*Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*). Pour ce faire, il est placé dans une boîte de Petri (diamètre environ 14 cm) (*Nunc, Roskilde, Danemark*). Sur le couvercle de cette boîte, une ou deux gouttes de TMCS sont déposées. La boîte est ensuite fermée pendant 15 minutes pour permettre à une couche moléculaire de TMCS de se déposer à la surface du moule qui facilitera par la suite le démoulage du PDMS.

Le PDMS est obtenu en mélangeant un monomère, le diméthylsiloxane et un agent réticulant. Les deux composés sont alors mélangés dans les proportions 10/1 pour obtenir un polymère mou et transparent (30 g de diméthylsiloxane et 3 g d'agent réticulant). Le mélange est placé dans une centrifugeuse (*Uni-cyclone, Unix, référence UM-103S, Japon*) et subit trois cycles de 30 secondes à 800 tr.min^{-1} espacés de 20 secondes. Le mélange est ensuite versé dans la boîte de Petri sur le moule (Figure D-12, étape 1). L'ensemble est placé sous vide afin de faire disparaître les bulles d'air puis à l'étuve à 75°C pendant 2 heures pour permettre la réticulation du PDMS.

Le PDMS est ensuite facilement démoulé (Figure D-12, étape 2) et percé au niveau de l'entrée et de la sortie des canalisations pour créer la connexion du dispositif avec l'extérieur. Il est ensuite collé au dispositif de façon réversible, par simple mise en contact (il existe une affinité entre le PDMS et le verre).



Etape 1 : Dépôt du PDMS sur le moule en SU8.



Etape 2 : Démoulage du PDMS.

Figure D-12 : Préparation des canalisations en PDMS.



II. Techniques analytiques utilisées pour l'étude de systèmes biologiques

Il existe de nombreuses méthodes d'étude des mécanismes biologiques et parmi ces techniques, les principales utilisées dans cette thèse et décrites ci-dessous, sont basées sur des mesures électriques (ampérométrie stationnaire, voltammétrie cyclique) ou optiques (microscopie de fluorescence).¹⁸⁵ Dans le cadre de ce travail, la voltammétrie a permis d'étudier *in vitro* le comportement électrochimique ainsi que la réactivité d'espèces susceptibles d'intervenir dans ces processus biologiques envisagés *ex vivo* sur cellule unique. Cette technique nous a également permis d'étudier le comportement électrochimique des électrodes utilisées. L'ampérométrie a été employée afin de détecter spécifiquement les espèces libérées par les cellules vivantes *ex vivo*. Enfin, la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente a été utilisée pour visualiser les événements d'exocytose en temps réel.

II.1. Techniques électrochimiques

II.1.1. La voltammétrie

D'un point de vue pratique, la technique voltammétrique la plus courante consiste à appliquer à l'électrode de travail un potentiel variant linéairement avec le temps. Le balayage de potentiel se fait à une vitesse constante nommée « vitesse de balayage », et est appliqué entre l'ultramicroélectrode (électrode de travail) et l'électrode de référence par le potentiostat. Simultanément, la variation du courant en fonction du temps est mesurée. Le balayage en potentiel peut être simple ou cyclique en fonction du but de l'étude électrochimique.

Le potentiel initial est choisi de façon à être suffisamment éloigné du domaine d'électroactivité du composé à tester pour que les courants d'oxydation ou de réduction soient négligeables en

début de balayage et ainsi permettre uniquement la mesure du courant de fond correspondant au courant capacitif de décharge de l'électrode et à l'électroactivité du solvant ou milieu tampon. Dans le cas de la réduction par exemple, plus le potentiel diminue, plus la vitesse de réduction du composé étudié augmente et par conséquent, plus le courant cathodique augmente. A partir d'un certain potentiel, la vitesse de disparition du composé devient trop grande, sa concentration à la surface de l'électrode tend à s'annuler et le courant de réduction, seulement fonction de la vitesse de diffusion du composé vers la surface de l'électrode, diminue. Lorsqu'on inverse le sens de balayage du potentiel à partir du potentiel final, le produit formé par réduction du produit de départ et dont la concentration au voisinage de l'électrode est devenue importante, va alors être oxydé. On mesure alors un courant anodique de sens opposé au courant de réduction, qui va lui aussi atteindre un maximum avant de revenir à la valeur du courant de base.

En régime transitoire, les voltammogrammes représentant la variation du courant en fonction du potentiel appliqué présentent des caractéristiques liées à l'existence d'une couche de diffusion plane à la surface de l'électrode qui dépend de la vitesse de balayage. Dans le cas des ultramicroélectrodes, un régime de diffusion stationnaire peut être atteint sans nécessairement imposer de la convection au système électrochimique. En effet, en dessous d'une certaine vitesse de balayage, en général de l'ordre d'une centaine de millivolts par seconde, qui dépend du rayon r_0 de l'électrode, du coefficient de diffusion D de l'espèce étudiée dans le milieu ou encore de la température, la couche de diffusion devient hémisphérique et de diamètre nettement supérieur à celui de l'électrode. Le régime de diffusion devient alors stationnaire et le voltammogramme en résultant est modifié. Il est caractérisé par l'absence de pics et une forme de S dont la hauteur maximale, dite « de plateau », est un courant limite de diffusion indépendant de la vitesse de balayage et du temps. La valeur de ce courant de plateau, directement proportionnelle à la concentration du composé étudié, permet de déterminer la valeur du potentiel à partir de laquelle la réduction ou l'oxydation du composé étudié est certaine.

II.1.2. L'ampérométrie à potentiel constant

Cette technique électrochimique est utilisée dans les mesures sur cellules vivantes et consiste à appliquer un potentiel fixe à l'électrode de travail (l'UME) et à suivre l'évolution du courant en fonction du temps. Le potentiel est choisi de façon à mesurer le courant d'oxydation (ou de réduction) de l'espèce étudiée (potentiel défini en voltammétrie cyclique lorsque le courant de plateau est atteint). Cette technique ne présente pas de réelle spécificité de détection dans le sens où elle permet la détection simultanée de toutes les espèces électroactives s'oxydant (ou se réduisant) au potentiel fixé. Le principal avantage de cette technique est d'offrir une très grande

sensibilité de détection sans traitement du signal. En effet, le courant détecté n'est dû qu'à la réaction électrochimique (courant faradique) et n'est pas perturbé par le courant capacitif dû à l'établissement de la double couche électrochimique à l'interface métal/solution dans le cas des UME (la polarisation d'une UME de carbone étant de l'ordre de la dizaine de milliseconde).

a) Détection des espèces libérées lors de l'exocytose

Le potentiostat utilisé pour la détection de l'exocytose (*Tacussel Radiometer, AMU 130, Villeurbanne, France*) a été spécialement conçu pour la détection de courants faibles. Il est alimenté sur pile et directement placé dans la cage de Faraday. Après modification par un électronicien, le temps de réponse est devenu inférieur à 50 microsecondes sans augmentation significative du bruit. Les pics ampérométriques sont visualisés par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition qui possède une fréquence d'échantillonnage réglable jusqu'à 0,2 MHz réglée dans notre cas à 40 kHz (*ADInstrument, Powerlab 4SP, Colorado Springs, Etats Unis*), couplée à un logiciel permettant le traitement du signal (*ADInstrument, Chart version 4.2, Colorado Springs, Etats Unis*). L'électrode de travail est une UME à fibre de carbone de diamètre 10 μm et la référence utilisée est Ag/AgCl. La détection des espèces libérées lors de l'exocytose des cellules BON est réalisée à + 650 mV vs Ag/AgCl. Les pics ampérométriques obtenus sont exportés manuellement un à un depuis le logiciel Chart dans le tableur Excel par simple « copier/coller ». Chaque pic doit être isolé dans un fichier unique en format texte et l'ensemble des fichiers est ensuite traité par un programme d'extraction mis au point au laboratoire.

b) Détection des espèces émises lors du stress oxydant

Lors de l'étude du stress oxydant sur UME de carbone platiné, le potentiostat utilisé (*Tacussel Radiometer, AMU 130, Villeurbanne, France*) permet la détection en temps réelle des ROS/RNS à potentiel constant. La référence est une électrode au calomel saturé en chlorure de sodium (le potassium des électrodes classiques au calomel saturé en KCl est responsable de la dépolarisation membranaire). Les potentiels, + 300, + 450, + 650 and + 850 mV vs ECSS choisis pour l'analyse correspondent aux potentiels de plateau obtenus pour des solutions indépendantes de H_2O_2 , ONOO^- , NO^\bullet et NO_2^- . Le signal ampérométrique est enregistré sur un ordinateur relié à un convertisseur analogique/digital (*ADInstrument, Powerlab 4SP, Colorado Springs, Etats Unis*), couplé à un logiciel (*ADInstrument, Chart version 4.2, Colorado Springs, Etats Unis*). Dans le cas de l'étude avec les microsystèmes les potentiels sont fixés par le potentiostat (*Quadstat 4 voies, EDAQ, Claix, France*) à + 400 et + 850 mV avec Ag/AgCl comme référence et le

système est enregistré par l'intermédiaire d'un convertisseur analogique/numérique (Ecoder, Edaq, Claix, France).

La polarisation d'une UME de carbone platiné ou d'une UME de platine peut-être longue et le courant peut mettre plusieurs dizaines de secondes pour retourner à la ligne de base. Ainsi, la décroissance exponentielle de la ligne de base est soustraite au signal au moyen d'un programme développé au laboratoire.

II.1.3. Les électrodes de référence

Le choix de l'électrode de référence dépend du mécanisme étudié. Dans le cas de l'étude de l'exocytose, l'électrode utilisée est une référence pseudo Ag/AgCl. En effet, son potentiel est flottant car il varie en fonction de la concentration en chlorure de Locke x 1 qui est susceptible d'être légèrement modifiée au cours des analyses. Le potentiel de l'électrode de travail par rapport à cette référence est fixé sur la valeur du plateau d'oxydation des espèces à détecter et il n'est pas nécessaire d'avoir un contrôle très fin de ce potentiel. A l'inverse, lors de l'étude du stress oxydant, le potentiel fixé entre l'électrode de travail et la référence doit être contrôlé très précisément afin de discriminer les différentes espèces libérées par la cellule. Dans ce cas, l'électrode de référence utilisée est une électrode au calomel saturé en chlorure de sodium.

a) L'électrode Ag/AgCl

Cette électrode, utilisée dans un montage à deux électrodes pour la détection des espèces libérées par exocytose des cellules BON, présente l'avantage d'être de petite taille et de forme modulable. Elle est constituée d'un fil d'argent métallique (*Goodfellow, référence AG005160/22, Lille, France*) de 1 mm de diamètre sur lequel du dépôt de chlorure d'argent est réalisé.

