



Dispositif microfluidique pour la quantification de sous-populations de cellules

Rémi Manczak

► To cite this version:

Rémi Manczak. Dispositif microfluidique pour la quantification de sous-populations de cellules. Génie des procédés. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30165 . tel-01315630v2

HAL Id: tel-01315630

<https://theses.hal.science/tel-01315630v2>

Submitted on 4 Sep 2017

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Rémi Manczak

le mercredi 27 janvier 2016

Titre :

Dispositif microfluidique pour la quantification de sous-populations de cellules

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

PHARMA-DEV et LAAS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Karine Reybier

Anne-Marie Gué

Jury :

Pr Jean-Louis Marty, Université de Perpignan Via Domitia, Rapporteur

Dr Vincent Senez, CNRS, Lille, Rapporteur

Dr Marie Frénéa-Robin, Université Claude Bernard Lyon I, Examineur

Pr Patrice Simon, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Examineur

Dr Jean-Jacques Fournié, INSERM, Toulouse, Invité

Pr Paul-Louis Fabre, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Invité

Remerciements

A l'heure d'écrire cette page de remerciements et après plus de trois ans passés au sein des Laboratoires de Pharmacochimie et de Pharmacologie pour le développement, PHARMA-DEV, et d'Analyse et d'Architecture des Systèmes, LAAS, je tiens tout d'abord à remercier Nicolas Fabre et Jean Arlat, de m'avoir accueilli dans leur unité respective, et Françoise Nepveu dans l'équipe REDSTRESS.

Mes premières pensées vont à mes deux directrices de thèse, Karine Reybier et Anne-Marie Gué, que je souhaite tout particulièrement remercier pour leur disponibilité, leurs savoirs et leur écoute. Elles ont su impulser un véritable rythme de travail, toujours dans une ambiance conviviale et m'ont encouragé et soutenu tout au long de ces années.

Je souhaite également remercier très sincèrement tous ceux qui m'ont aidé à faire avancer mes travaux de recherche, à savoir Marc Fouet, mon homologue du LAAS, pour ses connaissances des techniques de microfabrication, ses nombreux conseils, et nos divers échanges, Armelle Montrose pour le passage de témoin lors de mon arrivée et Paul Louis Fabre, pour ses connaissances en électrochimie qu'il a essayé de me transmettre et les nombreuses explications qu'il a pu m'apporter et sans qui ce travail n'aurait pas abouti.

J'adresse un remerciement particulier à Jean-Louis Marty de l'Université de Perpignan et Vincent Senez de l'Institut Supérieur de l'Electronique et du Numérique de Lille, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je souhaite également remercier Patrice Simon du Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT), Marie Frénéa-Robin de l'Université Claude Bernard, Lyon 1 pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury.

Je remercie également Jean-Jacques Fournié et Marie Tosolini du Centre de Recherche contre le Cancer de Toulouse (CRCT) avec qui nous avons collaboré dans le cadre de cette thèse, pour leur disponibilité et les nombreuses connaissances qu'ils ont pu nous apporter dans le domaine de la biologie cellulaire.

Je souhaite bien sûr aussi remercier mes différents collègues de bureau, Pierre Péro pour sa bonne humeur et son aide permanente vis-à-vis de mes différents soucis techniques, Ennaji Najahi pour sa joie de vivre quotidienne et nos longues discussions sur le football et précisément sur son équipe nationale tunisienne, Nambinina Rakotoarivelo pour sa gentillesse, et Mireia Tomàs pour avoir essayé de remettre à niveau mon espagnol scolaire.

J'exprime toute ma gratitude au personnel de la plateforme biologique de PHARMA-DEV de m'avoir encadré et formé aux manipulations de culture cellulaire. Je tiens aussi à remercier

tous les membres du laboratoire, passés et présents, permanents ou non permanents que j'ai eu l'occasion de près ou de loin, et qui m'ont permis de travailler dans une ambiance sympathique : Alexis Valentin, Fabrice Collin, Mohammed Haddad, Eric Deharo, Jan Sudor, Geneviève Bourdy, Valérie Jullian, Stéphanie Caze-Subra, Camille Gironde, Cynthia Girardi, Clémence Cheignon, Solomiia Kozachok, Thi Thu Vu, Laure-estelle Cassagnes, Yen Nguyen, Sokhna Keita Alassane, Luyen Hong Le, Rachid Chawech, German Gonzalez, Aida Chaker et tous les membres du Laboratoire PHARMA-DEV.

Il en revient de même au service TEAM du LAAS et tout particulièrement à Véronique Conédéra pour m'avoir encadré en salle blanche et apporté ses nombreux conseils, mais aussi Adrian Laborde et Laurent Mazenq pour les étapes de photolithographie, Rémi Courson pour la formation au laminage de films secs, David Bourrier et Sylviane Baster pour la recharge électrolytique, Ludovic Salvagnac pour la métallisation et Pierre-Francois Calmon pour la réalisation des masques photolithographiques.

Je souhaite adresser un très grand merci à Eliane Pelissou et Franck Marie-Sainte pour leur gentillesse et le temps qu'ils ont consacré pour répondre aux aspects administratifs de ma thèse.

Finalement mes plus grands remerciements vont vers ma famille et mes amis pour leur soutien au cours de ces trois années. Merci à mes parents qui ont su trouver les mots pour m'encourager à poursuivre dans cette voie, et soutenu tout au long de mes études. Mat et Raphy mes deux fréros, un très grand merci à vous deux aussi d'être toujours présents quand il le faut et de continuer à tisser ses liens fraternels qui nous lient depuis de nombreuses années nous rendant indéniablement plus forts. Emmeline je ne sais comment te remercier pour tout ce que tu m'apportes au quotidien. Ton soutien indéfectible, ton enthousiasme et ta patience m'ont permis d'avancer plus sereinement tout au long de cette thèse.

Une grosse pensée pour mes amis de longue date (Loulou, Dams, Maxime, Max, Flo, Flavien, Luca, Rémi, Bastien,...) mais aussi mes amis du rugby (Coca, Jpp, Calvi, Mat et tous les autres), pour m'avoir permis de m'aérer l'esprit et de passer des soirées inoubliables !

Je dédie cette thèse à ma fille Naomie, arrivée dans notre vie depuis bientôt une semaine comblant ses parents de bonheur.

« J'ai appris que le succès en doit pas être mesuré par la position qu'on a atteint dans la vie, mais par les obstacles qu'on a dû surmonter, tout en essayant de réussir » Booker T. Washington

« Personne ne vous oblige à jouer. Mais si vous le faites, ce ne doit pas être à moitié. Car le rugby est un supplément à la vie » André Boniface

Sommaire

Liste des symboles et abréviations.....	6
Introduction générale.....	9
Chapitre 1 : Impédance et analyses cellulaires	
1. Introduction	14
2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)	15
2.1. Généralités sur l'impédance.....	15
2.2. Principe de la méthode de Spectroscopie d'Impédance Electrochimique.....	18
2.3. Effets d'interfaces électrode/électrolyte	18
2.3.1. Chute ohmique	18
2.3.2. La capacité de double couche	18
2.3.3. Processus Faradique.....	20
2.3.4. Diffusion des espèces à l'électrode	20
2.4. Exploitation des résultats : schémas électriques équivalents.....	21
2.5. Représentation en SIE	22
2.5.1. Diagramme de Bode.....	23
2.5.2. Diagramme de Nyquist.....	24
3. Applications de l'impédance à l'analyse des cellules	26
3.1. Analyses collectives	26
3.1.1. Différenciation cellulaire	28
3.1.2. Mesure d'adhérence.....	29
3.1.3. Cytotoxicité et criblage de substances bioactives	30
3.2. Analyse individuelle.....	32
3.2.1. Comptage individuel type Coulter.....	32
3.2.2. Analyse de la cellule unique	34
3.3. Microscopie par mesure d'impédance électrochimique	36
3.4. Un dispositif impédimétrique commercial, le capteur multiparamétrique, Bionas 2500® ..	38
4. Systèmes impédimétriques microfluidiques	40
4.1. Choix des matériaux.....	41
4.2. Caractéristiques de l'écoulement.....	42
4.3. Exemples de réalisation de dispositifs microfluidiques impédimétriques.....	42
5. Conclusion	45

Bibliographie.....	46
---------------------------	-----------

Chapitre 2 : Descriptif du projet

1. Introduction	56
2. Présentation générale du laboratoire sur puce.....	59
2.1. Principe général.....	59
2.2. Choix des cellules	59
2.3. Description du dispositif développé.....	60
2.3.1. Phase de marquage	62
2.3.2. Phase de séparation magnétique.....	62
2.3.3. Phase de détection.....	63
3. Objectifs de la thèse	63
3.1. Influence de la taille des microélectrodes.....	63
3.2. Bio fonctionnalisation des microélectrodes.....	64
3.3. Matériels et Méthodes d'analyses	67
4. Conclusion	69
Bibliographie	70

Chapitre 3 : Etudes de la sensibilité des microélectrodes

1. Introduction	76
2. Première génération de dispositif.....	77
2.1. Technologie de microfabrication.....	77
2.1.1. Préparation du substrat.....	77
2.1.2. Photolithographie et structuration des électrodes d'or	78
2.1.3. Métallisation.....	79
2.1.4. Réalisation des canalisations en PDMS	79
2.2. Qualification en mode statique.....	83
2.3. Qualification en mode fluide.....	85
3. Seconde génération de dispositif.....	88
3.1. Technologie de microfabrication.....	88
3.2. Qualification en mode statique.....	89
3.2.1. Tests de spécificité	89
3.2.2. Fonctionnalisation et piégeage cellulaire.....	90
3.3. Qualification en mode fluide.....	94

3.3.1.	Modifications technologiques de microfabrication	
3.3.2.	Tests de fonctionnalisation de la SU8	98
3.3.3.	Fonctionnalisation des microélectrodes	99
3.3.4.	Piégeage cellulaire.....	100
4.	Optimisation du design des microélectrodes Interdigitées	102
4.1.	Variation de l'espace inter-électrode.....	103
4.2.	Influence du nombre de brins	106
4.2.1.	Modifications technologiques	106
4.2.2.	Piégeage cellulaire.....	108
5.	Conclusion	110
	Bibliographie	111

Chapitre 4 : Application à l'étude d'interactions récepteurs / ligands

1.	Introduction	118
2.	Choix du système étudié	119
3.	Fonctionnalisation des microélectrodes	120
3.1.	Etudes préliminaires sur macroélectrodes.....	121
3.2.	Transposition aux microélectrodes	123
4.	Les interactions Ligands – Récepteurs A2a	126
4.1.	Mesures d'impédance en mode faradique.....	126
4.1.1.	Interactions avec cellules présentant le récepteur A2a	126
4.1.2.	Cas des cellules n'exprimant pas le récepteur A2a	129
4.1.3.	Analyse de mélanges	130
4.2.	Mesures d'impédance en mode non faradique.	132
5.	Compétition d'interactions au récepteur A2a entre le c-di-AMP et des molécules libres.....	134
5.1.	Cas du ZM 241385	135
5.2.	Cas du CGS 21680	136
6.	Discussions	137
	Bibliographie	140
	Conclusion générale.....	143
	Annexes.....	145

Liste des symboles et abréviations

A.

a : aire de l'électrode
 α : coefficient de transfert de charges
A2a : récepteur de l'adénosine
ADN : acide désoxyribonucléique

B.

b : longueur d'électrode
BALB3T3 : fibroblastes de souris immortalisés
BEL7404 : cellules humaines d'hépatocarcinome
BRET : transfert d'énergie par résonance de bioluminescence
BSA : Albumine de Sérum Bovin

C.

C : capacité
 C^* : concentration de la molécule redox
 C_{dc} : capacité interfaciale
c-di-AMP : diadénosine monophosphate cyclique
CE : contre-électrode
 CE_{50} : concentration efficace médiane
CEE : Circuits Electriques Equivalents
CHO : Chinese Hamster Ovary
COC : copolymères d'oléfines cycliques
Cr : chrome
CRCT : Centre de Recherche Contre le Cancer de Toulouse
CTC : cellules tumorales circulantes
 $\overline{C_{ox}}$: concentration à l'état stationnaire de l'espèce oxydée
 $\overline{C_{red}}$: concentration à l'état stationnaire de l'espèce réduite

D.

D : coefficient de diffusion de la molécule redox
 D_{ox} : coefficient de diffusion de l'espèce oxydée
 D_{red} : coefficient de diffusion de l'espèce réduite
 δ_n : Épaisseur de la couche de diffusion selon le modèle de Nernst

E.

E^0 : potentiel standard du système étudié
 E_0 : potentiel constant imposé
e : épaisseur du diélectrique
 ϵ : permittivité relative diélectrique
 ϵ_0 : permittivité diélectrique du vide
ECIS : Electric Cell-substrate Impedance Sensing
ECM : matrice extracellulaire
ECS : électrode de référence au calomel saturé
EDC : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
EDI : eau déionisée
EIM : electrochemical impedance microscope

F.

f : fréquence
F : constante de Faraday
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC : Fluorescein isothiocyanate
FRET : transfert d'énergie par résonance de fluorescence
 ϕ : déphasage

G.

g : espace inter électrode
 γ : gain statique dont les unités sont fonctions des grandeurs physiques d'entrée et de sortie du système
GPCR : G protein coupled receptor

H.

Hela : cellules de carcinome épithélioïde de col de l'utérus humain
HMDS : HexaMéthylDiSiloxane
HUVEC : cellules endothéliales de veine ombilicale humaine

I.

I_0 : courant d'échange à l'équilibre
 IC_{50} : concentration inhibitrice médiane
ICP-CVD : Inductivity Coupled Plasma Chemical Vapor Deposition

K.

k^0 : constante standard de transfert d'électrons
 K_D : constante cinétique de dissociation à l'équilibre
 K_{on} : constante cinétique d'association
 K_{off} : constante cinétique de dissociation
Kyse 30 : cellules du cancer de l'œsophage humain
 $K(p)$: intégrale elliptique complète

L.

l : largeur d'électrode
LOC : lab-on-chip
LPCVD : Low-Pressure Chemical Vapor Deposition
LPS : lipopolysaccharide

M.

m : nombre d'électrodes
MCF-7 : Cellules tumorales humaines du cancer du sein
MDA-MB-231 : Cellules tumorales humaines du cancer du sein

MDA-MB-435 : Cellules tumorales humaines du cancer du sein
MEMS : systèmes micro-électro-mécaniques
MH : 6-mercaptophexanol
 μ TASs : micro-systèmes complets d'analyse
 μ EIS : spectroscopie d'impédance micro-électrique
MO : monocytes
MUA : acide 11-mercaptoundecanoïque

N.

n : nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction redox
NHS : N-hydroxysuccinimide

P.

p : paramètre géométrique d'alignement de l'interdigitation
 P_A : pression atmosphérique
 P_E : pression d'entrée
 P_S : pression de sortie
PC-3 : cellules cancéreuses
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDMS : polydiméthylsiloxane
PEG-DA : polyéthylène diacrylate
PG : Protéine G
PGE : polyelectrolyte gel electrodes
PMMA : polyméthacrylate de méthyle
POC : point-of-care

R.

r : rayon de disque de l'électrode
R : constante des gaz parfaits
 R_d : résistance de diffusion
 R_e : résistance de l'électrolyte
 R_{tc} : résistance au transfert de charge
RWPE-1 : cellules humaines normales de la prostate

S.

s : variable symbolique du domaine de Laplace

SAM : Self Assembled Monolayer
SCA : Single Cell Analysis
SIE : Spectroscopie d'Impédance
Electrochimique
SiHa : cellules du cancer du col utérin
humain
SNR : signal-to-noise ratio
SPR : Surface Plasmon Resonance

T.

T : température (K)
 $t_{1/2}$: temps de demi-vie
Ti : titane
 τ : temps de réponse du système
(secondes)

U.

U87MG : cellules du glioblastome humain

W.

W : impédance de Warburg
WE : électrode de travail
 ω : pulsation

Z.

|Z| : module de l'impédance
 Z_j : Partie imaginaire de l'impédance
 Z_r : Partie réelle de l'impédance

Introduction générale

L'optimisation de microsystèmes de détection de cellules vivantes à haut débit représente un enjeu important dans différents domaines comme la toxicologie, le criblage de molécules bioactives, l'ingénierie tissulaire ou encore la médecine régénérative. Ces types de biocapteurs peuvent également donner un aperçu de la complexité des interactions cellules-cellules ou cellules-surface active, en présence de toxines ou de composés pharmaceutiques par exemple. Cependant, pour des tests à haut débit, la plupart de ces systèmes de détection nécessitent à ce jour des équipements coûteux tels que des incubateurs ou des systèmes d'imagerie optique externe, ainsi que dans la plupart des cas, l'apport de la robotique. De plus, ils se limitent à des méthodes de cultures statiques à l'aide de cellules traditionnelles ayant besoin de réactifs onéreux, de grands volumes, et d'étapes de traitement complexes conduisant à de faibles reproductibilités de dosage et précisions de mesures.

Le principal défi associé à l'adaptation des systèmes traditionnels reste la réduction considérable des volumes d'échantillons et de réactifs, ainsi que la possibilité d'effectuer des analyses en temps réel, voire au chevet du patient.

Ainsi, afin de suivre les futures tendances, ces microsystèmes de détection de cellules vivantes ont été récemment associés aux technologies microfluidiques et constituent une nouvelle génération d'outils d'analyses de cellules. Ces dispositifs sont capables de tester à moindre coût des échantillons de faibles populations cellulaires dans des conditions contrôlées et reproductibles, pouvant aller jusqu'à la caractérisation de cellules uniques, révolutionnant ainsi la médecine de précision.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse consiste à développer un dispositif de type « laboratoire-sur-puce » pour le tri et le comptage par spectroscopie d'impédance électrochimique de sous-populations cellulaires comme marqueurs d'une pathologie pour le diagnostic semi-rapide de terrain, répondant aux attentes de la miniaturisation des systèmes classiques de détection. Cet immunocapteur vise la détection de très faibles quantités d'espèces cellulaires afin qu'à terme, puissent être envisagés des essais concluants à partir de milieux d'analyses complexes, tels que le sang complet.