Pour ce faire, une solution de chlorure de sodium 1 mol.L^{-1} est électrolysée en appliquant une différence de potentiel de + 15 V entre le fil d'argent (anode) et un fil de platine (cathode) pendant quelques secondes. A la surface de l'électrode, l'argent métallique est oxydé en Ag^+ et forme un précipité AgCl solide avec les ions Cl^- présents en solution. Le potentiel de cette électrode de référence est constant lors des mesures (malgré son utilisation en contre-électrode dans un montage à deux électrodes) étant donné sa grande taille et la faible quantité de charges consommées (par comparaison avec l'UME).

b) L'électrode au calomel saturé en chlorure de sodium : ECSS

Cette électrode, notée ECSS est utilisée dans le cadre de la détection ampérométrique des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote émises lors du stress oxydant chez les macrophages RAW 264.7.

C'est une électrode de type calomel saturé (*Tacussel Radiometer, TR 100, Villeurbanne, France*) dans laquelle le chlorure de potassium (KCl) est remplacé par du chlorure de sodium (NaCl). En effet, le KCl présente une toxicité ou tout au moins un effet dépolarisant vis-à-vis des cellules en modifiant leur potentiel membranaire et donc les échanges ioniques transmembranaires. La différence de potentiel entre l'électrode au calomel saturée en NaCl et celle saturée en KCl est de + 5 mV.

II.II. Technique optique : la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente (TIRFM)

La microscopie de fluorescence à onde évanescente permet de n'exciter la fluorescence des vésicules observées que sur une très faible profondeur de champ (de l'ordre de 50 à 300 nm).

Le système de microscopie TIRF utilisé au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Sécrétion de l'IBPC est constitué d'un microscope droit (*Olympus, référence BX50WI, Etats Unis*) modifié pour permettre une excitation de la fluorescence par onde évanescente.²²³

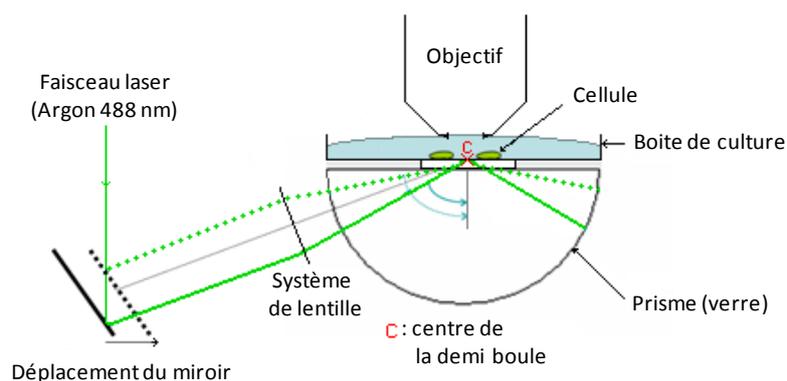


Figure D-13 : Schéma du montage expérimental utilisé lors des analyses en microscopie TIRF.

Lors des observations, une boîte de culture à fond en verre sur laquelle les cellules sont cultivées est couplée optiquement avec la surface plane d'un prisme hémisphérique en verre BK7 en

utilisant de l'huile à immersion (*Zeiss, référence 518 C, Standort Göttingen-Vertrieb, Allemagne*). Le faisceau laser permettant de générer l'onde évanescente (longueur d'onde 488 nm) est issu d'un laser à argon (*Spectra Physics, référence 177-G02, Newport, Etats Unis*). Après avoir pénétré le prisme hémisphérique, ce faisceau est réfléchi totalement au niveau de l'interface substrat/cellule, créant ainsi une onde évanescente dans le milieu cellulaire. La fluorescence est collectée à l'aide d'un objectif à immersion à eau (*grossissement 60x, ouverture numérique 0,9, Olympus, Etats Unis*). L'acquisition d'images est réalisée à l'aide d'une caméra CCD (Fréquence d'acquisition : 10 Hz ; *Roper Scientific, CoolSnap HQ, Photometrics, Friedland, Allemagne*) pilotée par le logiciel Metaview (*Universal Imaging Corporation, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, Etat Unis*). Dans ces conditions d'observations, un pixel correspond à 107,5 nm sur les images obtenues.

II.III. Mesure de l'exocytose

II.III.1. Détection de la sérotonine lors de l'exocytose des cellules BON par ampérométrie sur UME de carbone

a) Préparation des cellules pour la mesure

Les cellules BON sont cultivées en flasques. La veille de l'expérience, les cellules, à 80-90% de confluence sont décollées des flasques et placées en boîte de Petri. Pour cela, le milieu de culture est aspiré de la flasque de culture, et les cellules sont rincées deux ou trois fois avec 10 mL de PBS. Ensuite, 1 mL de trypsine/EDTA est ajouté dans la flasque pour décoller les cellules. L'action de la trypsine est améliorée lorsque la flasque est placée une ou deux minutes à 37 °C. En tapant sur le fond de la boîte, les cellules les mieux adhérentes se décollent également. Cette étape ne doit pas dépasser trois minutes car la trypsine digère la membrane cellulaire et fragilise les cellules. Une fois les cellules décollées, la trypsine est neutralisée par dilution en ajoutant 9 mL de milieu de culture. Ensuite, 6 mL de cellules alors en suspension sont prélevés et placés dans 6 boîtes de Petri (1 mL par boîte). 2 mL de milieu supplémenté en sérotonine ($C_{\text{sérotonine}} = 300 \mu\text{mol.L}^{-1}$) sont ensuite ajoutés dans chaque boîte de Petri pour assurer le chargement passif des vésicules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 18 à 24 heures.

Lors de l'analyse ampérométrique des cellules électroporées, le protocole d'électroporation, décrit par la suite dans le paragraphe *II.III.2. Etude de l'exocytose des cellules BON par le couplage de l'ampérométrie sur UME d'ITO et de la microscopie TIRF*, est réalisé une fois les cellules décollées du fond de la flasque de culture.

b) Préparation des capillaires de stimulation

Les capillaires de verre (*Clark Electromedical Instruments, référence GC- 120-10, Pangbourne, Royaume Uni, revendeur Phymep, Paris XIII*) utilisés pour la stimulation ont un diamètre interne de 0,7 mm et de diamètre externe de 1,2 mm. Ils sont fabriqués par étirement à chaud par la même étireuse que celle utilisée pour préparer les UME de carbone. Une fois étirés, leur pointe est polie pour créer l'ouverture par laquelle la solution de stimulation sera injectée. Pour ce faire, ils sont placés à 45° en contact avec la micropolisseuse sous un flux d'eau constant afin d'évacuer les débris de verre et éviter de boucher le capillaire. Ce flux d'eau permet également de mettre en évidence l'ouverture du capillaire par visualisation de l'eau qui monte par capillarité dans la pointe. Le diamètre du capillaire convenable (environ 1 μm) est vérifié au microscope.

c) Mesures sur cellules BON

Lors de l'étude de la sécrétion des cellules BON par ampérométrie sur UME de carbone, le milieu de culture est aspiré de la boîte de Petri. La boîte est ensuite rincée puis remplie avec 3 mL de Locke x 1 supplémenté en calcium et magnésium (cf. III.II. *Solutions et milieux de cultures*) pour l'analyse. La boîte de Petri est placée sur la plateforme d'un microscope inversé (*Zeiss, Axiovert 135, Standort Göttingen-Vertrieb, Allemagne*). La référence Ag/AgCl est connectée au potentiostat et positionnée sur le bord de la boîte de Petri de façon à ce qu'elle ne gêne pas le champ de vision du microscope et qu'elle ne touche ni l'UME ni le capillaire de stimulation.

Après avoir fait la mise au point sur le fond de la boîte de Petri, le choix de la cellule à étudier est facilité en déplaçant la plateforme mobile sur laquelle la boîte est déposée. La cellule choisie doit être isolée des autres afin que la mesure ne soit pas faussée par la réponse de plusieurs cellules. Sa morphologie doit être celle habituellement observée pour ce type de cellule : dans le cas des cellules BON, elle doit être ronde et bleutée.

Le capillaire de verre est ensuite rempli de solution de stimulation (ionomycine 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) à l'aide d'une seringue de 1 mL par son « culot » puis relié à un compresseur (*Femtojet, Eppendorf, Bâle, Suisse*) qui peut délivrer sa pression maximale en une fraction de seconde. Ainsi, la vérification de l'ouverture du capillaire peut être effectuée hors montage, le flux sortant est visible à l'œil nu.

L'UME et le capillaire de stimulation sont ensuite positionnés, à 45° par rapport à la plateforme du microscope, sur des bras contrôlés par des macro- et micromanipulateurs (*Narishige,*

référence MN-2, New York, Etats Unis). L'UME est plongée dans le tampon de Locke x 1 supplémenté en calcium et magnésium puis placée au dessus de la cellule choisie, en quasi-contact (< 1 micron), de façon à collecter un maximum des molécules émises. Le capillaire de stimulation est positionné à environ 10 µm de la cellule. L'acquisition et l'injection d'ionomycine (entre 100 et 200 hPa selon l'ouverture du capillaire, pendant 30 secondes) sont déclenchées simultanément.

II.III.2. Etude de l'exocytose des cellules BON par le couplage de l'ampérométrie sur UME d'ITO et de la microscopie TIRF

48 heures avant les expériences, les cellules BON, à 80-90 % de confluence sont décollées de la flasque de culture et déposées sur les dispositifs.

a) Préparation des cellules pour les mesures : électroporation

Plusieurs modèles cellulaires de la lignée BON ont été étudiés. Les cellules BON BC21 expriment constitutionnellement une sonde fluorescente alors que ce n'est pas le cas de cellules BON N13. Pour ces deux modèles cellulaires, il est nécessaire d'augmenter la quantité de sérotonine contenue dans leurs vésicules. Cependant, l'incorporation d'une sonde fluorescente n'est nécessaire que dans le cas des cellules BON N13. Selon le modèle cellulaire, l'intégration de sérotonine et/ou de l'expression d'une sonde fluorescente sont réalisées par électroporation.

Dans les différents cas, le principe et les paramètres de la manipulation sont les mêmes. Seuls les éléments transfectés changent. Dans le premier cas, deux plasmides sont transfectés simultanément. Le premier contient la protéine NPY-eGFP qui correspond à la fusion entre le neuropeptide Y (NPY) humain et la protéine fluorescente eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Le neuropeptide permet d'insérer spécifiquement la sonde fluorescente GFP dans les granules de sécrétion. Le second contient le transporteur de monoamine bvmat 1 (bovine vesicular monoamine transporter 1) qui facilite le chargement des vésicules en sérotonine. Dans le second cas, des molécules de sérotonine sont électroporées directement en présence de sérotonine sans utiliser de transporteur spécifique.

L'électroporation permet d'introduire de façon simple, rapide et efficace de grosses molécules à l'intérieur de la cellule. Elle consiste à appliquer des impulsions électriques contrôlées sur des cellules vivantes afin de perméabiliser la membrane cellulaire. Ces impulsions électriques entraînent la formation de pores qui favorisent l'entrée de molécules telles que l'ADN ou les protéines.