Ce mémoire s'articule ainsi autour de quatre chapitres.

La première partie est consacrée à la présentation de la technique de spectroscopie d'impédance et de ses principales applications dans le domaine de l'analyse cellulaire. La description du projet global dans lequel s'inscrit ce travail de thèse constitue le second chapitre. Le chapitre 3 présente la conception et l'utilisation de plusieurs générations de dispositifs microfluidiques vis-à-vis de la détection de monocytes infectieux et en particulier

l'influence de la géométrie des électrodes sur les performances du dispositif. Enfin, le chapitre 4 présente les premières briques d'une nouvelle approche de détection, basée sur le même système impédimétrique, permettant de caractériser des interactions récepteurs-ligands à partir de cellules entières.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre les équipes REDSTRESS (mécanisme redox et stress oxydant) du laboratoire **PHARMA-DEV, UMR IRD 152, Pharmacochimie et Biologie pour le Développement**, et N2IS (Nano Ingénierie et Intégration des Systèmes) du **LAAS CNRS, Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes**, porteur du projet DIGIDIAG, diagnostic digital. La thèse a été réalisée en co-tutelle entre ces deux laboratoires.

Chapitre 1 : Impédance et analyses cellulaires

Chapitre 1 : Impédance et analyses cellulaires

1. Introduction	14
2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)	15
2.1. Généralités sur l'impédance.....	15
2.2. Principe de la méthode de Spectroscopie d'Impédance Electrochimique.....	15
2.3. Effets d'interfaces électrode/électrolyte	18
2.3.1. Chute ohmique	18
2.3.2. La capacité de double couche	18
2.3.3. Processus Faradique.....	20
2.3.4. Diffusion des espèces à l'électrode	20
2.4. Exploitation des résultats : schémas électriques équivalents.....	21
2.5. Représentation en SIE	22
2.5.1. Diagramme de Bode.....	23
2.5.2. Diagramme de Nyquist.....	24
3. Applications de l'impédance à l'analyse des cellules	26
3.1. Analyses collectives	26
3.1.1. Différenciation cellulaire	28
3.1.2. Mesure d'adhérence	29
3.1.3. Cytotoxicité et criblage de substances bioactives.....	30
3.2. Analyse individuelle.....	32
3.2.1. Comptage individuel type Coulter.....	32
3.2.2. Analyse de la cellule unique	34
3.3. Microscopie par mesure d'impédance électrochimique	36
3.4. Un dispositif impédimétrique commercial, le capteur multiparamétrique, Bionas 2500® ..	38
4. Systèmes impédimétriques microfluidiques	40
4.1. Choix des matériaux	41
4.2. Caractéristiques de l'écoulement.....	42
4.3. Exemples de réalisation de dispositifs microfluidiques impédimétriques.....	42
5. Conclusion	45
Bibliographie	46

1. Introduction

Les cellules vivantes possèdent des propriétés biophysiques et biochimiques uniques pour maintenir des fonctions spécifiques dans l'environnement physiologique. Ces propriétés biophysiques (mécaniques et électriques), jouent un rôle important dans la régulation de diverses activités biologiques au niveau moléculaire et cellulaire, et peuvent servir de marqueurs de l'état physiologique des cellules¹.

La cellule, l'unité fonctionnelle de base des organismes vivants, maintient et détecte l'environnement physiologique de l'organisme à la fois chimiquement et physiquement². Ses propriétés biochimiques et biophysiques uniques lui permettent de remplir des fonctions spécifiques et de s'adapter à son environnement. Les changements physiologiques dans les cellules sont accompagnés de modifications chimiques et physiques ainsi que d'une réorganisation interne. Ainsi, les cellules pathologiques peuvent être identifiées biochimiquement et/ou biophysiquement. Leurs propriétés biochimiques sont étudiées de manière intensive, et de nombreux marqueurs biochimiques ont été développés pour identifier les cellules cibles d'une population hétérogène³. Les propriétés biophysiques des cellules jouent également un rôle important dans divers processus biologiques et sont impliquées dans la régulation de l'expression génique, la différenciation, la migration et les activités métaboliques⁴.

Durant les deux dernières décennies, un certain nombre d'outils de recherche ont été développés pour comprendre la relation entre les changements de propriétés biophysiques des cellules et les maladies humaines. L'analyse des propriétés biophysiques, comme la caractérisation électrique, mécanique, optique et thermique des cellules fournit des connaissances essentielles au diagnostic, à la recherche clinique et à l'industrie pharmaceutique. Ces propriétés fournissent également des signaux précoces de maladies, ou tout autre état anormal du corps humain, ce qui en fait des marqueurs potentiels pour l'identification de cancers ou de bactéries, pour la détection de toxines et pour l'étude du statut des tissus.

Les technologies de miniaturisation des dispositifs, telles que la microfluidique, apportent des améliorations significatives dans les secteurs de la biologie et de la recherche clinique⁵. Les analyses de cellules uniques (SCA pour Single Cell Analysis) sont devenues un sujet majeur pour les ingénieurs et les scientifiques au cours des vingt dernières années. Des outils expérimentaux, ainsi que des technologies capables d'effectuer des mesures telles que l'impédance, se sont régulièrement développés afin de proposer un dépistage de cellules uniques, de sous-populations cellulaires ou de microorganismes. Parmi ces outils, la spectroscopie d'impédance électrochimique a gagné en popularité pour de telles applications.

Ce premier chapitre sera consacré à la présentation de la spectroscopie d'impédance électrochimique et de son utilisation dans le domaine de l'analyse cellulaire. Les bénéfices liés à l'utilisation de la microfluidique seront également présentés dans une seconde partie.

2. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

2.1. Généralités sur l'impédance

L'impédance est une caractéristique physique d'un système, définie comme le rapport d'une grandeur caractérisant une excitation à laquelle il est soumis à celui d'une grandeur caractérisant sa réponse. Le plus souvent, cette notion s'applique à des grandeurs variables, dont l'évolution peut s'étudier selon les méthodes de l'analyse harmonique. On exprime alors la relation entre l'impédance et la fréquence par *l'impédance complexe*, une expression mathématique en nombre complexe qui indique à la fois l'amplitude et le déphasage de cette réponse.

L'impédance électrochimique représente la réponse d'un système d'électrodes plongées dans une solution à une excitation électrique. Celui-ci est généralement constitué d'une électrode de travail, d'une contre-électrode et d'une électrode de référence. Dans le cas des milieux biologiques, de fortes perturbations complexes sont produites au niveau de l'interface électrodes/milieu biologique lors de la polarisation de celui-ci⁶. La mesure de l'impédance, souvent difficile à interpréter en raison de la complexité des mécanismes qui interviennent, peut donner de multiples informations sur la nature des ions et espèces présentes en solution ainsi que sur la nature des électrodes, comme l'état de surface ou la porosité.

2.2. Principe de la méthode de Spectroscopie d'Impédance Electrochimique

La Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) a connu un essor considérable, en particulier pour l'étude des interfaces électrodes/électrolytes. Cette technique consiste à appliquer une excitation de fréquence variable et à mesurer l'impédance du système pour chacune des valeurs de la fréquence d'excitation.

En plus des applications répandues dans les domaines de la caractérisation de matériaux⁷, de batteries⁸, de piles à combustibles⁹ ou des phénomènes de corrosion¹⁰, la SIE a gagné en popularité dans les études de diffusion des ions à travers des membranes ou encore de caractérisation d'interfaces de semi-conducteurs. La mise en œuvre de la SIE peut facilement être automatisée et ses résultats peuvent souvent être corrélés avec des variables ou des processus physico-chimiques tels que : transport de masse, vitesse de réaction, corrosion, propriétés diélectriques, défauts, microstructure, influence de la composition, mobilité et concentration des espèces mobiles.

La SIE s'est développée ces dernières années pour la caractérisation d'électrodes fonctionnalisées^{11,12} dans le domaine de la biologie (immobilisation de biomatériaux, enzymes, anticorps, cellules, ... modifiant la capacitance et le transfert d'électrons au voisinage de la surface active) ou l'étude des transformations biocatalytiques au niveau des surfaces d'électrodes (analyse des changements d'interfaces, de cinétique et des mécanismes

de transfert d'électrons), et en particulier pour la transduction des événements de bio-détection. Les mesures par SIE ont ainsi permis de caractériser les propriétés impédimétriques de tissus biologiques, la composition générale d'échantillons biologiques ou la différenciation cellulaire. Différents immunocapteurs utilisant les mesures d'impédance ont ainsi été développés pour traduire les interactions antigène-anticorps, d'ADN ou d'enzymes¹³.

La SIE repose sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation volontaire du **système électrochimique** étudié. Le système réagit en émettant un signal $y(t)$ quand il est soumis à une perturbation $x(t)$ (Figure I-1). Les deux signaux $x(t)$ et $y(t)$ sont alors reliés par une fonction de transfert $H(\omega)$ telle que :

$$Y(\omega) = H(\omega) X(\omega)$$

$X(\omega)$ et $Y(\omega)$ étant respectivement les transformées de Fourier de $x(t)$ et $y(t)$.

L'analyse de cette réponse permet d'obtenir des informations sur les propriétés physico-chimiques du système étudié¹⁴.

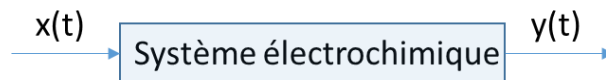


Figure I-1 : Schéma d'une fonction de transfert

La perturbation imposée pour la mesure de l'impédance électrochimique est sinusoïdale. Le signal appliqué est donc de la forme :

$$x(t) = A \sin(\omega t)$$

Et la réponse du système étant :

$$y(t) = B \sin(\omega t + \phi)$$

avec une fréquence f , une pulsation $\omega = 2\pi f$, et un déphasage ϕ .

L'analyse de la réponse du système contient des informations sur l'interface électrode/électrolyte, la structure des électrodes et les réactions qui se déroulent au voisinage de la surface d'électrodes.

En mode potentiostatique, la consigne est définie par :

$$x(t) = E_0 + A \sin(\omega t)$$

Et la mesure représente un courant défini par :

$$y(t) = I_0 + B \sin(\omega t + \phi)$$

L'impédance électrochimique se définit alors comme étant le nombre complexe $Z(\omega)$ résultant du rapport :

$$Z(\omega) = \frac{\Delta E(\omega)}{\Delta I(\omega)}$$

$\Delta E(\omega)$ représentant la perturbation imposée au potentiel E_0 , et $\Delta I(\omega)$ la réponse en courant du système étudié avec une composante continue I_0 (Figure I-1).

Il est aussi possible d'imposer une perturbation en courant de faible amplitude, on parle alors de mode galvanostatique. Dans ce cas, on mesure la réponse en potentiel du système électrochimique.

L'impédance électrochimique $Z(\omega)$ est donc un nombre complexe qui peut être écrit sous deux formes équivalentes :

$$Z(\omega) = |Z(\omega)|e^{j\phi(\omega)}$$

$$Z(\omega) = Z_r(\omega) + jZ_j(\omega)$$

Avec :

- $j = \sqrt{-1}$
- $|Z|$ le module de l'impédance, $|Z|^2 = Z_r^2 + Z_j^2$
- ϕ le déphasage, $\phi = \tan^{-1} \frac{Z_j}{Z_r}$
- Z_r la partie réelle de l'impédance, $Z_r = |Z| \cos \phi$
- Z_j la partie imaginaire de l'impédance, $Z_j = |Z| \sin \phi$

Pour avoir une réponse linéaire du système il faut que l'amplitude de la sinusoïde soit suffisamment faible. Le tracé de la fonction :

$$\frac{\left| \frac{\Delta I}{\Delta E} \right|_f}{\left| \frac{\Delta I}{\Delta E} \right|_{f=0}} = f(\Delta E)$$

permet de s'assurer que l'amplitude est bien adaptée.

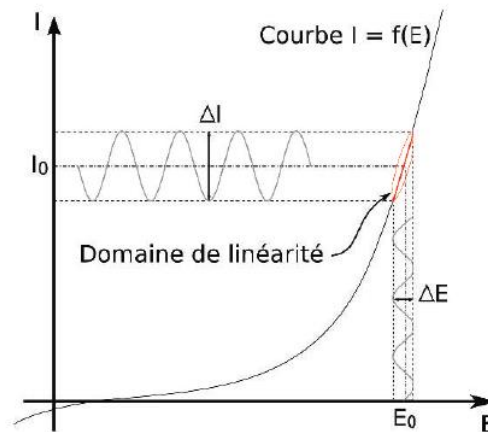


Figure I-2 : Réponse d'un système électrochimique soumis à une perturbation sinusoïdale¹⁴

2.3. Effets d'interfaces électrode/électrolyte

2.3.1. Chute ohmique

Dans une cellule électrochimique, l'électrode de référence et la contre-électrode étant placées relativement loin de la surface de l'électrode de travail, la polarisation de l'électrode de travail induit une chute ohmique égale au produit du courant induit et de la résistance d'électrolyte R_e ¹⁵. L'impédance de la chute ohmique est donc donnée par :

$$Z_{R_e}(\omega) = R_e$$

Pour une électrode classique du type disque, cette résistance varie en $1/r$, r étant le rayon du disque de l'électrode. Il y a donc un réel intérêt à diminuer la taille des électrodes.

2.3.2. La capacité de double couche

La capacité de double couche est due à la formation d'une double couche d'ions à l'interface électrode/électrolyte¹⁶. La figure I-3 illustre ce phénomène:

- La première (1), composée d'une couche de molécules d'eau adsorbées à la surface, contenue entre une couche d'ions en solutions et l'électrode, donne les effets capacitifs les plus forts, son épaisseur étant très faible. Il s'agit ici d'un effet diélectrique principalement dû à la polarisation dipolaire d'orientation des molécules d'eau. Cette couche est représentée la plupart du temps comme une capacité surfacique de grande valeur.
- La deuxième couche (2), plus épaisse, est composée d'un mélange de molécules d'eau et d'ions en solution non électriquement neutre. En présence d'un champ électrique, les ions sont attirés vers l'électrode de charge opposée. Il se produit alors un phénomène de polarisation par déplacement de charges. Les effets sur l'impédance sont complexes car ils allient un effet diélectrique dû aux charges des

ions ainsi qu'une conductivité induite par le même déplacement de ces charges dans une zone dense.

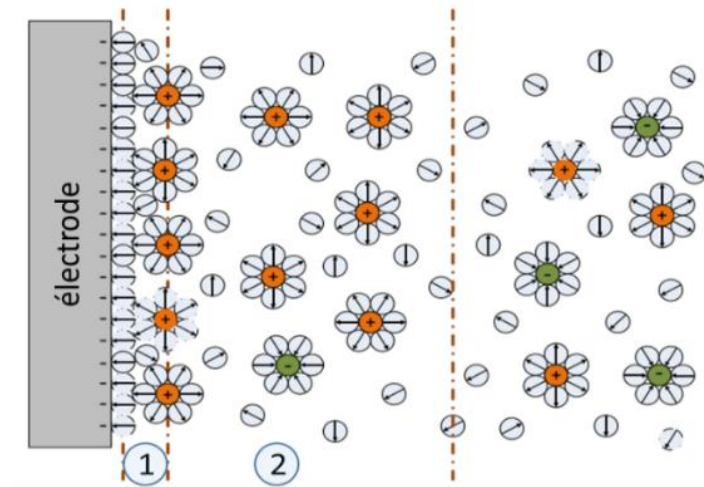


Figure I-3 : Illustration de la double couche présente à l'interface électrode/électrolyte

Cette double couche est équivalente à un condensateur électrique qui se charge et se décharge lors de l'application de la perturbation sinusoïdale générant un courant capacitif dépendant de la fréquence de perturbation. L'impédance d'un condensateur de capacité C est donnée par :

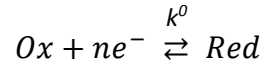
$$Z_C(\omega) = -\frac{1}{j\omega C} \quad \text{avec} \quad C = \varepsilon \varepsilon_0 \frac{A}{e}$$

où C représente la capacité, ε la permittivité relative diélectrique, ε_0 la permittivité diélectrique du vide, A l'aire de l'électrode et e l'épaisseur du diélectrique.

La capacité C_{dc} représente les capacités qui découlent chacune des deux couches, et dépend donc de la permittivité et de l'épaisseur de chacune des couches. La première couche possède la permittivité de l'eau avec une épaisseur estimée à environ 5 Å, alors que la seconde peut avoir une permittivité et une épaisseur variable, en fonction des espèces présentes en solution. L'épaisseur de cette couche peut fortement varier en fonction de la concentration des ions en solution, soit de quelques Å à plus de 300 Å pour des concentrations très faibles, alors que la diminution de permittivité avec l'augmentation de la concentration reste plus modeste en général, et reste comprise entre 60 et 78 pour l'eau pure.

2.3.3. Processus Faradique

Il peut aussi se produire des processus faradiques, c'est-à-dire des réactions d'oxydation ou de réduction d'espèces à la surface de l'électrode. Ces réactions se produisent entre les électrodes et les ions ou espèces présents dans les liquides électrolytiques, lors de la polarisation, et peuvent être traduites par l'équation suivante :



Un système électrochimique est caractérisé par une constante standard de transfert d'électrons k^0 (cm.s⁻¹) et par un coefficient de transfert de charges, α , en général égal à 0,5. En faisant l'hypothèse que le transfert de charge suit la relation de Butler-Volmer l'impédance mesurée est donc :

$$Z_{R_{tc}}(\omega) = R_{tc} \quad \text{Avec} \quad R_{tc} = \frac{RT}{nF} \frac{1}{I_0} \quad \text{quand le système est à l'équilibre, et}$$

$$R_{tc} = \frac{RT}{n^2 F^2 A k^0} \frac{1}{(1 - \alpha) \overline{c_{red}} \exp(1 - \alpha) \lambda_0 + \alpha \overline{c_{ox}} \exp(-\alpha \lambda_0)}$$

$$\text{dans un cas plus général, avec } \lambda_0 = \frac{nF}{RT} (E_0 - E^0)$$

avec R constante des gaz parfaits, T température (K), n nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction, F constante de Faraday, I_0 constante d'échange à l'équilibre, α coefficient de transfert, A aire de la surface sur laquelle se produisent les réactions, $\overline{c_{ox}}$ et $\overline{c_{red}}$ les concentrations à l'état stationnaire des espèces oxydées et réduites, E^0 potentiel standard du système étudié et E_0 potentiel constant imposé.

2.3.4. Diffusion des espèces à l'électrode

Lorsque le système électrochimique est contrôlé par le transport des matières vers l'électrode, il faut prendre en compte la diffusion de ces espèces. L'impédance correspondante est connue sous le nom d'impédance de Warburg. Si la couche de diffusion est considérée comme semi-infinie (régime non stationnaire), l'impédance de Warburg prend la forme suivante¹⁷ :

$$Z_W(\omega) = \frac{\sigma(1-j)}{\sqrt{\omega}} \quad \text{avec,}$$

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A \sqrt{2}} \left[\frac{1}{C_{red} \sqrt{D_{red}}} + \frac{1}{C_{ox} \sqrt{D_{ox}}} \right]$$

Ici, C_{red} et C_{ox} représentent les concentrations en solution des espèces appartenant au couple redox et D_{red} et D_{ox} sont leur coefficient de diffusion respectif.

En revanche, en régime de diffusion stationnaire, la couche de diffusion à une épaisseur finie suivant le modèle de Nernst, et l'impédance est donnée par l'équation suivante :

$$Z_W(\omega) = R_d \frac{\tanh\left(\sqrt{j\omega} \frac{\delta_n^2}{D}\right)}{\sqrt{j\omega} \frac{\delta_n^2}{D}}$$

Dans cette équation, R_d est une résistance de diffusion et δ_n l'épaisseur de la couche de diffusion selon le modèle de Nernst.

Ces phénomènes sont généralement mis en évidence dans le domaine des basses fréquences alors qu'aux hautes fréquences, le transfert d'électrons domine.

2.4. Exploitation des résultats : schémas électriques équivalents

Les différents processus se déroulant à l'interface électrode/électrolyte peuvent être modélisés par un circuit électrique équivalent. Chacun des composants du circuit, en série ou en parallèle, représente un phénomène physique particulier. Ces modèles sont ensuite utilisés pour ajuster les diagrammes expérimentaux afin d'extraire les paramètres nécessaires à la compréhension du système étudié¹⁴.

Certains éléments sont des composants électriques classiques, comme la résistance R , la capacité C ou l'inductance L .

Plusieurs modèles de circuits équivalents sont fréquemment rencontrés et permettent de se rendre compte des différents phénomènes se produisant à l'interface. Les principaux modèles utilisés sont les suivants :

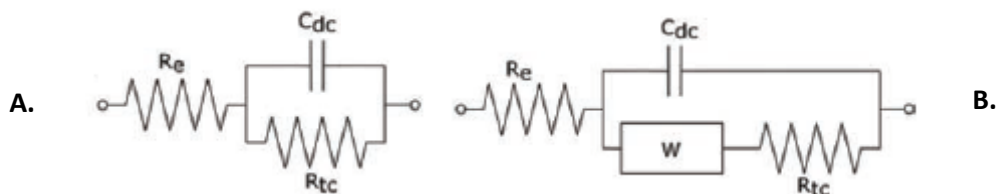


Figure I-4 : Schéma élémentaire, modèle de Randles, A. Sans diffusion, B. Avec diffusion

Si le système électrochimique n'est pas contrôlé par la diffusion des espèces à l'électrode, le schéma utilisé est celui présenté sur la Figure I-4-A. Ce circuit se compose d'une résistance d'électrolyte R_e en série avec deux éléments en parallèle : une capacité interfaciale C_{dc} et d'une résistance R_{tc} traduisant le transfert de charge. Lorsque la diffusion intervient, il faut ajouter en série avec la résistance de transfert de charge, une impédance de Warburg W , comme indiqué sur la Figure I-4-B. Le choix du type d'impédance de Warburg se fait en fonction des conditions expérimentales (cf 2.3.4).

Cependant l'interprétation des spectres SIE reste souvent délicate :

- tous les systèmes réels possèdent une extension dans l'espace et leurs propriétés peuvent aussi être distribuées dans l'espace. Dans ces conditions, un circuit équivalent constitué d'un nombre fini d'éléments idéaux (R , L , C) peut-être inadapté pour modéliser la réponse du système étudié.
- un circuit équivalent comprenant au moins trois éléments peut être réarrangé de multiples façons avec des valeurs différentes pour les éléments et toujours posséder la même impédance. En d'autres termes, une impédance peut être interprétée de multiples façons. Néanmoins, la connaissance de l'état physicochimique du système électrode/solution permet souvent de les différencier.

2.5. Représentation en SIE

Le but d'une mesure d'impédance est d'obtenir des informations sur le système électrochimique étudié. Un diagramme d'impédance peut donc être analysé quantitativement dans son ensemble, seulement partiellement, ou seulement qualitativement. Dans le domaine du traitement du signal, les données sont souvent représentées sous la forme de deux courbes (d'amplitude et de phase), dites diagrammes de Bode.

Il existe une autre représentation dans le plan complexe: $Z_i = f(Z_r)$, appelée spectre d'impédance, mais aussi diagramme de Nyquist, qui permet souvent une identification visuelle aisée des éléments électriques équivalents à la cellule mesurée. Il permet en effet de visualiser sur un seul graphique, le module et la phase de la réponse, mais aussi de visualiser les parties réelles et imaginaires de l'impédance.

2.5.1. Diagramme de Bode

Le diagramme de Bode est utilisé pour représenter la réponse harmonique d'un système dynamique $G(s)$. Il met en relation le rapport d'amplitude $R_A = |G(j\omega)|$ et le déphasage $\phi = \text{Arg}(G(j\omega))$ avec la pulsation ω de l'excitation sinusoïdale.

Le système est décrit par :

$$G(s) = \frac{\gamma}{\tau s + 1}$$

Avec γ représentant le gain statique dont les unités sont fonctions des grandeurs physiques d'entrée et de sortie du système, τ le temps de réponse du système (secondes), et s la variable symbolique du domaine de Laplace.

Il comporte deux parties, le diagramme d'amplitude et le diagramme de phase (Figure I-5). Il est constitué de deux figures en échelle semi-logarithmique représentant le gain en dB (ou module) et la phase de la fonction de transfert, en fonction de la fréquence. C'est un moyen de représenter le comportement fréquentiel d'un système. Il permet une résolution graphique simplifiée, en particulier pour l'étude des fonctions de transfert de systèmes analogiques.

Dans ces deux diagrammes, les asymptotes correspondent à certains domaines fréquentiels. La connaissance de ces asymptotes est en général suffisante pour extraire l'information principale contenue dans le diagramme de Bode.

2.5.1.1. Diagramme d'amplitude

Il représente le logarithme du module $20\log_{10}(R_A)$ [dB] en fonction du logarithme de la pulsation ω .

$$R_A = \left| \frac{\gamma}{\tau j\omega + 1} \right| = \left| \frac{\gamma (1 - \tau j\omega)}{\tau^2 \omega^2 + 1} \right| = \frac{\gamma}{\sqrt{\tau^2 \omega^2 + 1}}$$

$$20\log_{10}(R_A) = 20\log_{10}(\gamma) - 10\log_{10}(1 + \tau^2 \omega^2)$$

Le calcul des asymptotes peut être effectué (Figure I-5) :

- Lorsque $\tau\omega \ll 1$, alors $\log_{10}(R_A) \rightarrow \log_{10}(\gamma)$. Asymptote horizontale passant par γ à basse fréquence.
- Lorsque $\tau\omega \gg 1$, alors $R_A \rightarrow \frac{\gamma}{\tau\omega}$. Asymptote haute fréquence de pente -20 [dB/décade] passant par γ .

L'abscisse du point d'intersection des deux asymptotes, indiquée ici par w_b , correspond à la valeur absolue du pôle de $G(s)$.

$$w_b = \left| -\frac{1}{\tau} \right| = \frac{1}{\tau}$$

2.5.1.2. Diagramme de phase

Il représente lui le déphasage ϕ en fonction du logarithme de ω .

$$\phi = \text{Arg} \left(\frac{\gamma}{\tau j\omega + 1} \right) = \text{Arg} \left(\frac{\gamma (1 - \tau j\omega)}{\tau^2 \omega^2 + 1} \right) = -\arctan(\tau\omega)$$

Le calcul des asymptotes peut être effectué :

- Si $\omega \rightarrow 0$ alors $\phi \rightarrow 0$ (asymptote horizontale).
- Si $\omega \rightarrow \infty$ alors $\phi \rightarrow -\pi/2$ (asymptote horizontale).

La figure I-5 permet aussi de visualiser la bande passante du système. Il s'agit de l'intervalle de fréquence $[0, w_b]$ pour lequel le rapport d'amplitude est supérieur ou égal à $\frac{\gamma}{\sqrt{2}}$ et le déphasage à $-\frac{\pi}{4}$.

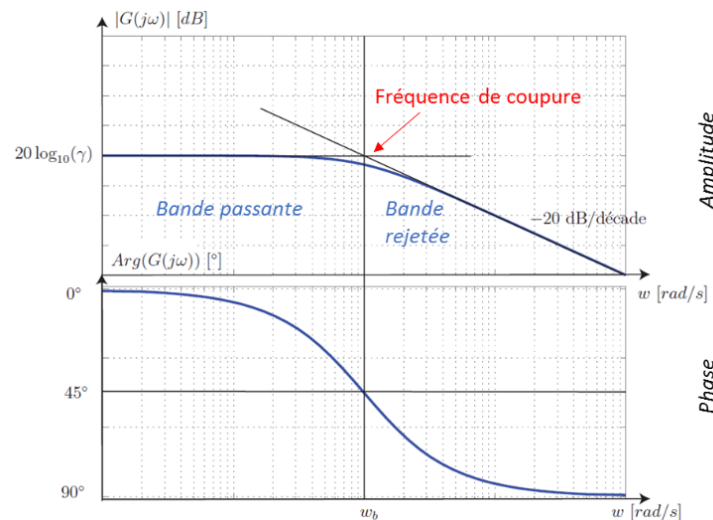


Figure I-5 : Illustration d'un diagramme de Bode d'un système du premier ordre

2.5.2. Diagramme de Nyquist

L'ensemble des valeurs de $G(j\omega)$ $\omega \geq 0$, forme dans le plan complexe un arc de cercle sur lequel sont indiquées les valeurs de ω , arc dénommé diagramme de Nyquist. Cette représentation de $G(j\omega)$ est souvent adoptée pour répondre à des questions d'essence théorique. Les résultats sont représentés comme un ensemble de points où chacun d'eux correspond à une fréquence de mesure (Figure I-6).

Le modèle est décrit par :

$$G(s) = \frac{\gamma}{\tau s + 1}, \rightarrow G(j\omega) = \frac{\gamma}{\tau j\omega + 1}$$

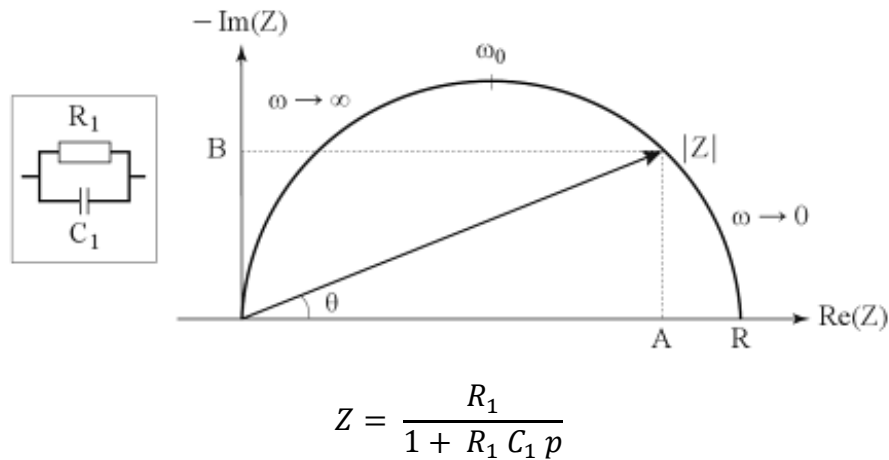


Figure I-6 : Illustration d'un diagramme de Nyquist d'un circuit R/C en parallèle

Les valeurs remarquables obtenues à partir de ce diagramme sont :

- l'intersection du cercle avec l'axe des réels, donnant la résistance totale du système :

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} \{Re[Z(\omega)]\} = 0 \quad \text{et} \quad \lim_{\omega \rightarrow 0} \{Re[Z(\omega)]\} = R$$

- le module $|Z|$ de l'impédance complexe :

$$|Z| = \sqrt{A^2 + B^2}$$

Avec A (partie réelle de l'impédance) = $|Z| \cos \theta$

B (partie imaginaire de l'impédance) = $|Z| \sin \theta$

- l'argument du complexe :

$$\theta = \arctan \frac{B}{A}$$

- la fréquence de relaxation :

$$f_0 = \frac{1}{2\pi RC} = \frac{\omega_0}{2\pi}$$

Le diagramme de Nyquist permet d'obtenir une représentation graphique du comportement fréquentiel d'un système sur un graphe unique, et permet de recueillir des informations sur sa stabilité de manière rapide. La forme de la courbe reste un critère important dans l'interprétation des données. C'est pourquoi, il est très important de formater les axes réel et imaginaire à la même échelle, afin de ne pas influencer la forme du diagramme.

3. Applications de l'impédance à l'analyse des cellules

Les propriétés électriques des cellules donnent des informations pouvant contribuer à la compréhension de l'état physiologique complexe de la cellule. En effet, des anomalies cellulaires ou des infections bactériennes peuvent par exemple être à l'origine de la modification de l'activité de certains canaux ioniques, de la conductivité ou de la résistance du cytoplasme voire de son facteur de déformabilité (variation de la résistance membranaire)¹⁸. Lorsqu'une cellule adhère, se développe ou meurt à la surface d'une électrode, les caractéristiques électriques de la couche cellulaire changent conduisant à une modification de l'impédance^{19,20}. Ainsi, la mesure des propriétés électriques des cellules ont d'ores et déjà été mises à profit au travers de la mesure d'impédance pour le comptage, la séparation, le piégeage et la caractérisation de cellules ainsi que pour le développement de dispositifs pour le diagnostic. On parle alors de spectroscopie cellulaire diélectrique, l'analyse impédimétrique de cellules pouvant être réalisée de manière individuelle ou collective.

Comme l'illustre le schéma ci-dessous un grand nombre d'applications basées sur ce principe ont vu le jour.

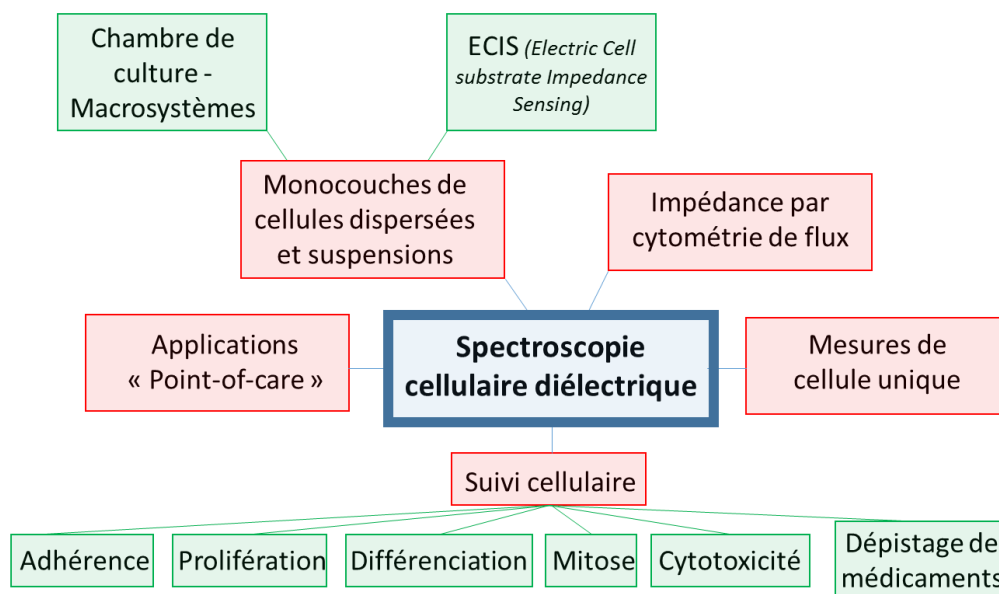


Figure I-7 : Organigramme autour de la spectroscopie cellulaire diélectrique

3.1. Analyses collectives

Giaever et Keese ont été les premiers à démontrer les variations de l'impédance électrochimique lorsqu'une population de cellules se déplace à la surface d'une électrode^{21,22} ou subit des modifications morphologiques²³. Lorsque des cellules sont déposées à la surface d'électrode, leur caractère isolant engendre une forte augmentation de l'impédance

proportionnellement au nombre de cellules couvrant l'électrode. Lorsque les cellules changent de morphologie ou se détachent de l'électrode, l'impédance chute. L'optimisation de la sensibilité de l'unité de détection représente donc une étape très importante dans la conception de capteurs électrochimiques (impact majeur de la conception de l'électrode sur la réponse électrique du biocapteur). De plus, suivant la fréquence du signal, différentes caractéristiques de la cellule peuvent être ciblées. Ainsi comme l'illustre la Figure I-8, aux fréquences relativement faibles (< 2000 Hz), le courant circule majoritairement sous, et entre les cellules adjacentes (lignes rouges) alors qu'aux fréquences plus élevées ($> 40\,000$ Hz), le courant traverse les membranes cellulaires isolantes (lignes vertes).