Dans un premier temps, la quantité de cellules requise (entre 1,5 et 3 millions) est collectée à partir d'une flasque de culture : le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées abondamment avec du PBS. Cette étape permet d'enlever toute trace de sérum foetal de veau contenu dans le milieu de culture qui pourrait réagir avec la trypsine ajoutée ultérieurement. Les cellules sont ensuite décollées du fond de la flasque par l'action de 1mL de trypsine/EDTA pendant 3 minutes. La trypsine est ensuite neutralisée avec 9 mL de milieu de culture. Les cellules en suspension sont ensuite centrifugées 10 minutes à 800 tr.min^{-1} . Le surnageant est aspiré et le culot repris dans 200 μL de PBS. Les cellules sont ensuite mélangées, dans le premier cas, aux deux ADN plasmidiques à transférer (1 μg de NPY-eGFP et 4,0 μg de bvmat 1 pour 50 μL de la suspension cellulaire) et, dans le second cas, à 10 μL de sérotonine à $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La goutte de 50 μL est ensuite déposée entre les électrodes d'un électroporateur (distance entre les électrodes : 0,5 cm ; Jouan, Thermo Electron Corporation, Woburn, Etats Unis) aux bornes desquelles une tension de + 250 V est appliquée sous forme de 8 impulsions de 3 ms chacune avec une fréquence de 1 Hz.

Les cellules sont ensuite reprises dans 20 mL de milieu de culture supplémenté en sérotonine puis réparties dans les dispositifs, utilisés pour les observations en microscopie TIRF. Elles sont observées 48 heures après l'électroporation. Ce délai permet une expression suffisante de la sonde NPY-eGFP à l'intérieur des granules de sécrétion ainsi qu'une bonne adhérence des cellules sur les dispositifs.

b) Mesures sur cellules BON

Lors des expériences de couplage, le milieu de culture d'un dispositif est aspiré. La boîte est ensuite rincée puis remplie avec 3 mL de Locke x 1 supplémenté en calcium et magnésium. Le dispositif est placé sur la plate forme du microscope TIRF droit. La référence Ag/AgCl est connectée au potentiostat.

La profondeur d'évanescence choisie est de 100 nm à 150 nm permettant à la fois d'obtenir un rapport signal sur bruit suffisant et de limiter la diffusion de l'onde évanescente. Après avoir fait la mise au point sur le fond de la boîte de Petri, la cellule à étudier est choisie en déplaçant la plateforme mobile sur laquelle le dispositif est déposé. La cellule sélectionnée doit être isolée des autres pour éviter toutes interférences, adhérente sur une électrode bande et posséder des granules de sécrétion suffisamment nombreux et bien visibles en TIRFM, et également suffisamment mobiles, signe de « bonne santé » de la cellule. Compte tenu du nombre de cellules répondant à ces caractéristiques, environ 5 cellules sont étudiées par dispositif.

Une fois la cellule sélectionnée, l'électrode bande correspondante est connectée au potentiostat et le capillaire de stimulation, rempli de solution d'ionomycine ($C_{\text{ionomycine}} = 5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) est placé sur un bras à 45° par rapport à la plate forme du microscope puis positionné à une dizaine de microns de la cellule. La stimulation consiste en un flux continu de solution d'ionomycine envoyé au voisinage de la cellule à l'aide d'un pousse-seringue ($100 \mu\text{L. min}^{-1}$). Les acquisitions optique et ampérométrique sont déclenchées simultanément à la stimulation, et durent 1 minute.

II.IV. Mesures du stress oxydant dans un microsysteme

Lors de l'étude du stress oxydant dans les microsystemes, un potentiostat à 4 voies (Picostat, EDaq, Claix, France) est utilisé pour détecter simultanément, à 4 potentiels différents, les espèces libérées par une cellule dans les 4 chambres du microsysteme. Les électrodes de travail, de référence et auxiliaire, présentes sur le dispositif sont connectées au potentiostat.

Les études préliminaires nous ont permis d'identifier les valeurs de potentiels de début de plateau d'oxydation de NO_2^- et H_2O_2 respectivement à + 800 et + 300 mV vs Ag/AgCl. Cependant, nous nous sommes placés à des potentiels un peu plus positifs. Une différence de potentiel de + 400 ou + 850 mV est alors appliquée entre les électrodes de travail (platine) et la référence (Ag/AgCl).

Les premiers essais de mesures ont été réalisés dans des puits de PDMS de diamètre de l'ordre de 3 mm. Dans un premier temps, le milieu de culture est remplacé par du tampon physiologique PBS. Ensuite, le PBS est remplacé par la solution de stimulation, du calcium ionophore ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et à la fin de la sécrétion, la solution est à nouveau remplacée par du PBS. La polarisation de l'électrode pouvant durer plusieurs minutes, les parties initiales et finales de l'acquisition, enregistrées dans du PBS, permettent de simuler la décroissance exponentielle du courant qui est ensuite soustraite au signal à l'aide d'un programme développé au laboratoire.

III. Culture cellulaire et préparation des solutions

III.I. Culture cellulaire

III.I.1. Culture des cellules BON

La lignée BON originelle (« *wild-type* », WT) provient d'une tumeur carcinoïde humaine du pancréas, fournie par C.M. Townsend (University of Texas Medical Branch, Galveston, TX). Les

clones BON N13 et BC21 ont été générés au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Sécrétion de l'IBPC à partir de la lignée BON originelle par Bruno Gasnier.

Les cellules BON (WT, N13 ou BC21) sont cultivées à une densité de 2.10^5 à 4.10^5 cellules.cm⁻² dans des flasques en plastique de 75 cm² (*Nunc, Roskilde, Danemark*). Elles sont maintenues à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les trois jours. Les cellules à confluence (25-30 millions/75 cm²) sont repiquées une fois par semaine : le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées deux fois avec 10 mL PBS. 1 mL de trypsine/EDTA est ensuite ajouté pour décoller les cellules. Les cellules se décollent facilement. La solution de trypsine/EDTA est composée de 0,5 mg.mL⁻¹ de trypsine et de 0,2 mg.mL⁻¹ d'EDTA dans du PBS. Le rôle de cette solution est de faciliter le décolllement des cellules. La trypsine est une endoprotéase qui rompt les liaisons peptidiques lysine-arginine des protéines d'adhérence. L'EDTA crée des complexes avec le calcium extracellulaire, ce qui inactive l'adhésion cellule/cellule.

L'action de la trypsine est ensuite inhibée par dilution en ajoutant 9 mL de milieu de culture complet. 1 mL de cellule en suspension est alors prélevé et placé dans une nouvelle flasque qui est ensuite complétée avec 10 à 15 mL de milieu de culture.

III.1.2. Culture des macrophages RAW 264.7

La culture cellulaire des cellules macrophages RAW 264.7 est identique à celle des cellules BON. Elles sont cultivées en flasques et maintenues à 37 °C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Leur division cellulaire, plus rapide que celle des BON nécessite de les repiquer deux à trois fois pas semaine : le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées deux fois avec 10 mL PBS. 1 mL de trypsine/EDTA est ensuite ajouté pour décoller les cellules. La flasque est placée à l'incubateur pendant 2 minutes pour faciliter le décolllement puis les dernières cellules sont décollées en tapant le fond de la flasque. L'action de la trypsine est ensuite inhibée par addition de 9 mL de milieu de culture complet.

Dans certains cas, les cellules sont difficiles à décoller. Une autre alternative permet de faciliter ce décolllement grâce à la pression du jet d'une seringue. Pour cela, après avoir aspiré le milieu de culture et rincé les cellules, 10 mL de milieu de culture sont ajoutés dans la flasque, et à l'aide d'une seringue de 5 mL et de son aiguille, le milieu est aspiré puis réinjecté sur le fond de la flasque, entraînant alors le décolllement des cellules.

1 mL de cellules en suspension est alors prélevé et placé dans une nouvelle flasque qui est ensuite complétée avec 10 à 15 mL de milieu de culture.

III.I.3. Congélation et décongélation des cellules

a) Congélation

Lors de la congélation des cellules, les cellules en flasques de cultures doivent être à 89-90 % de confluence. Le milieu de culture est aspiré et la flasque est rincée deux fois avec 10 mL de PBS. Les cellules sont ensuite décollées (cf. III.I.1. et III.I.2. *Culture des cellules BON ou des cellules RAW 264.7*) puis la trypsine est neutralisée en ajoutant 9 mL de milieu de culture. L'ensemble est placé dans un flacon de 50 mL (VWR, Falcon, Fontenay sous Bois, France) et centrifugé à 1000 tr.min⁻¹ pendant 5 minutes. Le surnageant est aspiré et le culot de cellule est repris dans 2 mL de milieu de culture supplémenté avec 10 % de DMSO (*diméthylsulfoxyde, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*). Ces 2 mL sont ensuite placés dans un cryo-tube (*Nunc, Roskilde, Danemark*) à - 80°C. Cette manipulation doit être effectuée rapidement car le DMSO, s'il est en présence trop longtemps avec les cellules à température ambiante, affecte les membranes cellulaires.

b) Décongélation

Lors de la décongélation, un cryo-tube est décongelé au bain-marie à 37°C, puis les 2 mL de cellules présents dans le cryo-tube sont placés dans un flacon de 50 mL contenant 5 mL de milieu de culture. Cette étape permet de neutraliser rapidement le DMSO avant qu'il n'attaque les membranes cellulaires. Le flacon est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 1000 tr.min⁻¹. Le surnageant est aspiré et le culot est repris dans 2 mL de milieu de culture. Ces 2 mL de cellules en suspension sont ensuite placés dans une flasque de culture et 10 à 15 mL de milieu de culture sont ajoutés. Le lendemain de la décongélation, le milieu de culture est changé pour éliminer les cellules non adhérentes et les débris cellulaires.

III.II. Solutions et Milieux de cultures

III.II.1. Milieux de culture des cellules BON

a) Milieu complet

44,5 mL de milieu de culture (*Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*), 5 mL de sérum fœtal de veau (*Invitrogen, Cergy Pontoise, France*) et 0,5 mL

d'un mélange de pénicilline et streptomycine (*Invitrogen, Cergy Pontoise, France*) sont placés dans un flacon de 50 mL. Le milieu est ensuite filtré sur un filtre de 0,22 µm (*Minisart NML, Sartorius Stedim, Göttingen, Allemagne*).

b) Milieu supplémenté en sérotonine

Le milieu de culture supplémenté en sérotonine est également préparé avec 44,5 mL de milieu de culture, 5 mL de sérum fœtal de veau et 0,5 mL de pénicilline/streptomycine. 5,3 mg de sérotonine hydrochloride (*Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*) sont ajoutés (soit $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹). Le milieu est ensuite filtré sur un filtre de 0,22 µm.

III.II.2. Milieu de culture des macrophages

47 mL de milieu de culture (Dulbecco's modified Eagle's medium + GlutaMax-1, *Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*), contenant 1g.L⁻¹ de D-glucose et 1 g.L⁻¹ de pyruvate, sont placés dans un flacon de 50 mL. 2,5 mL de sérum fœtal de veau (*Invitrogen, Cergy Pontoise, France*) et 0,5 mL d'un mélange de pénicilline et streptomycine (*Invitrogen, Cergy Pontoise, France*) sont ajoutés dans le flacon. Le milieu est ensuite filtré sur un filtre de 0,22 µm.