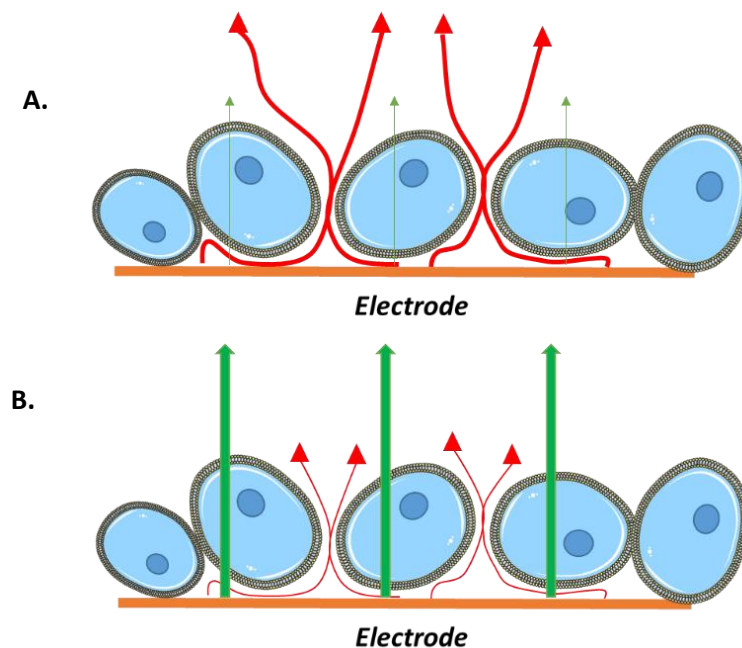


Figure I-8 : Influence de la fréquence en SIE, A- Faibles fréquences, B- Hautes fréquences

Les mesures d'impédance à hautes fréquences sont donc plus impactées par le recouvrement cellulaire de surface active, tandis que les réponses impédimétriques à basses fréquences sont plus influencées par des changements d'espaces entre ou sous les cellules. L'influence de la fréquence sur les valeurs de résistance et de capacité, avec ou sans cellules, est représentée par les graphiques suivants présentés Figure I-9.

Il est important de noter que la constante diélectrique de l'eau est elle aussi dépendante de la fréquence.

En utilisant de multiples fréquences, les données d'impédance recueillies par SIE peuvent renseigner sur des changements mesurés en temps réel sur :

- la perméabilité de la couche cellulaire,
- la capacité de la membrane cellulaire,

démontrant ainsi la capacité du courant à circuler dans les cellules.

Ces analyses collectives présentent donc l'avantage de proposer des études en temps réel et sans marquage.

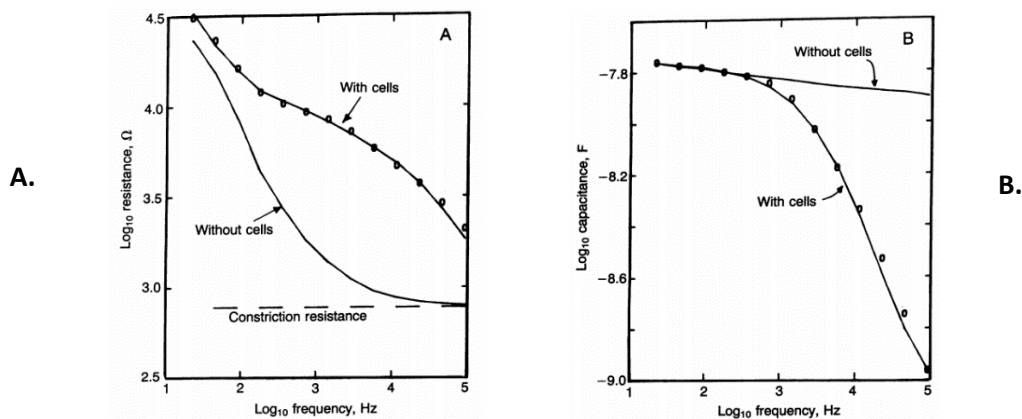


Figure I-9 : Influence de la fréquence sur les valeurs (A) de résistance et (B) de capacitance, mesures en présence/absence de cellules²²

3.1.1. Différenciation cellulaire

La spectroscopie d'impédance électrochimique a souvent été mise en œuvre pour la caractérisation de la différenciation cellulaire. La différenciation cellulaire est un concept de biologie du développement décrivant le processus par lequel les cellules se spécialisent en un « type » cellulaire. La morphologie d'une cellule peut changer radicalement durant la différenciation, mais le matériel génétique reste le même, à quelques exceptions près. Bagnaninchi et Drummond²⁴ ont par exemple caractérisé la différenciation de cellules souches du tissu adipeux en adipocytes et ostéoblastes. Quatre jours après l'induction, les cellules se distinguent suivant leurs valeurs de capacitance membranaires comme l'illustre les variations de l'impédance mesurées à une fréquence caractéristique en fonction du temps (Figure I-10).

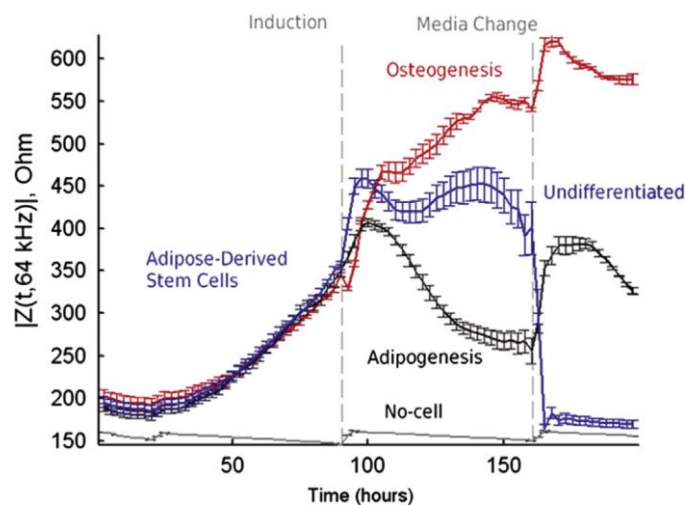


Figure I-10 : Différenciation par impédance à 64 kHz de cellules dérivant d'ostéogénèse, d'adipogénèse ainsi que des cellules indifférenciées²⁴

Les mesures d'impédance peuvent également faciliter l'observation des effets des facteurs environnementaux sur la différenciation cellulaire. Les travaux de Angstmann et al.²⁵ ont démontré des profils d'impédance différents lorsque des substrats ECM (matrice extracellulaire) sont mélangés à du collagène, de la fibronectine, ou de la laminine. Cho et al.²⁶ ont utilisé des mesures d'impédance pour tester les effets de chlorpyrifos (pesticides) sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines en adipocytes. D'autres observations impédimétriques ont été réalisées sur la différenciation ostéogénique et adipogénique de cellules souches humaines mésenchymateuses (Hildebrandt et al.²⁷), la différenciation neuronale de ces mêmes cellules (Park et al.²⁸), ou encore sur la transition épithélio-mésenchymateuses (Schneider et al.²⁹).

De plus, depuis que les mesures d'impédance peuvent s'effectuer en temps réel, les différentes phases de la mitose et du cycle cellulaire peuvent être suivies. Ghenim et al.³⁰ a observé sur des cellules de carcinome épithélioïde de col de l'utérus humain (HeLa) que l'impédance augmente au cours de la prophase (division cellulaire), de la métaphase, et diminue au cours de l'anaphase. Wang et al.³¹ ont quant à eux montré que pendant le cycle cellulaire des cellules HeLa, l'impédance augmente au cours des phases G1 et S mais diminue au cours des phases G2 et M. Ces résultats montrent que les phases du cycle cellulaire peuvent être discriminées par l'intermédiaire de la mesure des variations d'impédance de la cellule, ce qui peut fournir un outil utile pour les études concernant le cycle cellulaire et l'impact de substances actives.

La SIE a également été utilisée afin de caractériser les changements affectant une cellule lors du développement intracellulaire d'un parasite. Ainsi, des travaux antérieurs de l'équipe Redstress ont permis de mettre en évidence des changements d'impédance importants liés à la production d'espèces redox ou à la perméabilisation membranaire dans le cas de globules rouges parasités par *Plasmodium falciparum* (agent du paludisme) ou de macrophages parasités par *Leishmania amazonensis*³². De la même manière, l'équipe de V. Senez a développé un système permettant le suivi *in vitro* par spectroscopie d'impédance en temps réel de l'infection de cellules cancéreuses HCT-8 par un protozoaire parasite *Cryptosporidium parvum*³³. Ces études ont permis de corréliser le cycle de développement intracellulaire du parasite aux variations d'impédance mais également de quantifier l'infectivité d'un inoculum c'est-à-dire le taux de parasites potentiellement infectants³⁴.

3.1.2. Mesure d'adhérence

Lorsque les cellules adhèrent et se propagent à la surface d'une électrode, elles conduisent à une augmentation de l'impédance électrique. L'instrument xCELLigence, fabriqué par Roche, utilise cette technique pour mesurer les changements d'impédance électrique lorsque des cellules adhèrent et se répandent dans une boîte de culture dont le fond des puits est recouvert à 80 % environ par une matrice de microélectrodes d'or. L'impédance est affichée en tant que paramètre appelé indice de cellule (sans dimension), et

est directement proportionnelle à la surface totale de culture. Le dosage de l'invasion est basé sur des changements d'impédance électrique au niveau de l'électrode / cellule en interphase. Ainsi, la cellule-index peut être utilisée pour contrôler l'adhérence des cellules, leur étalement, leur morphologie ou leur densité.

Ce type de mesures trouve des applications en oncologie. En effet, une fois dans le système circulatoire, les cellules cancéreuses adhèrent aux parois capillaires et traversent les tissus environnants pour former des tumeurs métastatiques. Les différentes composantes de l'interaction cellulaire des cellules endothéliales tumorales peuvent être reproduites *in vitro* en utilisant une monocouche de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) et des cellules cancéreuses. La technique SIE permet alors le suivi et la quantification en temps réel des interactions des cellules endothéliales avec les cellules tumorales. En effet, la perturbation des jonctions endothéliales, la rétraction de la monocouche endothéliale et le remplacement par des cellules tumorales conduisent à de grandes variations d'impédance. Ces modifications sont en corrélation directe avec la capacité invasive des cellules tumorales. Cette technique possède un double avantage par rapport aux méthodes existantes de mesure d'invasion, telles que la chambre de Boyden (système formé de deux compartiments séparés par une membrane poreuse à travers laquelle les cellules peuvent migrer) ou les analyses matrigel (mélange de protéines gélatineuses utilisé pour la culture cellulaire) :

- l'interaction cellulaire des cellules tumorales et endothéliales imite au plus près le procédé *in vivo*,
- les données sont obtenues en temps réel et le phénomène est plus facilement quantifiable.

3.1.3. Cytotoxicité et criblage de substances bioactives

La spectroscopie d'impédance électrochimique peut aussi être utilisée pour mettre en évidence la cytotoxicité d'une substance bioactive. Dans ce cas, les cellules mortes s'exposent non seulement au détachement (changements dans l'adhérence au substrat) et à la diffusion, mais réduisent également leur affinité vis-à-vis des autres cellules, ce qui se traduit par une modification de l'impédance électrochimique. Les tests de cytotoxicité classiques consistent à faire varier la concentration de substances toxiques pour les cellules et à enregistrer les variations d'impédance provoquées. Dans ces configurations, la cellule est utilisée en tant que biocapteur pour des mesures rapides et en temps réel, pouvant remplacer les tests de cytotoxicité traditionnels, lents et invasifs.

Comme l'illustre le tableau ci-dessous, la SIE a été mise en œuvre pour de nombreux types cellulaires dans des domaines d'applications très variés :

Type cellulaire	Agent toxique	Référence
cellules épithéliales de la veine ombilicale humaine	cytochalasine B	35
fibroblastes gingivaux humains	monomères / co-monomères de résines composites dentaires	36
cellules humaines d'hépatocarcinome (BEL7404)	gemcitabine et chlorure de mercure	37
fibroblastes de souris immortalisées (BALB3T3)	arsénite de sodium	38
cellules cardiaques	ions de métaux lourds	39
cellules du cancer de l'œsophage humain (Kyse 30)	cisplatine	40
cellules du glioblastome humain (U87MG)	chlorotoxine	41
cellules humaines oesophagiennes squameuses épithéliales cancéreuses	acide rétinoïque	42
Cellules tumorales humaines (MCF-7)	doxorubicine	43

Tableau I-1 : Utilisation de la SIE pour l'étude de la toxicité de molécules actives vis à vis de différents types cellulaires

Par ailleurs, les mesures d'impédance ont été utilisées pour évaluer, sur cellules rénales, l'effet de substances actives néphrotoxiques⁴⁴, mais aussi pour évaluer la résistance à l'ampicilline des bactéries⁴⁵.

Les données de ces études montrent des différences significatives des valeurs d'impédance cellulaire suivant les concentrations de l'agent toxique. Pour quantifier cette cytotoxicité à partir des données d'impédance, des calculs par ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) d'IC₅₀ (demi-concentration inhibitrice maximale, représentative de la concentration en médicament nécessaire pour une inhibition de 50% *in vitro*) et de CE₅₀ (utilisés pour les médicaments agonistes, représentant la concentration plasmatique nécessaire pour obtenir 50% d'effet maximum *in vivo*) peuvent être effectués. De plus, des études de cytotoxicité unicellulaire ont également été réalisées par ECIS⁴⁶. Il est important de mentionner que ce type de mesures peut également être utilisé pour étudier l'effet de substances sur la perméabilité de couches cellulaires. Ce type de mesure trouve en effet des applications dans le domaine pharmaceutique pour étudier l'influence de médicaments sur la perméabilité de la barrière gastro-intestinale⁴⁷.

Outre les caractérisations collectives des cellules et de leurs propriétés (différenciation, adhérence, cytotoxicité), les mesures impédimétriques peuvent aussi être

utilisées pour des analyses individuelles de cellule, et se présentent comme une méthode alternative efficace par rapport aux techniques classiques, telles que la cytométrie de flux.

3.2. Analyse individuelle

3.2.1. Comptage individuel type Coulter

La cytométrie de flux consiste à analyser en milieu liquide les signaux optiques ou physiques émis par une cellule traversant un faisceau lumineux afin de les caractériser individuellement, de manière quantitative et qualitative. Elle a été développée en 1934 pour le comptage des constituants cellulaires du sang, puis, associée à des méthodes électrostatiques et d'immunofluorescence. En plus de l'analyse des cellules, la cytométrie de flux permet aussi d'effectuer du tri cellulaire, ses principales applications restant le diagnostic de maladies. La détection repose alors soit sur la mesure du contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule à caractère pathologique, soit sur l'identification des sous-populations cellulaires impliquées dans l'immunité par immunophénotypage.

Cette méthode analytique basée sur la détection laser, est utilisée pour des analyses multiparamétriques comme la détection et le comptage de cellules, protéines ou biomarqueurs. En plus de leur polyvalence et de leur capacité de détection, les analyses à haut débit de cellules uniques peuvent être appliquées à des études de recherche de base, des pratiques cliniques et des essais. Cependant, les cytomètres actuels, basés sur de la mesure optique, sont coûteux et encombrants ; de plus, ils nécessitent une expertise spécialisée et sont inappropriés aux applications au chevet du patient ou « point-of-care » (POC, test effectué et interprété à l'endroit et au moment où il a été réalisé, en vue d'une décision clinique). Il existe d'autres méthodes d'analyses alternatives.

Les compteurs Coulter sont apparus dans les années 50. La technologie a été développée principalement pour compter rapidement les globules en mesurant les variations de conductivité électrique liées à la présence des cellules en suspension dans un fluide conducteur⁴⁸. Malgré sa capacité limitée pour le comptage et le dimensionnement, la simplicité et le bas coût de la méthode de détection électrique rendent ces compteurs particulièrement adaptés à la réalisation de dispositifs portables. Actuellement, plus de 98% des compteurs de cellules automatisés incorporent cette technologie, désignée comme le Principe Coulter. Celui-ci repose sur la mesure d'impédance entre deux électrodes dans un petit orifice pouvant être traversé par la cellule. Étant donné que la membrane cellulaire joue le rôle de couche isolante, la présence de la cellule modifie la résistance de l'orifice par remplacement du liquide conducteur.

Ces compteurs ont également bénéficié des avancées du domaine de la microfluidique. Dans ce cas, le principe de fonctionnement se base sur un compromis technique entre la taille des microcanaux, le haut débit et la sensibilité : un canal de grande taille sera préféré pour un dispositif à haut débit, tandis qu'un canal de petite taille pourra fournir une meilleure

sensibilité. De plus, un problème de diaphonie inter-canaux est souvent repéré. C'est pourquoi, au risque de limiter la sensibilité, le partage des électrodes de polarisation est effectué dans le même canal (une entrée et une sortie). Jagtiani *et al.* ont réussi à limiter cette diaphonie en appliquant des fréquences multiples pour chaque canal⁴⁹.

En raison de la complexification des designs des circuits conduisant à une bande passante limitée, Kim *et al.* ont exploré un cytomètre multicanal pour l'analyse à haut débit, mais leur conception du canal horizontal a limité l'évolutivité du principe vers une plus grande densité cellulaire⁵⁰. De même, Damhorst *et al.* ont mis au point un compteur Coulter submicrométrique pour comptabiliser des nanoparticules dans un tampon, dont plusieurs espèces de virus (détermination des caractéristiques structurelles et identification de nouveau virus)⁵¹. Cette technologie complète les travaux antérieurs sur la cytométrie de flux pour le dénombrement des lymphocytes T CD4⁺⁵². Le comptage direct des particules a été étendu à la détection d'exosomes humains (vésicules extracellulaires) ce type de comptage ayant plusieurs applications potentielles dans le diagnostic de maladie⁵³.

Cependant, l'une des difficultés des compteurs Coulter microfluidiques, réside dans le choix du matériau de l'électrode. Les électrodes Ag/AgCl non polarisables, qui fonctionnent bien dans un compteur Coulter conventionnel, sont un choix idéal. Néanmoins, les électrodes Ag/AgCl ont une durée de vie limitée et leur intégration dans des canaux microfluidiques reste complexe. Bien que d'autres électrodes métalliques puissent être plus facilement intégrées dans des canaux microfluidiques, les doubles couches électriques formées à l'interface électrode/liquide, principalement capacitives, posent des difficultés dans l'application de signaux. La modification de la rugosité de surface de l'électrode (afin d'augmenter l'aire de surface) peut être une solution pour réduire au minimum l'effet de double couche électrique.

Plus récemment, un micro-cytomètre basé sur des mesures d'impédance, intégrant des PGE (*polyelectrolyte gel electrodes*) a été utilisé pour la détection de cellules tumorales circulantes (CTC). L'écoulement dans la gaine a été optimisé pour se focaliser sur les cellules et empêcher leur adhérence dans les chambres de piégeage sur les parois des canaux (Figure I-11).

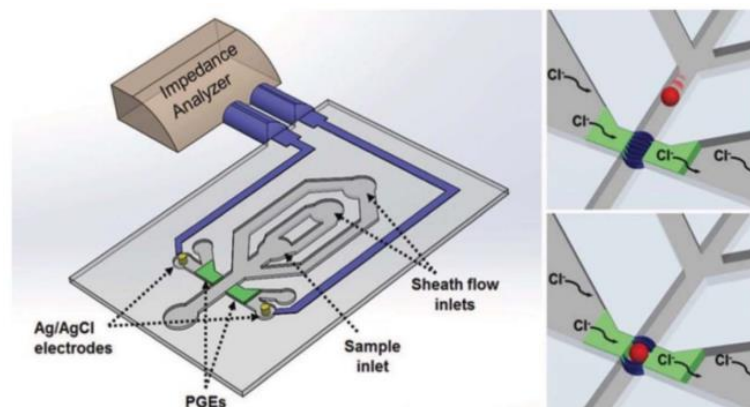


Figure I-11 : Illustration d'un compteur cellulaire basé sur un système PGE, les cellules provoquant un changement d'impédance au voisinage des PGE ⁵⁴

Les CTC ont ainsi été détectées avec succès dans des échantillons de sang provenant de 105 patientes atteintes du cancer du sein⁵⁴. En raison de la configuration des électrodes et de la géométrie des canaux, le modèle utilisé dans les compteurs Coulter classiques pour le calcul des volumes de particules, n'est pas directement applicable aux compteurs Coulter microfluidiques⁵⁵. Un compteur Coulter microfluidique est donc limité au comptage et au dimensionnement des cellules individuelles sans pouvoir caractériser leurs propriétés électriques.

Enfin, les compteurs Coulter peuvent être également potentiométriques. En Effet, Chen *et al.*⁵⁶, ont réalisé un compteur Coulter à haut débit avec de nombreux canaux verticaux microfluidiques (réseau de haute densité) et une configuration à trois électrodes permettant des mesures potentiométriques.

3.2.2. Analyse de la cellule unique

L'évaluation du métabolisme, de la mobilité, de la croissance et de la prolifération cellulaire est généralement basée sur l'étude de populations de cellules. Les propriétés biophysiques et biochimiques de la cellule sont alors une moyenne estimée à partir de l'ensemble des cellules sans tenir compte de l'hétérogénéité cellulaire notamment au niveau de l'expression de gènes spécifiques. Les analyses de cellules uniques sont par conséquent essentielles à la compréhension de certaines questions fondamentales, telles que la différenciation biologique, biochimique et fonctionnelle des cellules. C'est aussi un élément clé pour le diagnostic précoce du cancer⁵⁷.

En biologie cellulaire, l'analyse unicellulaire se réfère à l'étude de cellules individuelles isolées à partir de tissus d'organismes multicellulaires. Une fois la cellule isolée il est alors possible d'étudier sa migration, sa division ou sa différenciation en présence par exemple de molécules bioactives. L'étude de la division cellulaire est notamment intéressante dans le domaine du cancer en raison du taux de prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses par rapport à une cellule normale. Les modèles génétiques et l'expression de protéines peuvent expliquer le comportement cellulaire dans une large mesure, mais l'étude dynamique des cellules vivantes peut augmenter la compréhension des événements moléculaires d'interconnexion qui ont lieu en permanence dans la cellule. Chaque cellule est plus ou moins différente de l'autre, même dans un même type de cellule. L'hétérogénéité cellulaire est bien connue dans la bactérie et de plus en plus mise en évidence dans les cellules eucaryotes.

Pendant longtemps, il a été admis que les cultures de cellules étaient de nature homogène, et que l'analyse d'une collection de cellules pouvait donner une évaluation précise du comportement des cellules dans la culture ou un tissu. La réponse moyenne des cellules a été, et est encore souvent interprétée comme la réponse de toutes les cellules dans cet échantillon. En outre, l'effet du nombre de cellules sur le comportement de la cellule était, et est encore souvent négligé en raison de difficultés dans le suivi de ces phénomènes. L'analyse impédimétrique de cellules uniques⁵⁸ s'est donc récemment développée et constitue

aujourd'hui un outil essentiel pour comprendre les caractéristiques biologiques de la cellule. Elle présente un intérêt dans divers aspects de la médecine, comme par exemple la régénération des tissus nerveux endommagés, l'isolement d'une sous-population cellulaire présente dans un échantillon complexe, ou encore le criblage à haut débit de nouvelles substances bioactives. Elle est effectuée, comme dans le cas des analyses collectives, au travers de l'étude des variations d'impédances induites par des phénomènes tels qu'une modification d'adhérence, de l'activité de certains canaux ioniques ou de l'expression de protéines.

Pour cette raison un certain nombre de dispositifs microfluidiques tendant à piéger une cellule unique ont vu le jour. Jang *et al.* ont ainsi mis au point un dispositif microfluidique pour capter et mesurer l'impédance d'une seule cellule HeLa en utilisant des dispositifs hydrauliques de piégeage comportant des micro-piliers⁵⁹. Ces dispositifs ont permis de suivre en continu l'effet d'agents tensio-actifs et de toxines porogènes bactériennes sur ces cellules HeLa. De plus, pour réduire au minimum les fuites de courant, dues aux lignes de courant extérieures à la cellule, Cho *et al.* ont développé une gamme de micro-trous permettant de positionner les cellules au centre des lignes de courant. La figure ci-dessous illustre ce dispositif.

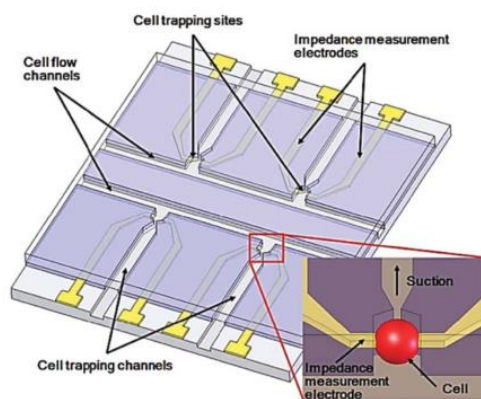


Figure I-12 : Représentation schématique du système : quatre sites de piégeage individuel permettant des mesures d'impédance sont disposés le long de deux canaux d'écoulement

De la même manière, Kang *et al.*⁶⁰ ont développé un dispositif microfluidique permettant la différenciation par SIE entre une cellule prostatique normale et une cellule prostatique cancéreuse, en parallèle des méthodes classiques comme la biopsie (méthode entraînant de nombreuses erreurs de diagnostic). Cette méthode par SIE a donc pour but d'améliorer le taux de détection du cancer de la prostate.

Ce système comprend une membrane déformable en PDMS (polydiméthylsiloxane), actionnée par l'application d'une pression pneumatique, afin de capturer une cellule unique à la surface des électrodes de détection. Au centre du canal, une structure en tunnel, de diamètre avoisinant le diamètre cellulaire (environ 30 μm) pour concentrer l'intégralité du champ électrique dans la cellule, est insérée afin d'effectuer le piégeage. L'importante surface

de contact entre la cellule piégée et l'électrode permet de mesurer, avec une haute sensibilité, les caractéristiques électriques de chaque cellule. La différenciation s'effectue suivant la variation de la réponse électrique à fréquence fixe (8,7 kHz) entre les cellules humaines normales de la prostate (RWPE-1) et les cellules cancéreuses (PC-3) (Figure I-13).

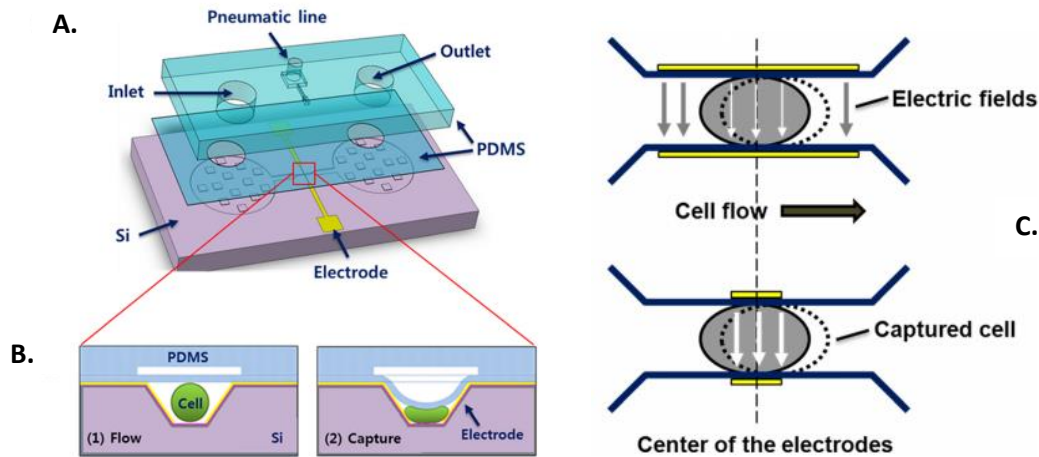


Figure I-13 : Schéma du dispositif, A-Composition des trois couches, B- vue en coupe du canal microfluidique, capable de piéger une cellule unique, C- Champs électriques

3.3. Microscopie par mesure d'impédance électrochimique

La SIE est donc un outil essentiel pour la détection sans aucun marquage de processus cellulaires comme l'étalement, l'adhésion, l'invasion, la toxicologie et la mobilité cellulaires. Toutefois, les données recueillies manquent souvent d'informations spatiales, essentielles à l'étude des processus hétérogènes et à l'imagerie des puces à haut débit.

Pour apporter des solutions à ce problème, Wang et al.⁶¹ ont utilisé un microscope d'impédance électrochimique (EIM, electrochemical impedance microscope) basé sur la résonance plasmonique de surface (SPR, Surface Plasmon Resonance). Dans ce cas, par opposition à la SIE conventionnelle qui mesure un courant, le microscope est basé sur l'analyse de plusieurs signaux. Un faisceau laser est dirigé sur une surface recouverte d'or sur laquelle sont cultivées la ou les cellules. Une différence de potentiel alternative est appliquée à l'électrode par rapport à une électrode de référence insérée dans le milieu de culture. L'image EIM est créée à partir des changements SPR induits par la polarisation électrique. En plus des images SPR et EIM, une image optique classique du même échantillon est également enregistrée.

L'EIM cible les conductivités et polarisabilités électriques locales, reflétant les changements locaux de structures cellulaires et de distributions ioniques (cette information n'étant pas accessible à partir de microscopes classiques). Ce microscope a par exemple permis de suivre l'apoptose ou l'électroporation de cellules individuelles avec une résolution submicrométrique d'une milliseconde. La résolution spatiale et temporelle permet d'étudier

les cellules individuellement, mais aussi de résoudre les structures et les processus subcellulaires avec une excellente sensibilité de détection (~ 2 pS). Les images cellulaires du microscope sont simulées suivant un modèle basé sur la constante diélectrique locale et la conductivité.

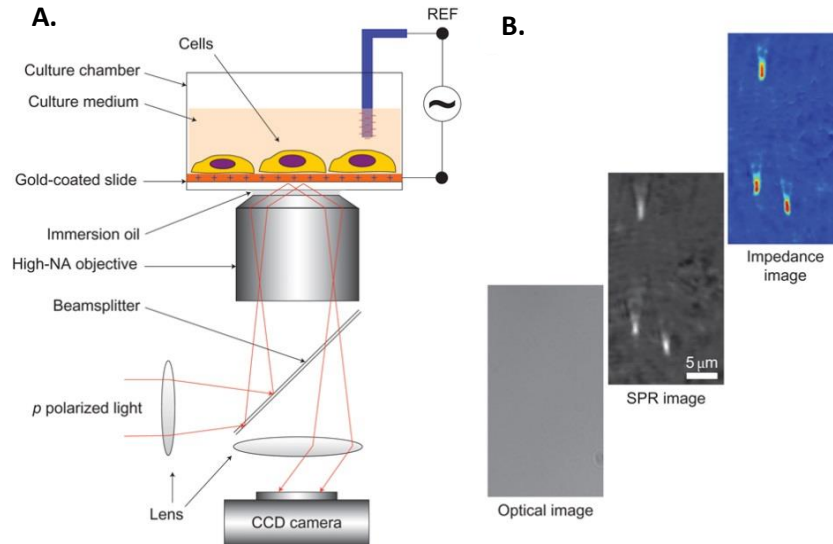


Figure I-14 : A-Schéma du principe de microscopie d'impédance électrochimique, B- Images optiques, par SPR et par EIM ⁶¹

Ce procédé a été testé sur des cellules du cancer du col utérin humain, issues d'une lignée cellulaire SiHa ayant subi une apoptose précoce (Figure I-15).

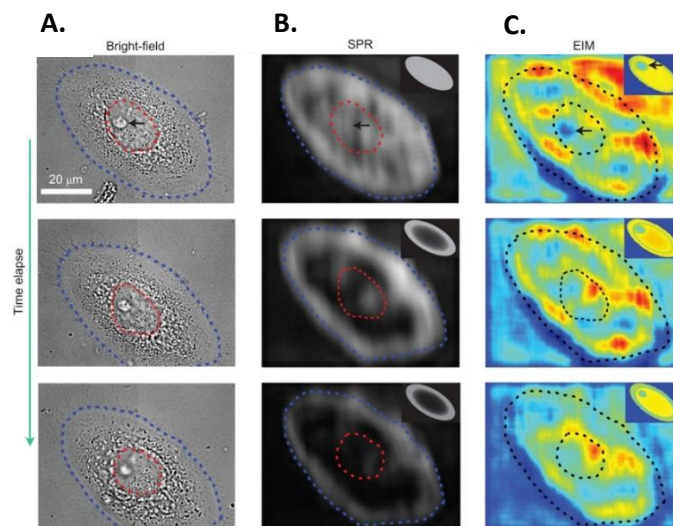


Figure I-15 : A- Image optique classique, B- Image SPR, C- Image EIM de cellules SiHa à t=0 / 30 / 75 min après apoptose ⁶¹

Comme le montre la Figure I-15-B, l'apoptose commence par une diminution de la luminosité d'image SPR près du centre de la cellule, ce qui reflète le détachement de la cellule de la surface de l'électrode à partir du centre. Ce processus de détachement n'est pas résolu par l'image optique classique (Figure I-15-A) mais les images EIM (Figure I-15-C) prises simultanément montrent des changements importants et en temps réel dans la cellule pendant l'apoptose (par exemple dans la région du nucléole, ces changements n'étaient auparavant visibles qu'après ajout d'une coloration fluorescente).

Le contraste par image EIM est inversement proportionnel à l'impédance (donc proportionnel à l'admittance). Cette méthode peut donc résoudre les problèmes liés aux cellules individuelles mais aussi aux composants subcellulaires comme par exemple le nucléole de la cellule (sous-structure du noyau composé de protéines et des acides nucléiques) qui apparaît sous la forme d'une tache sombre sur l'image (flèche noire).

3.4. Un dispositif impédimétrique commercial, le capteur multiparamétrique, Bionas 2500®

C'est un système d'analyse, développé en 2001 par l'entreprise Bionas GmbH (Rostock, Allemagne), sous forme de multi-capteurs pour l'analyse cellulaire. Cet outil permet de suivre trois paramètres : l'acidification péricellulaire par mesure du pH, la respiration cellulaire en suivant la consommation d'oxygène et l'adhésion ou la prolifération cellulaire par mesure d'impédance. Ce système permet par exemple de suivre le métabolisme cellulaire mais aussi de cribler des substances actives, bien que le débit d'analyse soit modeste. Deux systèmes sont à la base de ce développement :

- le système créé par Giaever et Keese⁶², maintenant produit par Applied Biophysics, Inc. (Troy, NY 12180, États-Unis, [http:// www.biophysics.com](http://www.biophysics.com)) avec pour nom commercial ECIS® (electric cell-substrate impedance sensing). Ce système, comme nous l'avons vu précédemment permet de suivre en temps réel par impédancemétrie des phénomènes tels que l'adhésion, la migration et la mobilité cellulaire ;
- le Cytosensor.®, un dispositif construit par Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) équipé d'un capteur potentiométrique, capable de détecter l'acidification péricellulaire, directement liée au métabolisme cellulaire⁶³ (sa production a été arrêtée en 2001).

Avec le développement de la microfluidique, les deux systèmes ont trouvé des applications similaires dans de nombreux domaines. Cependant, la limitation de ces dispositifs réside dans le fait qu'ils ne donnent accès qu'à un seul paramètre et de ce fait la recherche s'est orientée vers la conception de nouveaux capteurs multiparamétriques⁶⁴.

Le dispositif Bionas 2500® est composé d'une unité centrale, d'un système fluide avec auto-échantillonneur et d'une unité de commande (Figure I-16). L'unité centrale est constituée de six bio-modules comprenant chacun une puce de mesure. Le système contient en tout cinq capteurs dédiés à des mesures de pH (acides lactique et carbonique générés lors de l'élimination de produits finaux du métabolisme cellulaire), deux électrodes de Clark pour la consommation d'oxygène (variation de la concentration en fonction de l'activité respiratoire des cellules) et une électrode interdigitée pour les mesures d'impédance cellulaire. Enfin, une diode de température complète l'équipement du capteur.