III.II.3. Tampons physiologiques

a) Tampon phosphate PBS

Le tampon phosphate PBS est utilisé lors du passage des cellules. Il est composé de NaCl (137 mM), de KCl (2,7 mM), de Na₂HPO₄ (10 mM). Il est préparé à partir d'eau distillée purifiée par un système Milli-Q (*Millipore, Bedford, Etats-Unis*). Le PBS est ensuite filtré pour assurer sa stérilité (*Costar, membrane nylon, dont la taille des pores est de 0,22 micron*), puis stocké à 4 °C dans des flacons stériles.

b) Tampons Locke

Le tampon de Locke x 1 supplémenté en calcium et magnésium, préparé à partir du tampon Locke x 10, est utilisé lors de l'étude ampérométrique des cellules BON.

La solution de Locke x 10 est composée de 56 mM de glucose, 1540 mM de NaCl, 56 mM de KCl, 50 mM d'Hepes et 36 mM de NaHCO₃. Il est préparé à partir d'eau distillée purifiée par un système Milli-Q. Le pH de la solution est ajusté à 7,4 par ajout de soude à 1 mol.L⁻¹. Le Locke x 10 est ensuite filtré à 0,22 micron puis stocké à - 20 °C dans des flacons stériles.

La solution de Locke x 1 supplémenté en Ca²⁺/Mg²⁺ contient 2,5 mM de CaCl₂, 1,2 mM de MgCl₂, 10 % de Locke x 10 et 2 % d'Hepes dans de l'eau distillée purifiée par un système Milli-Q. La solution est ensuite stérilisée par autoclave puis stocké à - 20 °C dans des flacons stériles.

I.II.4. Solutions utilisées lors des expériences *in vitro*

Les voltamogrammes présentés dans la partie B : « *Mise au point du couplage de l'ampérométrie et de la microscopie de fluorescence pour l'étude de l'exocytose* » ont été obtenus à partir de solutions préparées dans le tampon physiologique Locke x 1 supplémenté en calcium et magnésium, et ceux présentés dans la partie C : « *Mise au point d'un microsystème pour la mesure du stress oxydant* » ont été obtenus avec des solutions préparées dans le PBS.

Espèce	Concentration (mol.L ⁻¹)	tampon
Sérotonine	10 ⁻³	Locke x 1 ; Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Fer (III)	10 ⁻³	Locke x 1 ; Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Ruthénium (III)	10 ⁻³	Locke x 1 ; Ca ²⁺ /Mg ²⁺
NO ₂ ⁻	10 ⁻³	PBS
H ₂ O ₂	10 ⁻³	PBS

Tableau D-2 : Solutions étudiées in vitro ; concentration et tampon utilisé.

La solution de H₂O₂ est très peu stable. Il est donc nécessaire de la préparer juste avant les expériences et de la conserver à + 4 °C.

I.II.5. Solutions de stimulation

a) Solution d'ionomycine

Cette solution est utilisée pour stimuler les cellules BON et déclencher leur sécrétion. Dans un premier temps, des aliquots de 25 µL d'ionomycine à 10 mg.mL⁻¹ sont préparés à l'abri de la

lumière. Ces aliquots sont ensuite dilués à $5 \cdot 10^{-3}$ mmol.L⁻¹ dans du Locke x 1 supplémenté en Ca²⁺ et Mg²⁺.

b) Solution de calcium ionophore

Une solution de calcium ionophore à 2 µmol.L⁻¹ (A 23187 ; *Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*) est utilisée pour déclencher la réponse oxydative des cellules RAW 264.7. Initialement 10 mg de calcium ionophore sont dissous dans 50 mL d'éthanol (soit $3,8 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹). Ensuite, pour chaque mesure, 5,2 µL de cette solution sont dilués dans 1 mL de PBS. La solution, sensible à la lumière et à la température doit être conservée à - 20°C.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- (1) Amatore, C.; Pebay, C.; Thouin, L.; Wang, A.; Warkocz, J.-S. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 6933-6939.
- (2) Dekker, M. *Physical Electrochemistry Principles, Methods, And Applications*, Israel Rubinstein ed., 1995.
- (3) Miomandre, F.; Sadki, S.; Audebert, P.; Méallet-Renault, R. *Electrochimie Des concepts aux applications*, Dunod ed., 2005.
- (4) Helmholtz, H. *Annalen der Physik* **1879**, *243*, 337-382.
- (5) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Électrochimie: principes, méthodes et applications*, Masson ed., 1983.
- (6) Stulik, K.; Amatore, C.; Holub, K.; Marecek, V.; Kutner, W. *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72*, 1483-1492.
- (7) Schulte, A.; Schuhmann, W. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 8760-8777.
- (8) Kawagoe, K. T.; Jankowski, J. A.; Wightman, R. M. *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 1589-1594.
- (9) Amatore, C.; Maisonhaute, E.; Simonneau, G. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2000**, *486*, 141-155.
- (10) Porat, Z.; Crooker, J. C.; Zhang, Y. N.; LeMest, Y.; Murray, R. W. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 5073-5081.
- (11) Amatore, C. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule B-Mecanique Physique Chimie Astronomie* **1996**, *323*, 757-771.
- (12) Amatore, C.; Arbault, S.; Guille, M.; Lemaitre, F. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2585-2621.
- (13) Schroeder, T. J.; Jankowski, J. A.; Senyshyn, J.; Holz, R. W.; Wightman, R. M. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 17215-17220.
- (14) Wu, W. Z.; Huang, W. H.; Wang, W.; Wang, Z. L.; Cheng, J. K.; Xu, T.; Zhang, R. Y.; Chen, Y.; Liut, J. *Journal Of The American Chemical Society* **2005**, *127*, 8914-8915.
- (15) Chow, R. H.; Vonruden, L.; Neher, E. *Nature* **1992**, *356*, 60-63.
- (16) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouret, Y.; Guille, M.; Lemaître, F.; Verchier, Y. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1998-2003.
- (17) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouton, C.; Coffi, K.; Drapier, J. C.; Ghandour, H.; Tong, Y. H. *ChemBiochem* **2006**, *7*, 653-661.
- (18) Bertrand, P. P. *Neurogastroenterology and Motility* **2004**, *16*, 511-514.
- (19) Parekh, D.; Ishizuka, J.; Townsend, C. M.; Haber, B.; Beauchamp, R. D.; Karp, G.; Kim, S. W.; Rajaraman, S.; Greeley, G.; Thompson, J. C. *Pancreas* **1994**, *9*, 83-90.
- (20) Borowitz, J. L. *Journal of Cellular Physiology* **1967**, *69*, 311-315.
- (21) Schroeder, T. J.; Jankowski, J. A.; Kawagoe, K. T.; Wightman, R. M.; Lefrou, C.; Amatore, C. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 3077-3083.
- (22) Wightman, R. M.; Jankowski, J. A.; Kennedy, R. T.; Kawagoe, K. T.; Schroeder, T. J.; Leszczyszyn, D. J.; Near, J. A.; Diliberto, E. J.; Viveros, O. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 10754-10758.
- (23) Tapsoba, I.; Arbault, S.; Walter, P.; Amatore, C. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 457-460.
- (24) Arbault, S.; Pantano, P.; Sojic, N.; Amatore, C.; BestBelpomme, M.; Sarasin, A.; Vuillaume, M. *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 569-574.
- (25) Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; de Oliveira, P.; Erard, M.; Sojic, N.; Vuillaume, M. *Analisis* **2000**, *28*, 506-517.
- (26) Hu, R.; Guille, M.; Arbault, S.; Lin, C. J.; Amatore, C. *Phys Chem Chem Phys* **2010**, *12*, 10048-10054.
- (27) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouton, C.; Drapier, J. C.; Ghandour, H.; Koh, A. C. W. *ChemBiochem* **2008**, *9*, 1472-1480.

- (28) Amatore, C.; Arbault, S.; Chen, Y.; Crozatier, C.; Tapsoba, I. *Lab on a Chip* **2007**, *7*, 233-238.
- (29) Neher, E.; Zucker, R. S. *Neuron* **1993**, *10*, 21-30.
- (30) Burgoyne, R. D.; Morgan, A. *Physiological Reviews* **2003**, *83*, 581-632.
- (31) Tooze, S. A.; Martens, G. J. M.; Huttner, W. B. *Trends In Cell Biology* **2001**, *11*, 116-122.
- (32) Henry, J. P.; Sagne, C.; Bedet, C.; Gasnier, B. *Neurochemistry International* **1998**, *32*, 227-246.
- (33) Kopell, W. N.; Westhead, E. W. *Journal Of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 5707-5710.
- (34) Videen, J. S.; Mezger, M. S.; Chang, Y. M.; Oconnor, D. T. *Journal Of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 3066-3073.
- (35) Amatore, C.; Bouret, Y.; Travis, E. R.; Wightman, R. M. *Biochimie* **2000**, *82*, 481-496.
- (36) Borges, R.; Machado, J. D.; Alonso, C.; Brioso, M. A.; Gomez, J. F. In *Chromogranins: Functional and Clinical Aspects*, 2000; Vol. 482, pp 69-81.
- (37) Nakata, T.; Hirokawa, N. *The Journal of Neuroscience* **1992**, *12*, 2186-2197.
- (38) Rudolf, R.; Salm, T.; Rustom, A.; Gerdes, H. H. *Molecular Biology Of The Cell* **2001**, *12*, 1353-1365.
- (39) Rutter, G. A.; Hill, E. V. *Physiology* **2006**, *21*, 189-196.
- (40) Galli, T.; Martinez-Arca, S.; Paumet, F. *M S-Medecine Sciences* **2002**, *18*, 1113-1119.
- (41) Sugita, S. *Acta Physiologica* **2008**, *192*, 185-193.
- (42) Jahn, R.; Lang, T.; Sudhof, T. C. *Cell* **2003**, *112*, 519-533.
- (43) Lindau, M.; Almers, W. *Current Opinion In Cell Biology* **1995**, *7*, 509-517.
- (44) Kozlovsky, Y.; Kozlov, M. M. *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 882-895.
- (45) Marrink, S. J.; Mark, A. E. *Journal Of The American Chemical Society* **2003**, *125*, 11144-11145.
- (46) Giraudo, C. G.; Hu, C.; You, D. Q.; Slovic, A. M.; Mosharov, E. V.; Sulzer, D.; Melia, T. J.; Rothman, J. E. *Journal Of Cell Biology* **2005**, *170*, 249-260.
- (47) Heuvingh, J.; Pincet, F.; Cribier, S. *European Physical Journal E, Soft Matter* **2004**, *14*, 269-276.
- (48) Xu, Y. B.; Zhang, F.; Su, Z. L.; McNew, J. A.; Shin, Y. K. *Nature Structural & Molecular Biology* **2005**, *12*, 417-422.
- (49) Brunger, A. T. *Current Opinion In Neurobiology* **2000**, *10*, 293-302.
- (50) Lee, H. K.; Yang, Y.; Su, Z. L.; Hyeon, C.; Lee, T. S.; Lee, H. W.; Kweon, D. H.; Shin, Y. K.; Yoon, T. Y. *Science* **2010**, *328*, 760-763.
- (51) Peters, C.; Bayer, M. J.; Buhler, S.; Andersen, J. S.; Mann, M.; Mayer, A. *Nature* **2001**, *409*, 581-588.
- (52) Perrais, D.; Kleppe, I. C.; Taraska, J. W.; Almers, W. *Journal of Physiology-London* **2004**, *560*, 413-428.
- (53) Wightman, R. M.; Haynes, C. L. *Nature Neuroscience* **2004**, *7*, 321-322.
- (54) Henry, J. P.; Darchen, F.; Cribier, S. *Biochimie* **1998**, *80*, 371-377.
- (55) Troyer, K. P.; Wightman, R. M. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 29101-29107.
- (56) van Kempen, G. T. H.; vanderLeest, H. T.; van den Berg, R. J.; Eilers, P.; Westerink, R. H. S. *Biophysical Journal* **2011**, *100*, 968-977.
- (57) Albillos, A.; Dernick, G.; Horstmann, H.; Almers, W.; DeToledo, G. A.; Lindau, M. *Nature* **1997**, *389*, 509-512.
- (58) Staal, R. G. W.; Mosharov, E. V.; Sulzer, D. *Nature Neuroscience* **2004**, *7*, 341-346.
- (59) Fernandez, J. M.; Neher, E.; Gomperts, B. D. *Nature* **1984**, *312*, 453-455.
- (60) Chen, T. K.; Luo, G.; Ewing, A. G. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 3031-3035.
- (61) Kennedy, R. T.; Huang, L.; Atkinson, M. A.; Dusht, P. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 1882-1887.
- (62) Neher, E.; Sakmann, B. *Nature* **1976**, *260*, 799-802.
- (63) Angleson, J. K.; Betz, W. J. *Trends in Neurosciences* **1997**, *20*, 281-287.
- (64) Neher, E.; Marty, A. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-Biological Sciences* **1982**, *79*, 6712-6716.
- (65) Penner, R.; Neher, E.; Dreyer, F. *Nature* **1986**, *324*, 76-78.
- (66) Penner, R.; Neher, E. *Journal of Experimental Biology* **1988**, *139*, 329-345.
- (67) Nusse, O.; Lindau, M. *Journal of Cell Biology* **1988**, *107*, 2117-2123.