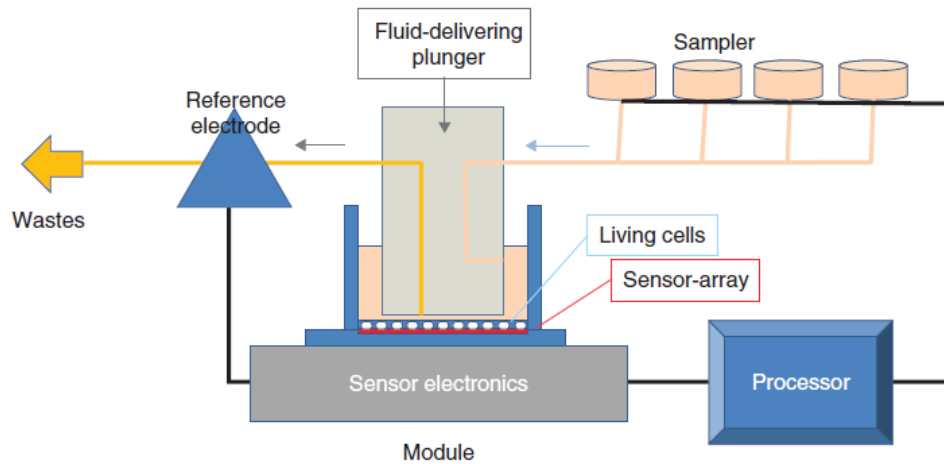


Figure I-16 : Représentation schématique du système d'analyse Bionas 2500®

Un incubateur spécial, intégré au système, permet de maintenir une température constante. Un système de perfusion fluide, entraîné par une pompe, assure le remplissage et le renouvellement (élimination des déchets) des puits du capteur où les cellules se développent. Un auto-échantillonneur assure la délivrance de quantités données de substances actives à tester.

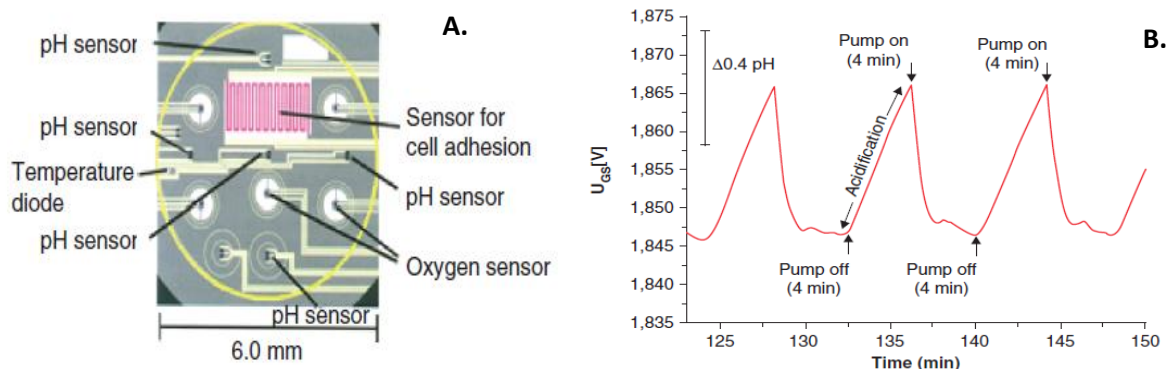


Figure I-17 : A- Localisation des capteurs sur la puce, B- Système des cycles « marche/arrêt »

Le dispositif fonctionne en cycles « marche-arrêt », le plus souvent d'une durée de 4 min pour chacune des phases, leur durée pouvant varier suivant le type cellulaire et l'application envisagée. Le débit appliqué est d'environ 55 $\mu\text{L}/\text{min}$. Comme l'illustre la Figure I-17, les mesures de pH et d'oxygène sont effectuées pendant la phase d'arrêt. Pendant la phase de marche, le surnageant est pompé et remplacé par un nouveau milieu. Il est important de noter que les mouvements des liquides peuvent entraîner des contraintes de cisaillement suivant la vitesse de pompage et influencer sur l'état de la cellule. La souplesse et le débit utilisé dans ce système permet une analyse corrélative des trois paramètres mesurés, ce qui constitue la base principale d'une interprétation directe.

Ce système d'analyses peut être corrélé à d'autres techniques de mesures. Des contrôles optiques peuvent être effectués par l'intermédiaire des microscopies de fluorescence ou électronique à balayage. Cette approche peut apporter des informations supplémentaires sur la structure cellulaire (ou des tumeurs) par exemple. Le fait de pouvoir recueillir le surnageant après mesure, va permettre de récupérer les cellules et d'effectuer des études cytologiques. Un compteur cellulaire de type Casy® peut être utilisé pour pallier l'imprécision d'un comptage cellulaire par voie optique et obtenir de bonnes informations sur les ratios cellules vivantes/mortes par exemple. Par ailleurs, les études d'expression des marqueurs avant et après mesures avec l'analyseur Bionas® peuvent être effectuées au niveau génétique avec de techniques classiques de PCR (Polymerase Chain Reaction)⁶⁵.

De nombreux types de cellules ont été analysés à l'aide de ces capteurs comme les cellules cancéreuses⁶⁶ pour la recherche oncologique. Ce système représente une plate-forme intéressante pour le criblage chimique de familles ou de nouvelles petites molécules. De plus, il est également possible d'étudier des parties de tumeurs sous la forme de tranches (200-250 μm d'épaisseur).

4. Systèmes impédimétriques microfluidiques

L'intérêt croissant pour la caractérisation des propriétés électriques des cellules vivantes a été soutenu par l'émergence de diverses techniques microfluidiques. Celles-ci permettent d'obtenir un dépistage de haute précision, un coût d'équipement réduit ainsi qu'un faible temps d'analyse pour la caractérisation des propriétés électriques de la cellule unique, par rapport aux techniques classiques souvent encombrantes.

Les dispositifs microfluidiques sont très utilisés pour les études cellulaires car les réponses physiologiques et électriques des cellules individuelles peuvent être détectées, et se retrouvent donc dans de nombreuses applications biologiques et médicales. Les dernières décennies ont été marquées par des avancées significatives des technologies microfluidiques pour la caractérisation biochimique des cellules⁶⁷, mais aussi biophysique (propriétés mécaniques et électriques par exemple). Les systèmes microfluidiques représentent une technologie de manipulation de fluides à l'échelle submillimétrique dans un système de

canaux fluidiques microscopiques. Ces dispositifs peuvent être des micro-systèmes complets d'analyse (μ TASs)⁶⁸ ou lab-on-a-chip (LOC) utilisés afin d'améliorer le diagnostic et la recherche biologique.

Les avantages en sont le faible volume de l'échantillon (incorporation de canaux micrométriques), la capacité d'intégration, la biocompatibilité et une réponse rapide. La plupart des réactions biologiques et chimiques étant corrélées à la diffusion moléculaire, la réduction des dimensions dans les microsystèmes permet la détection rapide en réduisant les temps de diffusion. Les processus de transport peuvent être également accélérés par la présence de microstructures adéquates au sein des canalisations comme des piliers ou des chevrons. De plus, l'ajout de microélectrodes dans les microcanaux permet l'enregistrement en temps réel de signaux électriques et électrochimiques.

Les systèmes microfluidiques ont montré un fort potentiel dans le domaine du diagnostic clinique moderne au travers par exemple de l'analyse d'ADN⁶⁹ ou l'analyse de cellules⁷⁰, compte tenu de la reproductibilité des résultats, d'une faible consommation d'énergie, associés à un faible coût (réduction des volumes d'échantillon et de réactif).

4.1. Choix des matériaux

Le choix des matériaux pour la fabrication des dispositifs microfluidiques est un facteur très important. Les critères de choix comprennent la biocompatibilité des matériaux, la transparence pour la microscopie, la mouillabilité pour la manipulation de liquides aqueux.

Initialement, le silicium et le verre ont été les matériaux les plus attrayants pour ces microdispositifs en raison de technologies de fabrication bien développées pour les semi-conducteurs et les systèmes micro-électro-mécaniques (MEMS). Plus récemment, des polymères ont gagné en popularité en raison de leurs propriétés physiques et de leur faible coût, tels que le polydiméthylsiloxane (PDMS), le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le polyéthylène diacrylate (PEG-DA), le polycarbonate et les copolymères d'oléfines cycliques (COC).

Le PDMS est typiquement utilisé pour le prototypage en raison de ses nombreux avantages (perméabilité aux gaz, transparence, flexibilité, et biocompatibilité).

Le COC est un polymère thermoplastique ayant des propriétés physiques et chimiques adaptées, telles que la transmittance optique élevée, une faible absorption d'eau, une biocompatibilité et une stabilité chimique élevée dans les milieux aqueux, alcalins, acides et les solvants polaires. Ce matériau est donc souvent utilisé pour des dispositifs microfluidiques jetables, type laboratoire sur puce⁷¹.

En raison de ses propriétés, le graphène peut être utilisé sur une plate-forme d'interface avec des cellules biologiques pour détecter des phénomènes intra- et extracellulaires. Bien que ces applications manquent de maturité, des dispositifs d'interface

cellulaire en graphène pourraient à l'avenir ouvrir de nouvelles pistes pour la détection et l'analyse de cellules uniques⁷².

Les avancées dans les techniques de microfabrication, telles que la lithographie douce, ont permis de créer de nouvelles opportunités de production de structures à l'échelle du micromètre à bas cout et de manière plus rapide.

4.2. Caractéristiques de l'écoulement

Les écoulements des dispositifs microfluidiques sont laminaires, c'est-à-dire que toutes les molécules/particules composant le liquide suivent presque parfaitement le gradient de vitesse global du fluide. La principale manifestation de ce phénomène se traduit par le fait que deux liquides différents, mis en contact lors d'un écoulement, ne vont pas se mélanger sur une grande distance.

En raison du rapport surface de contact/volume qui augmente considérablement à mesure que les dimensions diminuent, des forces inertielles et de viscosité, et du rapport des effets de capillarité par rapport à la gravité, les écoulements microfluidiques présentent beaucoup de différences avec les écoulements classiques. Les écoulements fluidiques à l'échelle macroscopique sont très généralement de type turbulent (nombre de Reynolds > 2000). C'est-à-dire que le fluide en déplacement subit un remou/mélange permanent : le gradient des molécules/particules est globalement orienté dans la direction d'écoulement, mais ce n'est pas le cas d'une molécule/particule isolée.

4.3. Exemples de réalisation de dispositifs microfluidiques impédimétriques

Plusieurs méthodes d'analyse des propriétés électriques de cellules uniques, telles que l'électro-rotation, la cytométrie de flux et la spectroscopie d'impédance micro-électrique (μ EIS) intègrent aujourd'hui des systèmes microfluidiques.

Par exemple Han *et al.*⁷³ ont développé un dispositif intégrant la microfluidique et la spectroscopie d'impédance en utilisant une pression négative pour capturer la cellule unique dans une cavité d'analyse (Figure I-18). Ce dispositif a été utilisé pour mesurer l'impédance électrique à différents stades pathologiques de cellules de cancer du sein (MCF-7, MDA-MB-231 et MDA-MB-435). Cependant ce dispositif présente l'inconvénient majeur de suivre le processus de capture des cellules à l'aide d'un microscope.

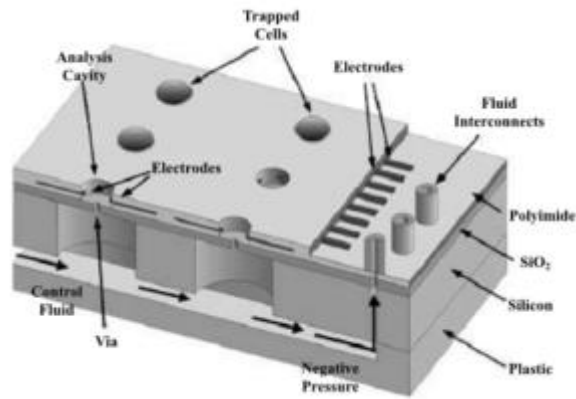


Figure I-18 : Illustration d'un micro système basé sur la spectroscopie d'impédance électrique utilisant des microélectrodes et une cavité d'analyses⁷³

Cho *et al.*²⁶ ont par ailleurs développé un réseau de pièges cellulaires horizontaux sur un dispositif μ -EIS pour surmonter la limitation de l'appareil précédent. La pression négative a été utilisée pour capturer des cellules individuelles et la mesure d'impédance a permis d'obtenir des spectres d'impédance électrique de la tête métastatique de lignées cellulaires de cancer du col de l'utérus. Ce dispositif permet également de réduire au minimum le courant de fuite en raison de la position des cellules et du contact direct entre les cellules et les électrodes. Le concept de système de piégeage vertical en μ -EIS a aussi été utilisé pour suivre l'évolution dynamique des propriétés électriques de la cellule unique sur une période de temps⁷⁴.

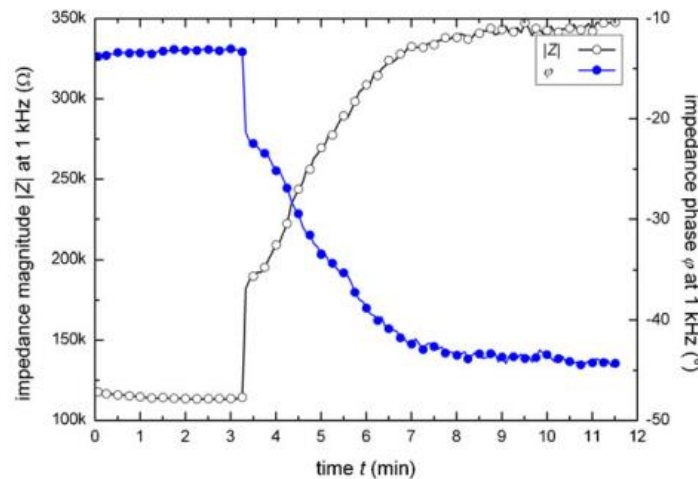


Figure I-19 : Variation du module d'impédance et de la phase en fonction du temps. Détermination du temps nécessaire au piégeage de la cellule⁷⁴

Ces évolutions ont également profité aux compteurs Coulter. Plusieurs modèles ont été proposés pour améliorer la performance en termes microfluidiques : optimisation de la gaine

d'écoulement pour surmonter les colmatages et utilisation de plusieurs orifices pour optimiser le débit.

Les dispositifs microfluidiques ont démontré un grand potentiel d'application dans la réalisation de mesures électriques sur des cellules individuelles à une vitesse d'essai importante. Les mesures électriques sur des cellules uniques peuvent être utilisées pour des applications de diagnostic précoce de maladie.

Il existe cependant deux grandes limitations au couplage de la technique SIE aux technologies microfluidiques (μ -EIS). Tout d'abord, le débit d'un dispositif μ -EIS est faible en raison des étapes de piégeage, de libération et de mesure de spectres d'impédance qui prennent du temps (seules des dizaines de cellules ont pu être testées). En second lieu, bien que la capacitance et la résistance des cellules testées puissent être déterminées par l'interprétation des spectres d'impédance avec des modèles électriques, ces paramètres sont fortement affectés par la taille de l'électrode, le mécanisme de piégeage de cellules, le volume des cellules et l'interaction avec d'autres cellules (par rapport à des paramètres de grandeur indépendante comme la capacité spécifique de la membrane et de la conductivité du cytoplasme).

5. Conclusion

La demande croissante de systèmes efficaces, à bas coûts et non-invasifs pour le suivi d'état clinique et le diagnostic de maladies, a engendré une augmentation des efforts de recherche afin de fournir de nouvelles méthodes pour effectuer des analyses biomédicales.

Les biocapteurs basés sur la détection de cellules vivantes sont désormais caractérisés par des sensibilités et des sélectivités importantes, ainsi qu'une réponse rapide. Du fait de leur polyvalence, ils sont applicables en plus du diagnostic médical à différents domaines tels que la sécurité alimentaire, la surveillance environnementale ou le criblage de substances bioactives pour l'industrie pharmaceutique.

Ces biocapteurs procurent des informations fonctionnelles et de cette façon nous aident à comprendre les mécanismes cellulaires responsables de maladies particulières, et améliorent le développement de traitements ciblés⁷⁵. Leur réponse est optimale en termes de détection de cellule unique, de sous-populations cellulaires ou de concentrations de microorganismes. Ces méthodes de détection électrique sont une véritable alternative aux techniques classiques.

Les techniques de détection par impédancemétrie associées aux technologies microfluidiques ouvrent un nouveau paradigme dans la recherche cellulaire et la microbiologie pour la détection précoce de maladies et fournissent des informations critiques nécessaires pour améliorer le diagnostic clinique et le suivi thérapeutique des patients. La microfluidique apporte de nombreux avantages tels que la réduction de la complexité de manipulation, un petit volume de réactifs utilisé, et l'observation *in situ* en temps réel de la réponse des cellules⁷⁶.

Ces biocapteurs se plient aux exigences des applications POC. Cependant, ils se heurtent encore à quelques inconvénients tels que des durées de vie parfois limitées. Néanmoins, les biocapteurs cellulaires ont une capacité unique pour simuler la réponse physiologique *in vivo*, et continueront certainement à révolutionner « l'analyse cellulaire » dans un proche avenir.

Bibliographie

- ¹ Zheng Y., Nguyen J., Wei Y., Sun Y., Recent advances in microfluidic techniques for single cell biophysical characterization, *Lab Chip*, 2013, 13, 2464-2483.
- ² Suresh S., Biomechanics and biophysics of cancer cells, *Acta Biomater.*, 2007, 3, 413–438.
- ³ Chen J., Li J., Sun Y., Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation, *Lab Chip*, 2012, 12, 1753–1767.
- ⁴ Lee G. Y. H., Lim C. T., Biomechanics approaches to studying human diseases, *Trends Biotechnol.*, 2007, 25, 111–118.
- ⁵ Zheng Y., Sun Y., Microfluidic devices for mechanical characterisation of single cells in suspension, *Micro Nano Lett.*, 2011, 6, 327–331.
- ⁶ McAdams E. T., Lacknermeier A., McLaughlin J. A., Macken D., Jossinet J., The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface, *Biosens. Bioelectron.*, 1995, 10(1), 67-74.
- ⁷ Świątosławski M., Molenda M., Grabowska M., Wach A., Kuśtrowski P., Dziembaj R., Electrochemical impedance spectroscopy study of C/Li₂MnSiO₄ composite cathode material at different states of charge, *Solid State Ionics*, 2014, 263, 99-102.
- ⁸ Yokoshima T., Mukoyama D., Nakazawa K., Gima Y., Isawa H., Nara H., Momma T., Tetsuya O., Application of Electrochemical Impedance Spectroscopy to Ferri/ Ferrocyanide Redox Couple and Lithium Ion Battery Systems Using a Square Wave as Signal Input, *Electrochim. Acta*, 2015, 180, 922-928.
- ⁹ Kashyap D., Dwivedi P.K., Pandey J.K., Kim Y.H., Kim G.M., Sharma A., Goel S., Application of electrochemical impedance spectroscopy in bio-fuel cell characterization: A review, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 2014, 29, 20159-20170.
- ¹⁰ Romano A-P., Olivier M-G., Investigation by electrochemical impedance spectroscopy of filiform corrosion of electrocoated steel substrates, *Prog. Org. Coat.*, 2015, 89, 1-7.
- ¹¹ Latus A., Enache M., Volanschi E., Drug–GSH interaction on GSH–Au modified electrodes: A cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy study, *Journal of Electroanal. Chem.*, 2011, 661, 120-129.
- ¹² Khene S., Moeno S., Tebello N., Voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy of gold electrodes modified with CdTe quantum dots and their conjugates with nickel tetraamino phthalocyanine, *Polyhedron*, 2011, 30, 2162-2170.
- ¹³ Katz E., Wilner I., Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-sensors, and Enzyme Biosensors, *Electroanalysis*, 2003, 15(11), 913-947.

- ¹⁴ Jorcin J-B., Spectroscopie d'impédance électrochimique locale : caractérisation de la délamination des peintures et de la corrosion des alliages Al-Cu, Institut National Polytechnique de Toulouse, Sciences et génie des matériaux, 2007.
- ¹⁵ Newman J., Frequency dispersion in capacity measurements at a disk electrode, *J. Electrochem. Soc.*, 1970, 117(2), 198–203.
- ¹⁶ Amokrane S., Badiali J. P., Modern aspects of electrochemistry, chapitre Analysis of the capacitance of the metal–solution interface, Plenum press, 1992, 22, 1–91.
- ¹⁷ Gabrielli C., Identification of electrochemical processes by frequency response analysis, Rapport technique 004/83, Solartron, 1998.
- ¹⁸ Mansor M. A., Ahamd M. R., Single Cell Electrical Characterization Techniques, *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 12686-12712.
- ¹⁹ Arndt S., Seebach J., Psathaki K., Galla H.J., Wegener J., Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 9, 583–594.
- ²⁰ Tlili C., Reybier K., Geloën A., Ponsonnet L., Martelet C., Ben Ouadah H., Lagarde M., Jaffrezic-Renault N., Fibroblast cells: a sensing bioelement for glucose detection by impedance spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 3340-3344.
- ²¹ Giaever I., Keese C. R., Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1984, 81(12), 3761-3764.
- ²² Giaever I., Keese C. R., Micromotion of mammalian cells measured electrically, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1991, 88(17), 7896-7900.
- ²³ Giaever I., Keese C. R., A morphological biosensor for mammalian cells, *Nature*, 1993, 366(6455), 591 – 592.
- ²⁴ Bagnaninchi P.O., Drummond N., Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2011, 108(16), 6462–6467.
- ²⁵ Angstmann M., Brinkmann I., Bieback K., Breitkreutz D., Maercker C., Monitoring human mesenchymal stromal cell differentiation by electrochemical impedance sensing, *Cytotherapy*, 2011, 13, 1074–1089.
- ²⁶ Cho S., Gorjup E., Thielecke H., Chip-based Time-continuous Monitoring of Toxic Effects on Stem Cell Differentiation, *Ann. Anat.*, 2009, 191(1), 145-152.
- ²⁷ Hildebrandt C., Büth H., Cho S., Impidjati, Thielecke H., Detection of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 2D and 3D cultures by electrochemical impedance spectroscopy, *J. Biotechnol.*, 2012, 148, 83–90.
- ²⁸ Park H.E., Kim D., Koh H. S., Cho S., Sung J-S., Kim J. Y., Real-Time Monitoring of Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Electric Cell-Substrate Impedance Sensing, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 485173, 1-8.

- ²⁹ Schneider D., Tarantola M., Janshoff A., Dynamics of TGF- β induced epithelial-to-mesenchymal transition monitored by Electric Cell-Substrate Impedance Sensing, *Bba-mol cell. res.*, 2011, 1813, 2099–2107.
- ³⁰ Ghenim L., Kaji H, Hoshino Y, Ishibashi T, Haguët V, Gidrol X, Nishizawa M., Monitoring impedance changes associated with motility and mitosis of a single cell, *Lab Chip*, 2010, 10(19), 2546–2550.
- ³¹ Wang L., Wang L., Yin H., Xing W., Yu Z., Guo M., Cheng J., Real-time, label-free monitoring of the cell cycle with a cellular impedance sensing chip, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25, 990–995.
- ³² Ribaut C., Reybier K., Launay J., Valentin A., Reynes O., Fabre P.L., Nepveu F., Electrochemical impedance spectroscopy to study physiological changes affecting the red blood cell after invasion by malaria parasites, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 2721–2725.
- ³³ Dibao-Dina A., Follet J., Ibrahim M., Vlandas A., Senez V., Electrical impedance sensor for quantitative monitoring of infection processes on HCT-8 cells by the waterborne parasite *Cryptosporidium*, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 66, 69–76.
- ³⁴ Houssin T., Follet J., Dei Cas E., Senez V., Electrochemical impedance spectroscopy for detection of parasites in drinking water, *IEEE SENSORS 2009 Conference*, 396–399.
- ³⁵ Opp D., Wafula B., Lim J., Huang E., Lo J-C., Lo C-M., Use of electric cell-substrate impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 2625–2629.
- ³⁶ Urcan E., Haertel U., Styllou M., Hickel R., Scherthan H., Reichl FX., Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts, *Dent. Mater.*, 2010, 26, 51–58.
- ³⁷ Guo M., Chen J., Yun X., Chen K., Nie L., Yao S., Monitoring of cell growth and assessment of cytotoxicity using electrochemical impedance spectroscopy, *Bba-mol cell. res.*, 2006, 1760, 432–439.
- ³⁸ Ceriotti L., Ponti J., Colpo P., Sabbioni E., Rossi F., Assessment of cytotoxicity by impedance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 3057–3063.
- ³⁹ Liu Q., Cai H., Xu Y., Xiao L., Yang M., Wang P., Detection of heavy metal toxicity using cardiac cell-based biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 3224–3229.
- ⁴⁰ Liu Q., Yu J., Xiao L., Tang J.C., Zhang Y., Wang P., Yang M., Impedance studies of bio-behavior and chemosensitivity of cancer cells by micro-electrode arrays, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 1305–1310.
- ⁴¹ Fareid A., Wang K., Thein M., Veiseth O., Yung S., Xu J., Zhang M., Single-cell bioelectrical impedance platform for monitoring cellular response to drug treatment, *Phys. Biol.*, 2011, 8, 015006.

- ⁴² Yu J., Liu Z., Yang M., Mak A., Nanoporous membrane-based cell chip for the study of anti-cancer drug effect of retinoic acid with impedance spectroscopy, *Talanta*, 2009, 80(1), 189–194.
- ⁴³ Schwarzenberger T., Wolf P., Brischwein M., Kleinhans R., Demmel F., Lechner A., Becker B., Wolf B., Impedance sensor technology for cell-based assays in the framework of a high-content screening system, *Physiol. Meas.*, 2011, 32(7), 977-993.
- ⁴⁴ Xie F., Xu Y., Wang L., Mitchelson K., Xing W., Cheng J., Use of cellular electrical impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity of anticancer drugs in a human kidney cell nephrotoxicity model, *Analyst*, 2012, 137(6), 1343–1350.
- ⁴⁵ Xiao, C.D., Luong, J.H.T., A simple mathematical model for electric cell-substrate impedance sensing with extended applications, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25, 1774–1780.
- ⁴⁶ Asphahani F., Thein M., Wang K., Wood D., Wong S. S., Xu J., Zhang M., Real-time characterization of cytotoxicity using single-cell impedance monitoring, *Analyst*, 2012, 137, 3011–3019.
- ⁴⁷ Ostrovidov S., Sakai Y., Fujii T., Integration of a pump and an electrical sensor into a membrane-based PDMS microbio reactor for cell culture and drug testing, *Biomed. Microdevices*, 2011, 13, 847–864.
- ⁴⁸ Hurley J., Sizing particles with a Coulter counter, *Biophys. J.*, 1970, 10(1), 74-79.
- ⁴⁹ Jagtiani A.V., Carletta J., Zhe J., A microfluidic multichannel resistive pulse sensor using frequency division multiplexing for high throughput counting of micro particles, *J. Micromech. Microeng.*, 2011, 21(6), 065004.
- ⁵⁰ Kim J., Kim E-G., Bae S., Kwon S., Chun H., Potentiometric multichannel cytometer microchip for high-throughput microdispersion analysis, *Anal. Chem.*, 2013, 85(1), 362-368.
- ⁵¹ Damhorst G., Murali Venkatesan B., Banerjee S., Solovyeva V., Bashir R., A submicron Coulter Counter for enumeration of viruses and nanoparticles, *Biophys. J.*, 2012, 102(3), 584a.
- ⁵² Watkins N. N., Sridhar S., Cheng X., Chen G. D., Toner M., Rodriguez W., Bashir R., A microfabricated electrical differential counter for the selective enumeration of CD4+ T lymphocytes, *Lab Chip*, 2011, 11(8), 1437-1447.
- ⁵³ Record M., Subra C., Silvente-Poirot S., Poirot M., Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors, *Biochem. Pharmacol.*, 2011, 81(10), 1171-1182.
- ⁵⁴ Choi H., Kim K. B., Jeon C. S., Hwang I., Lee S. A., Kim H. K., Kim H. C., Chung T. D., A label-free DC impedance-based microcytometer for circulating rare cancer cell counting, *Lab Chip*, 2013, 13(5), 970-977.
- ⁵⁵ Saleh O. A., Sohn L. L., Quantitative sensing of nanoscale colloids using a microchip Coulter counter, *Rev. Sci. Instrum.*, 2001, 72, 4449–4451.

- ⁵⁶ Chen Y., Kim S-J., Guo J., Kang Y., Kausalya J. P., Ghia Min Ong A., Hunziker W., Chung J., Portable Coulter counter with vertical through-holes for high-throughput applications, *Sensor and Actuators B: Chemical*, 2015, 213, 375-381.
- ⁵⁷ Cho Y., Frazier A.B., Chen Z.G., Han A., Whole-cell impedance analysis for highly and poorly metastatic cancer cells, *J. Microelectromech. Syst.*, 2009, 18(4), 808–817.
- ⁵⁸ Hong J-L., Lan K-C., Jang L-S., Electrical characteristics analysis of various cancer cells using a microfluidic device based on single-cell impedance measurement, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 2012, 173, 927-934.
- ⁵⁹ Jang L. S., Wang M. H., Microfluidic device for cell capture and impedance measurement, *Biomed. Microdevices*, 2007, 9(5), 737–743.
- ⁶⁰ Kang G., Kim Y-j., Moon H-s., Lee J-W., Yoo T-K., Park K., Lee J-H., Discrimination between the human prostate normal cell and cancer cell by using a novel electrical impedance spectroscopy controlling the cross-sectional area of a microfluidic channel, *Biomicrofluidics*, 2013, 7(4), 044126.
- ⁶¹ Wang W., Foley K., Shan X., Wang S., Eaton S., Nagaraj V., Wiktor P., Patel U., Tao N., Single cells and intracellular processes studied by a plasmonic-based electrochemical impedance microscopy, *Nature Chem.*, 2011, 3(3), 249–255.
- ⁶² Wegener J., Keese CR., Giaever I., Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces, *Exp. Cell Res.*, 2000, 259(1), 158-166.
- ⁶³ Mc Connell HM., Owicki JC., Parc WP., Miller DL., Baxter GT., Wada HG., Pitchford S., The Cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology, *Science*, 1992, 257(5078), 1906-1912.
- ⁶⁴ Wolf B., Brischwein M., Baumann W., Ehret R., Kraus M., Monitoring of cellular signaling and metabolism with modular sensor-technique. The physiocontrol-microsystem, *Biosens. Bioelectron.*, 1997, 13(5), 501-509.
- ⁶⁵ Morguet A., Pütz N., García Gómez de las Heras S., Mestres P., Correlation between cell substrate impedance and attachment and spreading of cells growing on artificial surfaces. Scanning electron microscopy studies, *Microsc. Microanal.*, 2007, 13(3), 246-247.
- ⁶⁶ Schatzschneider U., Niesel J., Ott I., Gust R., Alborzinia H., Wolf S., Cellular uptake, cytotoxicity, and metabolic profiling of human cancer cells treated with ruthenium (II) polypyridyl complexes [Ru(bpy)]₂(N-N)] Cl₂ with N-N = bpy, phen, dpq, dppz and dppn, *ChemMedChem.*, 2008, 3(7), 1104-1109.
- ⁶⁷ Du E., Ha S., Diez-Silva M., Dao M., Suresh S., Chandrakasan A.P., Electric impedance microflow cytometry for characterization of cell disease states, *Lab Chip*, 2013, 13(19), 3903–3909.

-
- ⁶⁸ Reyes D.R., Iossifidis D., Auroux P.-A., Manz A., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology, *Anal. Chem.*, 2002, 74(12), 2623–2636.
- ⁶⁹ Javanmard M., Davis R.W., A microfluidic platform for electrical detection of DNA hybridization, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 2011, 154(1), 22–27.
- ⁷⁰ Yang L., Li Y., Griffis C.L., Johnson M.G., Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable salmonella typhimurium, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 19(10), 1139–1147.
- ⁷¹ Ng J., Gitlin I., Stroock A. D., Whitesides G. M., Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidics systems, *Electrophoresis*, 2002, 23(20), 3461–3473.
- ⁷² Nguyen P., Berry V., Graphene interfaced with biological cells: Opportunities and challenges, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, 3(8), 1024–1029.
- ⁷³ Han A., Frazier A.B., Ion channel characterization using single cell impedance spectroscopy, *Lab Chip*, 2006, 6(11), 1412–1414.
- ⁷⁴ Kurz C.M., Büth H., Sossalla A., Vermeersch V., Toncheva V., Dubruel P., Schacht E., Thielecke H., Chip-based impedance measurement on single cells for monitoring sub toxic effects on cell membranes, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26(8), 3405–3412.
- ⁷⁵ Kiilerich-Pedersen K., Rozlosnik N., Cell-Based Biosensors: Electrical Sensing in Microfluidic Devices, *Diagnostics*, 2012, 2(4), 83–96.
- ⁷⁶ Čemažar J., Miklavčič D., Kotnik T., Microfluidic devices for manipulation, modification and characterization of biological cells in electric Fields—A Review, *J. Microelectron. Electron. Compon. Mater.*, 2013, 43(3), 143–161.

Chapitre 2 : Descriptif du projet

Chapitre 2 : Descriptif du projet

1. Introduction	56
2. Présentation générale du laboratoire sur puce	59
2.1. Principe général.....	59
2.2. Choix des cellules	59
2.3. Description du dispositif développé.....	60
2.3.1. Phase de marquage	62
2.3.2. Phase de séparation magnétique.....	62
2.3.3. Phase de détection	63
3. Objectifs de la thèse	63
3.1. Influence de la taille des microélectrodes.....	63
3.2. Bio fonctionnalisation des microélectrodes.....	64
3.3. Matériels et Méthodes d'analyses	66
4. Conclusion	69
Bibliographie	70

1. Introduction

Les approches « laboratoires sur puce »^{1,2} constituent aujourd'hui un enjeu majeur aussi bien dans le monde des micro- et nano-technologies que dans celui des sciences analytiques, du diagnostic ou de la recherche pharmaceutique. Comme évoqué précédemment, ils offrent en effet la possibilité de lever deux verrous majeurs :

- **le traitement de très faibles volumes d'échantillons** : les processus actuels opérant majoritairement par pipetage sont en effet limités à des volumes supérieurs à une valeur de l'ordre du microlitre, par des problèmes d'évaporation et de tension superficielle. Cette contrainte limite de façon importante le nombre d'analyses possibles avec un échantillon biologique compte tenu des étapes de purification qui sont généralement réalisées en amont. L'utilisation de systèmes microfluidiques fermés permet de s'affranchir de ces limites et de travailler dans la gamme du nanolitre voire du picolitre ;
- **l'intégration de procédés complexes** : un processus d'analyse biologique implique d'enchaîner une série d'opérations (stockage, mélange, filtration, extraction, synthèse, détection d'espèces chimiques ou biochimiques) nécessitant en général l'intervention d'opérateurs qualifiés et des temps d'opération longs (de plusieurs heures à quelques jours selon la technique). L'intégration complète et automatisée dans une démarche « de l'échantillon au résultat » offre ainsi d'intéressantes perspectives en termes de portabilité et délocalisation des analyses, de réduction des coûts et de fiabilisation du résultat.

Le domaine des laboratoires sur puce s'est d'abord construit essentiellement sur les reconnaissances moléculaires (ADN³, protéines⁴) en s'appuyant sur les acquis des techniques analytiques (électrophorèse, chromatographies) et a profité de la dynamique générée par les enjeux du génotypage. La possibilité de travailler au niveau cellulaire a été identifiée dès la fin des années 90⁵ pour, notamment, étudier les propriétés biophysiques (croissance en milieu confiné et donc influence de l'environnement mécanique) ou faire de l'ingénierie cellulaire (transfection par exemple).