- (68) Zimmerberg, J.; Curran, M.; Cohen, F. S.; Brodwick, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 1585-1589.
- (69) Heidelberger, R.; Heinemann, C.; Neher, E.; Matthews, G. *Nature* **1994**, *371*, 513-515.
- (70) Heinemann, C.; Chow, R. H.; Neher, E.; Zucker, R. S. *Biophysical Journal* **1994**, *67*, 2546-2557.
- (71) Eliasson, L.; Renstrom, E.; Ding, W. G.; Proks, P.; Rorsman, P. *Journal of Physiology-London* **1997**, *503*, 399-412.
- (72) Parsons, T. D.; Coorsen, J. R.; Horstmann, H.; Almers, W. *Neuron* **1995**, *15*, 1085-1096.
- (73) Voets, T.; Neher, E.; Moser, T. *Neuron* **1999**, *23*, 607-615.
- (74) Wang, N.; Kwan, C.; Gong, X. D.; de Chaves, E. P.; Tse, A.; Tse, F. W. *Journal of Neuroscience* **2010**, *30*, 3904-3911.
- (75) Xu, T.; Rammner, B.; Margittai, M.; Artalejo, A. R.; Neher, E.; Jahn, R. *Cell* **1999**, *99*, 713-722.
- (76) Nagy, G.; Kim, J. H.; Pang, Z. P. P.; Matti, U.; Rettig, J.; Sudhof, T. C.; Sorensen, J. B. *Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 632-643.
- (77) Breckenridge, L. J.; Almers, W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 1945-1949.
- (78) Becherer, U.; Pasche, M.; Nofal, S.; Hof, D.; Matti, U.; Rettig, J. *Plos One* **2007**, *2*.
- (79) Borges, R.; Camacho, M.; Gillis, K. D. *Acta Physiologica* **2008**, *192*, 173-184.
- (80) Borges, R.; Jaén, R.; Freire, F.; Gómez, J. F.; Villafuella, C.; Yanes, E. *Cell and Tissue Research* **2001**, *304*, 159-164.
- (81) Elhamdani, A.; Brown, M. E.; Artalejo, C. R.; Palfrey, H. C. *Journal of Neuroscience* **2000**, *20*, 2495-2503.
- (82) Moser, T.; Neher, E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 6735-6740.
- (83) Pihel, K.; Travis, E. R.; Borges, R.; Wightman, R. M. *Biophysical Journal* **1996**, *71*, 1633-1640.
- (84) Anderson, B. B.; Zerby, S. E.; Ewing, A. G. *Journal of neuroscience Methods* **1999**, *88*, 163-170.
- (85) Kumara Swamy, B. E.; Venton, B. J. *Analyst* **2007**, *132*, 876-894.
- (86) Fernandez-Chacon, R.; De Toledo, G. A. *FEBS Letters* **1995**, *363*, 221-225.
- (87) Guzmán, R. E.; Bolaños, P.; Delgado, A.; Rojas, H.; DiPolo, R.; Caputo, C.; Jaffe, E. H. *European Journal of Applied Physiology - Pflugers Archiv* **2007**, *454*, 131-141.
- (88) Huang, L.; Shen, H.; Atkinson, M. A.; Kennedy, R. T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 9608-9612.
- (89) Kennedy, R. T.; Huang, L.; Aspinwall, C. A. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 1795-1796.
- (90) Takahashi, N.; Kadowaki, T.; Yazaki, Y.; Miyashita, Y.; Kasai, H. *The Journal of Cell Biology* **1997**, *138*, 55-64.
- (91) Ge, S. C.; White, J. G.; Haynes, C. L. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 2935-2943.
- (92) Grabner, C. P.; Price, S. D.; Lysakowski, A.; Fox, A. P. *Journal of Neurophysiology* **2005**, *94*, 2093-2104.
- (93) Amatore, C.; Arbault, S.; Bonifas, I.; Lemaître, F.; Verchier, Y. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 578-585.
- (94) Anderson, B. B.; Chen, G. Y.; Gutman, D. A.; Ewing, A. G. *Brain Research* **1998**, *788*, 294-301.
- (95) Bruns, D. *Methods* **2004**, *33*, 312-321.
- (96) Tang, K. S.; Tse, A.; Tse, F. W. *Journal of Neurochemistry* **2005**, *92*, 1126-1139.
- (97) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouret, Y.; Guille, M.; Lemaître, F.; Verchier, Y. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 3087-3093.
- (98) Zhang, B.; Adams, K. L.; Lubner, S. J.; Eves, D. J.; Heien, M. L.; Ewing, A. G. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 1394-1400.
- (99) Zhang, B.; Heien, M.; Santillo, M. F.; Mellander, L.; Ewing, A. G. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 571-577.
- (100) Robinson, I. M.; Finnegan, J. M.; Monck, J. R.; Wightman, R. M.; Fernandez, J. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 2474-2478.
- (101) Bokvist, K.; Holmqvist, M.; Gromada, J.; Rorsman, P. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **2000**, *439*, 634-645.

- (102) Dias, A. F.; Dernick, G.; Valero, V.; Yong, M. G.; James, C. D.; Craighead, H. G.; Lindau, M. *Nanotechnology* **2002**, *13*, 285-289.
- (103) Hafez, I.; Kisler, K.; Berberian, K.; Dernick, G.; Valero, V.; Yong, M. G.; Craighead, H. G.; Lindau, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 13879-13884.
- (104) Chen, X.; Gao, Y.; Hossain, M.; Gangopadhyay, S.; Gillis, K. D. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 161-169.
- (105) Aspinwall, C. A.; Brooks, S. A.; Kennedy, R. T.; Lakey, J. R. T. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 31308-31314.
- (106) Amatore, C.; Arbault, S.; Bonifas, I.; Bouret, Y.; Erard, M.; Guille, M. *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 147-154.
- (107) Amatore, C.; Arbault, S.; Bonifas, I.; Guille, M.; Lemaître, F.; Verchier, Y. *Biophysical Chemistry* **2007**, *129*, 181-189.
- (108) Gil, A.; Viniestra, S.; Gutierrez, L. M. *European Journal of Neuroscience* **2001**, *13*, 1380-1386.
- (109) Haynes, C. L.; Siff, L. N.; Wightman, R. M. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **2007**, *1773*, 728-735.
- (110) Borges, R.; Pereda, D.; Beltran, B.; Prunell, M.; Rodriguez, M.; Machado, J. D. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2010**, *30*, 1359-1364.
- (111) Jankowski, J. A.; Finnegan, J. M.; Wightman, R. M. *Journal of Neurochemistry* **1994**, *63*, 1739-1747.
- (112) Jankowski, J. A.; Schroeder, T. J.; Ciolkowski, E. L.; Wightman, R. M. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 14694-14700.
- (113) Camacho, M.; Machado, J. D.; Montesinos, M. S.; Criado, M.; Borges, R. *Journal of Neurochemistry* **2006**, *96*, 324-334.
- (114) Haynes, C. L.; Buhler, L. A.; Wightman, R. M. *Biophysical Chemistry* **2006**, *123*, 20-24.
- (115) Pothos, E. N.; Mosharov, E.; Liu, K. P.; Setlik, W.; Haburcak, M.; Baldini, G.; Gershon, M. D.; Tamir, H.; Sulzer, D. *Journal of Physiology-London* **2002**, *542*, 453-476.
- (116) Taylor, S. C.; Roberts, M. L.; Peers, C. *Journal of Physiology-London* **1999**, *519*, 765-774.
- (117) Borges, R.; Travis, E. R.; Hochstetler, S. E.; Wightman, R. M. *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 8315-8331.
- (118) Zhang, J.; Xue, R. H.; Ong, W. Y.; Chen, P. *Biophysical Journal* **2009**, *97*, 1371-1380.
- (119) Zamir, O.; Charlton, M. P. *Journal of Physiology-London* **2006**, *571*, 83-99.
- (120) Wasser, C. R.; Ertunc, M.; Liu, X. R.; Kavalali, E. T. *Journal of Physiology-London* **2007**, *579*, 413-429.
- (121) Kato, N.; Nakanishi, M.; Hirashima, N. *Biochemistry* **2002**, *41*, 8068-8074.
- (122) Uchiyama, Y.; Maxson, M. M.; Sawada, T.; Nakano, A.; Ewing, A. G. *Brain Research* **2007**, *1151*, 63-71.
- (123) Zhang, Z.; Jackson, M. B. *Biophysical Journal* **2010**, *98*, 2524-2534.
- (124) Burchfield, J. G.; Lopez, J. A.; Mele, K.; Vallotton, P.; Hughes, W. E. *Traffic* **2010**, *11*, 429-439.
- (125) Guzman, R. E.; Bolanos, P.; Delgado, A.; Rojas, H.; DiPolo, R.; Caputo, C.; Jaffe, E. H. *Pflugers Archiv-European Journal Of Physiology* **2007**, *454*, 131-141.
- (126) Xu, T.; Binz, T.; Niemann, H.; Neher, E. *Nature Neuroscience* **1998**, *1*, 192-200.
- (127) Gil, A.; Viniestra, S.; Gutierrez, L. M. *European Journal of Neuroscience* **1998**, *10*, 3369-3378.
- (128) Xu, T.; Ashery, U.; Burgoyne, R. D.; Neher, E. *The EMBO Journal* **1999**, *18*, 3293-3304.
- (129) Carr, C. M.; Munson, M. *EMBO reports* **2007**, *8*, 834-838.
- (130) Villanueva, M.; Wightman, R. M. *Biochemistry* **2007**, *46*, 3881-3887.
- (131) Zhou, R.; Luo, G.; Ewing, A. G. *Journal of Neuroscience* **1994**, *14*, 2402-2407.
- (132) Pothos, E. N.; Przedborski, S.; Davila, V.; Schmitz, Y.; Sulzer, D. *The Journal of Neuroscience* **1998**, *18*, 5575-5585.
- (133) Aspinwall, C. A.; Lakey, J. R. T.; Kennedy, R. T. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 6360-6365.

- (134) Ueki, K.; Okada, T.; Hu, J.; Liew, C. W.; Assmann, A.; Dahlgren, G. M.; Peters, J. L.; Shackman, J. G.; Zhang, M.; Artner, I.; Satin, L. S.; Stein, R.; Holzenberger, M.; Kennedy, R. T.; Kahn, C. R.; Kulkarni, R. N. *Nature Genetics* **2006**, *38*, 583-588.
- (135) Omiatek, D. M.; Dong, Y.; Heien, M. L.; Ewing, A. G. *Acs Chemical Neuroscience* **2010**, *1*, 234-245.
- (136) Wightman, R. M. *Science* **2006**, *311*, 1570-1574.
- (137) De Toledo, G. A.; Fernadez-Chacon, R.; Fernanfez, J. M. *Nature* **1993**, *363* 554-558.
- (138) Sombers, L. A.; Wittenberg, N. J.; Maxson, M. M.; Adams, K. L.; Ewing, A. G. *Chemphyschem* **2007**, *8*, 2471-2477.
- (139) Braun, M.; Wendt, A.; Karanauskaite, J.; Galvanovskis, J.; Clark, A.; MacDonald, P. E.; Rorsman, P. *Journal of General Physiology* **2007**, *129*, 221-231.
- (140) Amatore, C.; Arbault, S.; Bonifas, I.; Guille, M. *Biophysical Chemistry* **2009**, *143*, 124-131.
- (141) Wightman, R. M.; Schroeder, T. J.; Finnegan, J. M.; Ciolkowski, E. L.; Pihel, K. *Biophysical Journal* **1995**, *68*, 383-390.
- (142) Amatore, C.; Arbault, S.; Bonifas, I.; Bouret, Y.; Erard, M.; Ewing, A. G.; Sombers, L. A. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 4411-4420.
- (143) Crivellato, E.; Nico, B.; Perissin, L.; Ribatti, D. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology* **2003**, *270A*, 103-108.
- (144) Sombers, L. A.; Maxson, M. M.; Ewing, A. G. *Journal of Neurochemistry* **2005**, *93*, 1122-1131.
- (145) Michael, D. J.; Ritzel, R. A.; Haataja, L.; Chow, R. H. *Diabetes* **2006**, *55*, 600-607.
- (146) Borges, R.; Travis, E. R.; Hochstetler, S. E.; Wightman, R. M. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 8325-8331.
- (147) Sombers, L. A.; Hanchar, H. J.; Colliver, T. L.; Wittenberg, N.; Cans, A.; Arbault, S.; Amatore, C.; Ewing, A. G. *Journal of Neuroscience* **2004**, *24*, 303-309.
- (148) Constable, J. R. L.; Graham, M. E.; Morgan, A.; Burgoyne, R. D. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 31615-31623.
- (149) Grabner, C. P.; Fox, A. P. *Journal of Neurophysiology* **2006**, *96*, 3082-3087.
- (150) Xu, J. H.; Tse, F. W. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 19095-19102.
- (151) Mosharov, A. V.; Sulzer, D. *Nature Methodes* **2005**, *2*, 651-658.
- (152) Travis, E. R.; Wightman, R. M. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure* **1998**, *27*, 77-103.
- (153) Ge, S. C.; Koseoglu, S.; Haynes, C. L. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 3281-3304.
- (154) Betz, W. J.; Mao, F.; Bewick, G. S. *Journal of Neuroscience* **1992**, *12*, 363-375.
- (155) Betz, W. J.; Ridge, R.; Bewick, G. S. *Journal of Physiology-Paris* **1993**, *87*, 193-202.
- (156) Ryan, T. A.; Smith, S. J. *Neuron* **1995**, *14*, 983-989.
- (157) Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, *59*, 223-239.
- (158) Tsien, R. Y. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, *67*, 509-544.
- (159) Barg, S.; Knowles, M. K.; Chen, X.; Midorikawa, M.; Almers, W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 20804-20809.
- (160) Pawley, J. B.; Plenum Press: New York, 1996.
- (161) Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. *Science* **1990**, *248*, 73-76.
- (162) Steyer, J. A.; Almers, W. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**, *2*, 268-275.
- (163) Oheim, M.; Loerke, D.; Stuhmer, W.; Chow, R. H. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **1998**, *27*, 83-98.
- (164) Oheim, M.; Stuhmer, W. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2000**, *29*, 67-89.
- (165) Steyer, J. A.; Almers, W. *Biophysical Journal* **1999**, *76*, 2262-2271.
- (166) Han, W. P.; Ng, Y. K.; Axelrod, D.; Levitan, E. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 14577-14582.
- (167) Ng, Y. K.; Lu, X. H.; Gulacsi, A.; Han, W. P.; Saxton, M. J.; Levitan, E. S. *Biophysical Journal* **2003**, *84*, 4127-4134.

- (168) Ohara-Imaizumi, M.; Nakamichi, Y.; Tanaka, T.; Ishida, H.; Nagamatsu, S. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 3805-3808.
- (169) Silverman, M. A.; Johnson, S.; Gurkins, D.; Farmer, M.; Lochner, J. E.; Rosa, P.; Scalettar, B. A. *Journal of Neuroscience* **2005**, *25*, 3095-3106.
- (170) Allersma, M. W.; Wang, L.; Axelrod, D.; Holz, R. W. *Molecular Biology of the Cell* **2004**, *15*, 4658-4668.
- (171) Becherer, U.; Moser, T.; Stuhmer, W.; Oheim, M. *Nature Neuroscience* **2003**, *6*, 846-853.
- (172) Steyer, J. A.; Horstmann, H.; Almers, W. *Nature* **1997**, *388*, 474-478.
- (173) Lang, T.; Wacker, I.; Wunderlich, I.; Rohrbach, A.; Giese, G.; Soldati, T.; Almers, W. *Biophysical Journal* **2000**, *78*, 2863-2877.
- (174) Oheim, M.; Loerke, D.; Stuhmer, W.; Chow, R. H. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **1999**, *28*, 91-101.
- (175) Johns, L. M.; Levitan, E. S.; Shelden, E. A.; Holz, R. W.; Axelrod, D. *Journal of Cell Biology* **2001**, *153*, 177-190.
- (176) Taraska, J. W.; Perrais, D.; Ohara-Imaizumi, M.; Nagamatsu, S.; Almers, W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 2070-2075.
- (177) Tsuboi, T.; McMahon, H. T.; Rutter, G. A. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 47115-47124.
- (178) Tsuboi, T.; Rutter, G. A. *Current Biology* **2003**, *13*, 563-567.
- (179) Ma, L.; Bindokas, V. P.; Kuznetsov, A.; Rhodes, C.; Hays, L.; Edwardson, J. M.; Ueda, K.; Steiner, D. F.; Philipson, L. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 9266-9271.
- (180) Oheim, M. *Biophysical Journal* **2004**, *87*, 1403-1405.
- (181) Gutierrez, L. M.; Gil, A.; Viniegra, S. *European Journal of Cell Biology* **1998**, *76*, 274-278.
- (182) Shi, B. X.; Wang, Y.; Lam, T. L.; Huang, W. H.; Zhang, K.; Leung, Y. C.; Chan, H. L. W. *Biomicrofluidics* **2010**, *4*.
- (183) Zudans, I.; Paddock, J. R.; Kuramitz, H.; Maghasi, A. T.; Wansapura, C. M.; Conklin, S. D.; Kaval, N.; Shtoyko, T.; Monk, D. J.; A., B. S.; Hubler, T. L.; Richardson, J. N.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *565*, 311-320.
- (184) Guillen, C.; Herrero, J. *Thin Solid Film* **2005**, *480*, 129-132.
- (185) Amatore, C.; Arbault, S.; Chen, Y.; Crozatier, C.; Lemaitre, F.; Verchier, Y. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 4000-4003.
- (186) Hennemeyer, M.; Walther, F.; Kerstan, S.; Schürzinger, K.; Gigler, A. M.; Stark, R. W. *Microelectronic Engineering* **2008**, *85*, 1298-1301.
- (187) Walther, F.; Hennemeyer, M.; Kerstan, S.; Davidovskaya, P.; Schürzinger, K.; Gigler, A. M.; Maßberg, S.; Stark, R. W. *European Cells and Materials* **2007**, *14*, 101.
- (188) Spegel, C.; Heiskanen, A.; Skjolding, L. H. D.; Emneus, J. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 680-702.
- (189) Wang, W.; Zhang, S. H.; Li, L. M.; Wang, Z. L.; Cheng, J. K.; Huang, W. H. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394*, 17-32.
- (190) Cui, H. F.; Ye, J. S.; Chen, Y.; Chong, S. C.; Sheu, F. S. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6347-6355.
- (191) Barizuddin, S.; Liu, X.; Mathai, J. C.; Hossain, M.; Gillis, K. D.; Gangopadhyay, S. *Acs Chemical Neuroscience* **2010**, *1*, 590-597.
- (192) Sarada, B. V.; Rao, T. N.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1632-1638.
- (193) Lau, Y. Y.; Wong, D. K. Y.; Luo, G.; Ewing, A. G. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 865-869.
- (194) Li, J.; Lin, X. *sensors and Actuators* **2007**, *126*, 527-535.
- (195) Baur, J. E.; Kristensen, E. W.; May, L. J.; Wiedemann, D. J.; Wightman, R. M. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 1268-1272.
- (196) Pihel, K.; Schroeder, T. J.; Wightman, R. M. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 4532-4537.
- (197) Hernandez, P.; Sanchez, I.; Paton, F.; Hernandez, L. *Talanta* **1998**, *46*, 985-991.
- (198) Takmakov, P.; Zachek, M. K.; Keithley, R. B.; Walsh, P. L.; Donley, C.; McCarty, G. S.; Wightman, R. M. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 2020-2028.

- (199) Chowdappa, N.; Kumara Swamy, B. E.; Niranjana, E.; Sherigara, B. S. *International Journal of Electrochemical Science* **2009**, *4*, 425-434.
- (200) Yoona, I. J.; Shina, J. H.; Paengb, I. R.; Nama, H.; S., C. G.; Paengc, K.-J. *Analytica Chimica Acta* **1998**, *367*, 175-181.
- (201) Jackson, B. P.; Dietz, S. M.; Wightman, R. M. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 1115-1120.
- (202) Maeda, H. *Langmuir* **1999**, *15*, 8505-8513.
- (203) Patel, B. A.; Bian, X.; Quaiserova-Mocko, V.; Galligan, J. J.; Swain, G. M. *Analyst* **2007**, *132*, 41-47.
- (204) Zudans, I.; Paddock, J. R.; Kuramitz, H.; Maghasi, A. T.; Wansapura, C. M.; Conklin, S. D.; Kaval, N.; Shtoyko, T.; Monk, D. J.; Bryan, S. A.; Hubler, T. L.; Richardson, J. N.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004**, *565*, 311-320.
- (205) Fatt, P.; Katz, B. *The Royal Society* **1952**, *140*, 183-186.
- (206) Clark, R. A.; Ewing, A. G. *Molecular Neurobiology* **1997**, *15*, 1-16.
- (207) Marszalek, P. E.; Farrell, B.; Verdugo, P.; Fernandez, J. M. *Biophysical Chemistry* **1997**, *73*, 1160-1168.
- (208) Kawagoe, K. T.; Jankowski, J. A.; Wightman, R. M. *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 1589-1594.
- (209) Sasakawa, N.; Murayama, N.; Kumakura, K. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2005**, *25*, 777-787.
- (210) Easom, R. A. *Cell & Developmental Biology* **2000**, *11*, 253-266.
- (211) Lang, J. *European Journal of Biochemistry* **1999**, *259*, 3-17.
- (212) Oberhauser, A. F.; Robinson, I. M.; Fernandez, J. M. *Biophysical Journal* **1996**, *71*, 1131-1139.
- (213) Haynes, C. L. *BioChemPhys* **1998**, *138*, 63.
- (214) Finnegan, J. M.; Pihel, K.; Cahill, P. S.; Huang, L.; Zerby, S. E.; Ewing, A. G.; Kennedy, R. T.; Wightman, R. M. *Journal of Neurochemistry* **1996**, *66*, 1914-1923.
- (215) Elhamdani, A.; Brown, M. E.; Artalejo, C. R.; Palfrey, H. C. *The Journal of Neuroscience*, **2000**, *20*, 2495-2503.
- (216) Machado, J. D.; Gómez, J. F.; Betancor, G.; Camacho, M.; Brioso, M. A.; Borges, R. *Circulation Research* **2002**, *91*, 830-836.
- (217) Amatore, C.; Arbault, S.; Lemaître, F.; Verchier, Y. *Biophysical Chemistry* **2007**, *127*, 165-171.
- (218) Pothos, E.; Desmond, M.; Sulzer, D. *Journal of Neurochemistry* **1996**, *66*, 629-636.
- (219) Tran, V. S.; M., M.-A. A.; Karatekin, E.; Huet, S.; Cribier, S.; Guillaumie, K.; Chapuis, C.; Desnos, C.; Darchen, F.; Henry, J. P. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2004**, *1014*, 179-188.
- (220) Parekh, D.; Ishizuka, J.; Townsend Jr., C. M.; Haber, B.; Beauchamp, R. D.; Karp, G.; Whe Kim, S.; Rajaraman, S.; Greeley Jr, G.; Thomson, J. C. *Pancreas* **1994**, *9*, 83-90.
- (221) Bretou, M., Université Denis Diderot (Paris VII), Paris, 2010.
- (222) Huet, S.; Karatekin, E.; Tran, V. S.; Fanget, I.; Cribier†, S.; Henry, J.-P. *Biophysical Journal* **2006**, *91*, 35-42.
- (223) Karatekin, E.; Tran, V. S.; Huet, S.; Fanget, I.; Cribier, S.; Henry, J. P. *Biophysical Journal* **2008**, *94*, 2891-2905.
- (224) Tran, V. S., Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), Paris, 2008.
- (225) Giebel, K.-F.; Bechinger, C.; Herminghaus, S.; Riedel, M.; Leiderer, P.; Weiland, U.; M., B. *Biophysical Journal* **1999**, *76*, 509-516.
- (226) Lassalle, H.-P.; Baumann, H.; Strauss, W. S. L.; Schneckenburger, H. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology* **2007**, *26*, 83-88.
- (227) Amatore, C.; Arbault, S.; Erard, M. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 9635-9641.
- (228) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouret, Y.; Guille, M.; Lemaître, F. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2931-2941.
- (229) Sun, X. H.; Gillis, K. D. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 2521-2525.
- (230) Berberian, K.; Kisler, K.; Fang, Q. H.; Lindau, M. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 8734-8740.
- (231) Gong, L. W.; Di Paolo, G.; Diaz, E.; Cestra, G.; Diaz, M. E.; Lindau, M.; De Camilli, P.; Toomre, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 5204-5209.

- (232) Pasquarelli, A.; Carabelli, V.; Xu, Y. L.; Colombo, E.; Gao, Z. Y.; Scharpf, J.; Carbone, E.; Kohn, E. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2011**, *91*, 150-160.
- (233) Dittami, G. M.; Rabbitt, R. D. *Lab on a Chip* **2010**, *10*, 30-35.
- (234) Gao, Y.; Chen, X.; Gupta, S.; Gillis, K. D.; Gangopadhyay, S. *Biomed Microdevices* **2008**, *10*, 623-629.
- (235) Carabelli, V.; Gosso, S.; Marcantoni, A.; Xu, Y.; Colombo, E.; Gao, Z.; Vittone, E.; Kohn, K.; Pasquarelli, A.; Carbone, E. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *26*, 92-98.
- (236) Shi, B.-X.; Wanga, Y.; Zhanga, K.; Lamb, T.-L.; Chana, H. L.-W. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 2917-2921.
- (237) Spegel, C.; Heiskanen, A.; Acklid, J.; Wolff, A.; Taboryski, R.; Emneus, J.; Ruzgas, T. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 263-271.
- (238) Spegel, C.; Heiskanen, A.; Pedersen, S.; Emneus, J.; Ruzgas, T.; Taboryski, R. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 323-329.
- (239) Liu, X.; Barizuddin, S.; Shin, W.; Mathai, C. J.; Gangopadhyay, S.; Gillis, K. D. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 2445-2451.
- (240) Gao, Y. F.; Bhattacharya, S.; Chen, X. H.; Barizuddin, S.; Gangopadhyay, S.; Gillis, K. D. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 3442-3446.
- (241) Braun, T.; Volland, P.; Kunz, L.; Prinz, C.; Gratzl, M. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 1890-1901.
- (242) Favier, A. *L'actualité chimique* **2003**, 269-270, 108-115.
- (243) Gutteridge, J. M. C.; Halliwell, B. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**, *899*, 136-147.
- (244) Winterbourn, C. C. *Nature Chemical Biology* **2008**, *4*, 278-286.
- (245) Kolb, J. P. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences , Paris, Science de la vie* **2001**, *324*, 413-424.
- (246) Vuillemin, E.; Veal, N.; Croquet, V.; Pilette, C.; Douay, O.; Calès, P. *Gastroentérologie clinique et biologique* **1999**, *23*, 892-902.
- (247) Levine, R. L. *Free Radical Biology And Medicine* **2002**, *32*, 790-796.
- (248) Richter, C. *Mutation Research* **1992**, *275*, 249-255.
- (249) Okado-Matsumoto, A.; Fridovich, I. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 38388-38393.
- (250) Sturtz, L. A.; Diekert, K.; Jensen, L. T.; Lill, R.; Culotta, V. C. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 38084-38089.
- (251) Mates, J. M.; Perez-Gomez, C.; De Castro, I. N. *Clinical Biochemistry* **1999**, *32*, 595-603.
- (252) Powers, S. K.; Lennon, S. L. *Proceedings of the Nutrition Society* **1999**, *58*, 1025-1033.
- (253) Nomura, K.; Imai, H.; Koumura, T.; Kobayashi, T.; Nakagawa, Y. *Biochemical Journal* **2000**, *351*, 183-193.
- (254) Weber, C.; Podda, M.; Rallis, M.; Thiele, J. J.; Traber, M. G.; Packer, L. *Free Radical Biology and Medicine* **1997**, *22*, 761-769.
- (255) Skulachev, V. P. *Febs Letters* **1998**, *423*, 275-280.
- (256) Evans, W. J. *American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, *72*, 647S-652S.
- (257) Bartosz, G. *Clinica Chimica Acta* **2006**, *368*, 53-76.
- (258) Halliwell, B.; Whiteman, M. *British Journal Of Pharmacology* **2004**, *142*, 231-255.
- (259) Tarpey, M. M.; Fridovich, I. *Circulation Research* **2001**, *89*, 224-236.
- (260) Braman, R. S.; Hendrix, S. A. *Analytical Chemistry* **1989**, *61*, 2715-2718.
- (261) Corbett, J. T. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1989**, *18*, 297-307.
- (262) Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. *Journal Of Biochemical And Biophysical Methods* **2005**, *65*, 45-80.
- (263) Tarpey, M. M.; Wink, D. A.; Grisham, M. B. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **2004**, *286*, R431-R444.
- (264) Koide, Y.; Urano, Y.; Kenmoku, S.; Kojima, H.; Nagano, T. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 10324-+.
- (265) Radi, R. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **2004**, *101*, 4003-4008.

- (266) Castro, L.; Demicheli, V.; Tortora, V.; Radi, R. *Free Radical Research* **2011**, *45*, 37-52.
- (267) Han, D.; Canali, R.; Garcia, J.; Aguilera, R.; Gallaher, T. K.; Cadenas, E. *Biochemistry* **2005**, *44*, 11986-11996.
- (268) Yan, L. J.; Levine, R. L.; Sohal, R. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 11168-11172.
- (269) Granger, D. L.; Taintor, R. R.; Boockvar, K. S.; Hibbs, J. B. In *Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase*, 1996; Vol. 268, pp 142-151.
- (270) Sun, J.; Zhang, X. J.; Broderick, M.; Fein, H. *Sensors* **2003**, *3*, 276-284.
- (271) Hamada, T.; Tanimoto, A.; Sasaguri, Y. *Apoptosis* **1997**, *2*, 359-367.
- (272) Villamena, F. A.; Zweier, J. L. *Antioxidants & Redox Signaling* **2004**, *6*, 619-629.
- (273) Berliner, L. J.; Fujii, H. *Antioxidants & Redox Signaling* **2004**, *6*, 649-656.
- (274) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Biochemical Journal* **1984**, *219*, 1-14.
- (275) Privat, C.; Trevin, S.; Bedioui, F.; Devynck, J. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1997**, *436*, 261-265.
- (276) Privat, C.; Stepien, O.; David-Duflho, M.; Brunet, A.; Bedioui, F.; Marche, P.; Devynck, J.; Devynck, M. A. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *27*, 554-559.
- (277) Mesaros, S.; Vankova, Z.; Grunfeld, S.; Mesarosova, A.; Malinski, T. *Analytica Chimica Acta* **1998**, *358*, 27-33.
- (278) Descroix, S.; Bedioui, F. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 524-528.
- (279) Song, M. I.; Bier, F. F.; Scheller, F. W. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1995**, *38*, 419-422.
- (280) Lvovich, V.; Scheeline, A. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 454-462.
- (281) Tanaka, K.; Kobayashi, F.; Isogai, Y.; Iizuka, T. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1991**, *26*, 413-421.
- (282) Green, M. J.; Hill, H. A. O.; Tew, D. G.; Walton, N. J. *Febs Letters* **1984**, *170*, 69-72.
- (283) Hill, H. A. O.; Tew, D. G.; Walton, N. J. *Febs Letters* **1985**, *191*, 257-263.
- (284) Manning, P.; McNeil, C. J.; Cooper, J. M.; Hillhouse, E. W. *Free Radical Biology And Medicine* **1998**, *24*, 1304-1309.
- (285) Tammeveski, K.; Tenno, T. T.; Mashirin, A. A.; Hillhouse, E. W.; Manning, P.; McNeil, C. J. *Free Radical Biology and Medicine* **1998**, *25*, 973-978.
- (286) Toliás, C. M.; McNeil, C. J.; Kazlauskaitė, J.; Hillhouse, E. W. *Free Radical Biology And Medicine* **1999**, *26*, 99-106.
- (287) Buttemeyer, R.; Philipp, A. W.; Mall, J. W.; Ge, B. X.; Scheller, F. W.; Lisdat, F. *Microsurgery* **2002**, *22*, 108-113.
- (288) Cooper, J. M.; Greenough, K. R.; McNeil, C. J. *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **1993**, *347*, 267-275.
- (289) Thomson, L.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Radi, R. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, *319*, 491-497.
- (290) Yuasa, M.; Oyaizu, K.; Yamaguchi, A.; Ishikawa, M.; Eguchi, K.; Kobayashi, T.; Toyoda, Y.; Tsutsui, S. *Polymers for Advanced Technologies* **2005**, *16*, 287-292.
- (291) Friedemann, M. N.; Robinson, S. W.; Gerhardt, G. A. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 2621-2628.
- (292) Shibuki, K. *Neuroscience Research* **1990**, *9*, 69-76.
- (293) Maffei, A.; Prestori, F.; Shibuki, K.; Rossi, P.; Taglietti, V.; D'Angelo, E. *Journal of Neurophysiology* **2003**, *90*, 2478-2483.
- (294) Mitchell, K. M.; Michaelis, E. K. *Electroanalysis* **1998**, *10*, 81-88.
- (295) Bedioui, F.; Quinton, D.; Griveau, S.; Nyokong, T. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 9976-9988.
- (296) Shim, H. H.; Do, H.; Lee, Y. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 359-366.
- (297) Lantoine, F.; Trevin, S.; Bedioui, F.; Devynck, J. *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **1995**, *392*, 85-89.

- (298) Malinski, T.; Taha, Z.; Grunfeld, S.; Burewicz, A.; Tombouliau, P.; Kiechle, F. *Analytica Chimica Acta* **1993**, *279*, 135-140.
- (299) Pontie, M.; Gobin, C.; Pauporte, T.; Bedioui, F.; Devynck, J. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *411*, 175-185.
- (300) Borgmann, S. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394*, 95-105.
- (301) Salimi, A.; Noorbakhsh, A.; Ghadermarz, M. *Analytical Biochemistry* **2005**, *344*, 16-24.
- (302) Zhao, G.-C.; Yin, Z.-Z.; Zhang, L.; Wei, X.-W. *Electrochemistry Communications* **2005**, *7*, 256-260.
- (303) Lee, K.-P.; Gopalana, A. I.; Komathi, S. *Sensors and Actuators* **2009**, *B 141*, 518-525.
- (304) Ledru, S.; Ruillé, N.; Boujtita, M. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, *21*, 1591-1598.
- (305) Amatore, C.; Arbault, S.; Koh, A. C. W. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 1411-1419.
- (306) Koh, W. C. A.; Son, J. I.; Choe, E. S.; Shim, Y.-B. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 10075-10082.
- (307) Xue, J.; Ying, X.; Chen, J.; Xian, Y.; Jin, L. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 5313-5321.
- (308) Kubant, R.; Malinski, C.; Burewicz, A.; Malinski, T. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 410-416.
- (309) Zakharova, E. A.; Yurmazova, T. A.; Nazarov, B. F.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G. *New Journal of Chemistry* **2007**, *31*, 394-400.
- (310) Quinton, D.; Griveau, S.; Bedioui, F. *Electrochemistry Communications* **2010**, *12*, 1446-1449.
- (311) Quinton, D.; Girard, A.; Kim, L. T. T.; Raimbault, V.; Griscom, L.; Razan, F.; Griveau, S.; Bedioui, F. *Lab on a Chip* **2011**, *11*, 1342-1350.
- (312) Amatore, C.; Arbault, S.; Bouret, Y.; Cauli, B.; Guille, M.; Rancillac, A.; Rossier, J. *Chemphyschem* **2006**, *7*, 181-187.
- (313) Arbault, S.; Pantano, P.; Jankowski, J. A.; Vuillaume, M.; Amatore, C. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 3382-3390.
- (314) Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; de Oliveira, P.; Erard, M.; Vuillaume, M. *Faraday Discussions* **2000**, 319-333.
- (315) Amatore, C.; Arbault, S.; Bruce, D.; de Oliveira, P.; Erard, M.; Vuillaume, M. *Chemistry-a European Journal* **2001**, *7*, 4171-4179.
- (316) Amatore, C.; Arbault, S.; Ferreira, D. C. M.; Tapsoba, I.; Verchier, Y. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2008**, *615*, 34-44.
- (317) Arbault, S.; Edeas, M.; Legrand-Poels, S.; Sojic, N.; Amatore, C.; Piette, J.; Best-Belpomme, M.; Lindenbaum, A.; Vuillaume, M. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **1997**, *51*, 430-438.
- (318) Lachgar, A.; Sojic, N.; Arbault, S.; Bruce, D.; Sarasin, A.; Amatore, C.; Bizzini, B.; Zagury, D.; Vuillaume, M. *Journal of Virology* **1999**, *73*, 1447-1452.
- (319) Xia, Y. N.; Whitesides, G. M. *Annual Review Of Materials Science* **1998**, *28*, 153-184.
- (320) Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 4974-4984.
- (321) Kim, E.; Xia, Y. N.; Whitesides, G. M. *Nature* **1995**, *376*, 581-584.
- (322) Braun, V.; Niedergang, F. *Biology of the Cell* **2006**, *98*, 195-201.
- (323) Chin, L. K.; Yu, J. Q.; Fu, Y.; Yu, T.; Liu, A. Q.; Luo, K. Q. *Lab on a Chip* **2011**, *11*, 1856-1863.
- (324) Murphy, B. M.; Dandy, D. S.; Henry, C. S. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *640*, 1-6.
- (325) Bai, H. Y.; Lin, S. L.; Chung, Y. T.; Liu, T. Y.; Chan, S. A.; Fuh, M. R. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 2085-2090.
- (326) Gunasekara, D. B.; Hulvey, M. K.; Lunte, S. M. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 832-837.
- (327) Yokoyama, I.; Negita, M.; Liu, D. G.; Nagasaka, T.; Kobayashi, T.; Hayakawa, A.; Hayashi, S.; Nakao, A. *Transplant International* **2002**, *15*, 220-225.
- (328) Ikariyama, Y.; Yamauchi, S.; Yukiashi, T.; Ushioda, H. *Journal of the Electrochemical Society* **1989**, *136*, 702-706.
- (329) Polk, B. J.; Stelzenmuller, A.; Mijares, G.; MacCrehan, W.; Gaitan, M. *Sensors And Actuators B-Chemical* **2006**, *114*, 239-247.

Résumé

De par leur excellente résolution spatiale et leurs propriétés particulières, les ultramicroélectrodes (UME) constituent des outils de choix pour l'étude de mécanismes biologiques de sécrétion à l'échelle de la cellule unique. En configuration « synapse semi-artificielle », du fait de la faible distance qui sépare la cellule émettrice de l'UME, les molécules sont libérées dans un faible volume, induisant alors des concentrations suffisamment élevées pour être détectables par électrochimie. Ainsi, les UME offrent la possibilité de mesurer des flux, même infimes, de molécules électroactives en temps réel. Cette technique analytique a été utilisée, complétée ou adaptée afin d'étudier deux phénomènes biologiques : l'exocytose vésiculaire et le stress oxydant cellulaire.

L'analyse ampérométrique de l'exocytose, mécanisme impliqué dans la communication cellulaire, permet l'étude quantitative de la cinétique de libération des molécules intravésiculaires libérées dans le milieu extracellulaire. L'UME, placée dans le milieu extérieur, n'apporte pas d'information quant au statut des vésicules avant la fusion. Pour compléter ces informations, nous avons développé, par des techniques de microfabrication, un microsystème constitué d'électrodes conductrices et transparentes d'ITO permettant un couplage des détections ampérométrique et optique (microscopie TIRF) pour l'étude de la sécrétion des cellules BON BC21.

L'ampérométrie à quatre potentiels constants, utilisée au laboratoire pour la détection des ROS/RNS libérées par les macrophages, cellules du système immunitaire, nécessite un grand nombre d'expériences pour s'affranchir de la variabilité cellulaire et des différences de sensibilité des UME. Afin de réduire considérablement le temps d'expérience, nous avons développé un microsystème constitué de quatre chambres de mesure, chacune contenant un jeu de trois électrodes. Ces quatre chambres permettront, à terme, le suivi et la détection simultanée en temps réel des variations de production de H_2O_2 , ONOO^- , NO^\bullet et NO_2^- libérées par une cellule.

Abstract

Excellent spatial and temporal resolution and physico-chemical properties of ultramicroelectrodes (UME) induce high detection sensitivity, thus being particularly well adapted to the study of biological mechanisms of secretion from a single cell. In the « semi-artificial synapse » configuration, the short distance between the transmitting cell and the UME causes appropriate local concentration to be electrochemically detected. UME allows the detection of minute amount of electroactive molecules in real time. This analytical technique was used, completed or adapted to study two major biological phenomena: vesicular exocytosis and cellular oxidative stress.

Amperometric investigations of exocytosis, a key mechanism involved in cell communication, allow quantitative monitoring of the kinetics of intravesicular species release into extracellular medium. An UME, placed in the external environment, does not provide any information about vesicles status before fusion. In order to complement this information, we have developed, through microfabrication techniques, a device constituted by conductive and transparent ITO electrodes for combined detection by amperometry and optical microscopy (TIRFM) for the study of BON BC21 cells secretion.

Amperometry at four different constant potentials, used in the laboratory for the detection of ROS/RNS released by macrophages, immune cells, requires a large number of experiments to overcome the cell variability and differences in UME sensitivity. To significantly reduce the experimental duration, we have developed a device constituted by four measuring chambers, each containing a set of three electrodes. These four chambers will allow real time and simultaneous monitoring of changes in production of H_2O_2 , ONOO^- , NO^\bullet and NO_2^- by a single cell.