Ce n'est que dans les années 2000 que la problématique du diagnostic cellulaire a réellement pris son essor^{6,7}. Cette évolution est sous-tendue principalement par deux enjeux principaux :

- **le fractionnement sanguin** : dans un objectif d'analyse intégrée complète, il est absolument indispensable de gérer la complexité de l'échantillon sanguin ce qui ramène bien souvent à éliminer les espèces non requises (plaquettes, globules rouges, ...)

- **le diagnostic cellulaire** à proprement parler : les modifications portées par les cellules dans bon nombre de pathologies (infections, inflammations, cancers...) sont des éléments de diagnostic riches et variés. Qu'il s'agisse de cellules prélevées par biopsie, de cellules sanguines (globules rouges ou blancs) ou de cellules circulantes (cancéreuses par exemple), le problème est celui du tri et de l'identification de ces cellules.

De nombreux protocoles d'analyse utilisant des techniques de comptage ou de séparation par marquage ont été proposés. Mais il faut attendre quelques travaux récents (Toner et al.⁸, Seki et al.⁹) pour donner une véritable impulsion scientifique à ce domaine. Cependant, les aspects de sélections multicritères sont largement inexplorés et les techniques de comptage encore peu intégrées. Le principal verrou au tri multi-critères est un verrou technologique. En effet, la séparation par diélectrophorèse¹⁰ nécessite par exemple l'utilisation de hautes tensions, proscrit l'utilisation du silicium et fait souvent appel à des technologies de réalisation en verre peu compatibles avec une intégration poussée et complexe. De même les techniques de tri hydrodynamique ont été démontrées sur des technologies Si ou PDMS, peu souples pour la première et peu performantes pour la seconde. Le travail d'Adams¹¹ couplant séparation acoustique et magnétique fait figure de pionnier en la matière.

Ainsi même si les briques de bases scientifiques existent déjà, l'approche multifonctionnelle et multiparamétrique apporte un niveau d'innovation considérable. Ces deux points (multifonctionnalités, analyses multi-paramètres) constituent en effet deux enjeux majeurs pour le développement et surtout l'émergence industrielle des laboratoires sur puce en général et des puces de diagnostic de terrain en particulier.

Bien que des techniques conventionnelles, comme la cytométrie en flux^{12,13,14} (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter), soient très performantes, des solutions miniaturisées apporteraient une alternative complémentaire et majeure pour le diagnostic délocalisé : facilité d'utilisation, flexibilité, coût faible du test individuel associé à de bons niveaux de performance et de fiabilité.

Le travail de thèse présenté dans ce document s'intègre dans un projet visant au développement d'un dispositif de type « laboratoire sur puce », pour le tri et le comptage de sous-populations cellulaires comme marqueurs d'une pathologie pour le diagnostic semi-rapide de terrain. Le diagnostic sur cellule est aujourd'hui un domaine très actif en microfluidique mais se heurte à un double verrou : les espèces cellulaires à identifier sont souvent en très petite quantité et dans un milieu d'analyse complexe (sang complet par exemple).

Ce dispositif permettrait de lever ces difficultés par une approche multifonctionnelle et multicritères totalement intégrée tout en étant complémentaire des techniques de cytométrie de flux majoritairement utilisées pour le tri et le comptage cellulaire mais

présentant de nombreux désavantages parmi lesquels les contraintes liées à son utilisation, comme un appareillage volumineux ou encore un temps d'analyse élevé.

Le principe fonctionnel complet du laboratoire sur puce repose sur une différenciation immunologique basée sur l'expression de plusieurs antigènes caractéristiques de la sous-population que l'on souhaite isoler. Il associe dans un dispositif unique deux étapes de tri différentes et complémentaires à l'étape de comptage finale : il combine un système de tri magnétique à un système de tri sur électrodes fonctionnalisées, le comptage étant réalisé par spectroscopie d'impédance électrochimique. Ce dispositif pourra s'adresser à un grand nombre d'applications pour lesquelles le recours à la cytométrie de flux est beaucoup trop coûteux ou difficile à mettre en œuvre ouvrant ainsi de nombreuses perspectives notamment pour des applications civiles comme l'analyse hors structure hospitalière (suivi de traitement personnel, analyses vétérinaires, épidémies), l'analyse de terrain (armée, populations délocalisées, épidémies, aides humanitaires) ou l'analyse hors structure hospitalière (suivi de traitement à domicile). Le secteur vétérinaire souffrant actuellement d'un manque d'outils de diagnostic rapides, portables et de faible coût, pourrait également constituer un secteur de développement de ce type de système.

Le tableau ci-dessous présente quelques exemples de types cellulaires circulants du sang qui peuvent être la cible de pathogènes et qui présentent à leur surface des marqueurs spécifiques d'une infection virale, bactérienne ou parasitaire. L'évaluation précoce de l'apparition de ces marqueurs constitue un enjeu intéressant notamment pour des troupes en campagne sur des territoires hostiles ou en mission d'aide humanitaire.

	Pathologie	Type cellulaire	Antigène de surface
Pathologies infectieuses	Septicémie	Monocytes Macrophages	Anticorps dirigés contre CD14+ CD16+
	Leishmaniose	Monocytes Macrophages Eosinophiles Cellules dendritiques	Monocytes : CD14+ CD16+ ou anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène LACK de Leishmania lié à I-Ad du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
	Paludisme	Erythrocytes	Anticorps dirigé contre l'antigène plasmodial Pf155 RESA
	Dengue	Lymphocytes T et B Monocytes	LT : CD3 ; LB : CD19 Monocytes : CD14+ CD16+ anticorps monoclonal anti flavivirus

Tableau II-1 : Exemples de types cellulaires circulants du sang pouvant être la cible de pathogènes

2. Présentation générale du laboratoire sur puce

2.1. Principe général

Le dispositif est basé sur un double tri immunologique opéré par l'intermédiaire de microbilles paramagnétiques fonctionnalisées suivi d'un comptage collectif des cellules en utilisant une technique électrochimique, permettant ainsi d'atteindre des temps d'analyse courts. Cette approche offre la perspective d'intégrer les étapes de préparation et de purification de l'échantillon sur la même plateforme et ouvre donc la possibilité ultérieure de l'automatisation de l'analyse. Elle est également compatible à terme avec un objectif de dispositifs totalement portables et donc d'une utilisation plus près du patient ou du personnel déplacé.

2.2. Choix des cellules

Compte-tenu de la forte récurrence des monocytes^{15,16} (MO) comme marqueur d'un processus infectieux, d'une inflammation chronique et du développement tumoral, les premiers types cellulaires choisis pour valider le dispositif seront les monocytes inflammatoires du sang. Le changement de la formule sanguine, notamment de la population monocyttaire, est un très bon indicateur de l'apparition d'une pathologie à un stade précoce. Les monocytes circulants du sang sont les cellules clés qui relient le système immunitaire inné et l'immunité adaptative. Ils jouent un rôle décisif dans de nombreuses pathologies inflammatoires et infectieuses. Ils proviennent d'un précurseur myéloïde et donnent naissance à différents sous-types de macrophages tissulaires et de cellules dendritiques (Figure II-1).

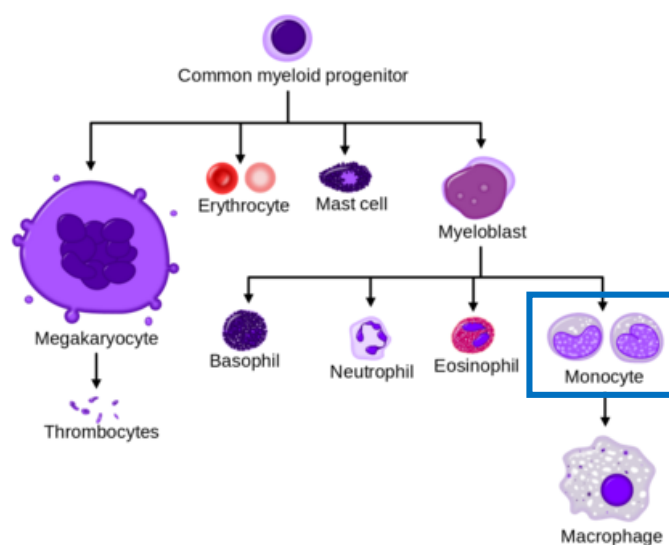


Figure II-1 : Sous-partie de l'hématopoïèse humaine normale

Les monocytes du sang font partie de la famille du système phagocytaire mononucléaire qui joue un rôle central dans l'immunorégulation et la défense immunitaire contre les organismes pathogènes¹⁷. Ces cellules, mesurant environ 15 μm , interviennent dans les phénomènes inflammatoires et dans la synthèse de nombreux facteurs de croissance. Elles appartiennent à la première ligne de défense contre les infections bactériennes, fongiques, parasitaires ou virales et exercent des fonctions de phagocytose et des fonctions sécrétrices. Lors des infections, les MO contribuent directement à la défense immunitaire grâce à leur fonction phagocytaire mais aussi grâce à leur activation par des organismes infectés ou des médiateurs inflammatoires, ainsi que par des facteurs chimiotactiques libérés par les autres cellules qui modulent le processus inflammatoire et déclenchent la réponse immunitaire adaptée.

Ces cellules constituent une population hétérogène¹⁸ et peuvent être classés en trois sous-groupes sur la base de l'expression du CD14 (récepteur aux lipopolysaccharide (LPS)) et du CD16 (récepteur Fc γ IIIR) (Figure II-2).

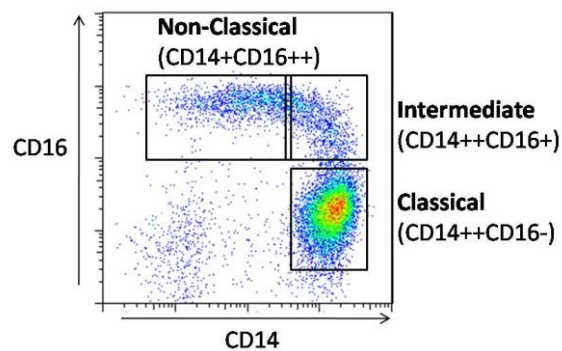


Figure II-2 : Analyses par cytométrie de flux démontrant l'hétérogénéité de la population monocytaire (travaux de S.C. Wong, Singapore Immunology Network, SInN)

Les monocytes classiques sont CD14++ CD16-, les monocytes intermédiaires sont CD14++ CD16+ et les monocytes associés aux pathologies inflammatoires et infectieuses sont CD14+ CD16++. Le ratio des monocytes CD16+/CD16- dans le sang augmente significativement au cours de pathologies infectieuses (septicémies¹⁹, athérosclérose²⁰, infections HIV²¹).

Dans cette thèse, toutes les expériences portant sur le piégeage immunologique seront réalisées à partir de monocytes de lignées cellulaires THP-1 (annexe 1).

2.3. Description du dispositif développé

Le système développé peut être décomposé en deux modules successifs :

- le premier module est destiné à l'isolement des monocytes des autres constituants du sang : il sera réalisé grâce à l'utilisation de billes magnétiques fonctionnalisées avec

l'anticorps anti-CD14 capable de reconnaître le récepteur CD14 présent sur le monocyte. Le tri magnétique présente l'avantage d'être facilement miniaturisable et utilisable avec de très petits volumes d'échantillon. Il a été démontré très récemment la possibilité d'intégrer des microsources magnétiques sous la forme de microbobines dans des systèmes microfluidiques tout polymère. Les fonctions de tri et de piégeage magnétiques ont pu ainsi être validées. Le défi majeur dans la conception de systèmes de séparation micro-magnétique reste toutefois l'obtention d'une séparation efficace en flux continu.

- le second module permet de trier spécifiquement les monocytes proinflammatoires grâce à leurs récepteurs CD16. Le tri et le comptage seront réalisés par l'intermédiaire d'électrodes fonctionnalisées avec des anticorps anti-CD16. Les cellules ainsi immobilisées sur l'électrode sont comptées par spectroscopie d'impédance électrochimique.

La plupart du temps le comptage se fait par l'intermédiaire de techniques optiques qui nécessitent des montages expérimentaux compliqués et des échantillons marqués. L'utilisation de techniques de comptage ne nécessitant pas de marquage fluorescent des cellules permet de diminuer considérablement la complexité des systèmes, les rendant plus appropriés pour la réalisation de dispositifs portables. La spectroscopie d'impédance fait partie des méthodes capables de surmonter certaines de ces limitations. Comme évoqué précédemment, cette technique a évolué vers des systèmes fluidiques utilisant des électrodes intégrées dans les canalisations et permettant le comptage individuel ou collectif des cellules en fonction de leurs caractéristiques électriques (propriétés diélectriques).

Le protocole d'analyse est représenté sur la Figure II-3 et peut être décrit sous la forme de trois phases :

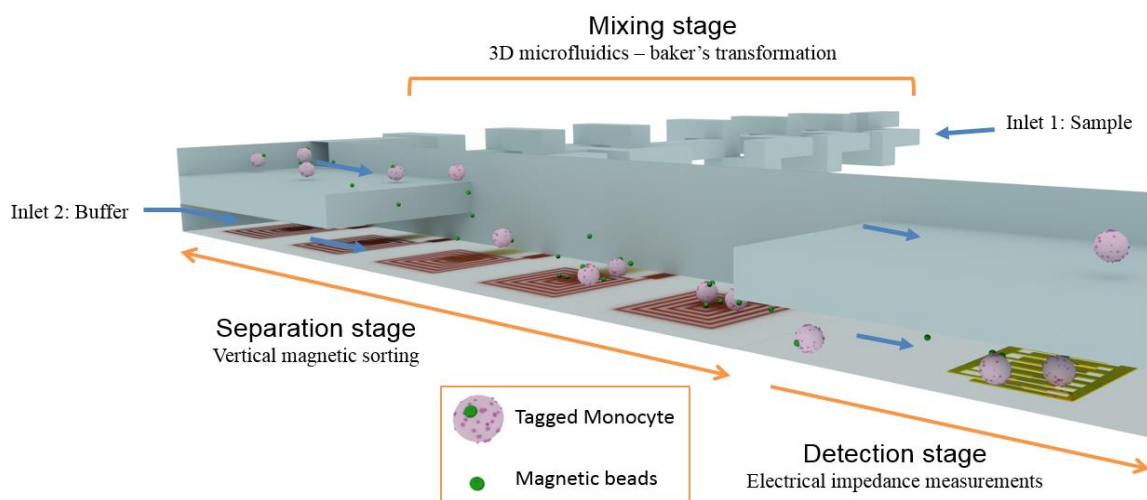


Figure II-3 : Représentation 3D idéale de l'immunocapteur

2.3.1. Phase de marquage

Une première zone permet le marquage sélectif de l'échantillon cellulaire par des microbilles fonctionnalisées (*mixing stage*). L'échantillon sanguin est introduit puis mélangé à un tampon contenant des microbilles magnétiques dont la surface a été préalablement fonctionnalisée par des anticorps anti-CD14. Dans cette zone de marquage, les monocytes se fixent sur les billes par interaction antigène/anticorps. Des travaux antérieurs montrent toute l'importance de cette zone (Thèse S. Cargou²²). La solution la plus fréquemment implémentée est celle d'un marquage par mélange/incubation. Le mélange peut être réalisé de manière homogène par l'intermédiaire d'une série de ponts 3D, ou de micro-mélangeurs à transformée du boulanger. Cette partie du travail ainsi que le développement du module de séparation ont été pris en charge dans le cadre de la thèse de Marc Fouet (M. Fouet, février 2016).

Une fois passées dans cette phase de micro-mélange, les cellules marquées, ou non, par les billes magnétiques arrivent dans la partie du laboratoire sur puce dédiée à la séparation magnétique.

2.3.2. Phase de séparation magnétique

Cette deuxième zone est dédiée à la séparation des cellules marquées des autres constituants de l'échantillon par attraction magnétique des complexes [billes + cellule] sur des bobines placées au fond des canalisations (*separation stage*). L'activation des microbobines intégrées permet la déviation des complexes monocytes/microbilles dans la canalisation inférieure et leur séparation du milieu initial. Grâce à la structure tridimensionnelle du capteur, cette étape est effectuée en mode continu ou en mode « batch », comme illustré ci-dessous.

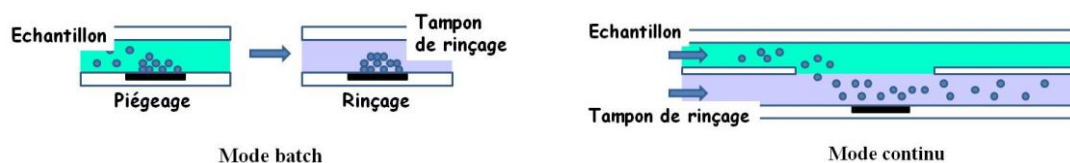


Figure II-4 : Tri magnétique des monocytes marqués en mode batch ou continu

Le tri magnétique a été mis au point et validé, dans un premier temps, à l'aide de billes magnétiques de différents diamètres. Les essais réalisés sur des échantillons cellulaires pour différentes tailles de billes magnétiques fonctionnalisées ont montré que la séparation la plus efficace se faisait pour des billes de $2,8\ \mu\text{m}$ (meilleurs taux de marquage). L'efficacité de cette méthode de tri a été évaluée en utilisant des échantillons dont le rapport $\text{MO}_{\text{sains}}/\text{MO}_{\text{inflammatoires}}$ a été préalablement déterminé grâce à l'utilisation de cellules de Malassez. Les complexes alors séparés des autres types cellulaires sont entraînés par écoulement vers les électrodes fonctionnalisées.

2.3.3. Phase de détection

La première fonction de ce module est de piéger sélectivement sur la surface des électrodes de comptage les monocytes inflammatoires. Deux verrous principaux sont liés à cette fonction. Le premier est que le piégeage doit être le plus efficace possible, les monocytes inflammatoires pouvant être présents en faible quantité, le second étant que le piégeage doit être le plus sélectif possible de manière à minimiser les risques de faux diagnostic. Ces verrous peuvent être levés en intégrant un actionneur magnétique (microbobines) qui va permettre d'amener les complexes MO/microbilles au plus près des électrodes et d'accroître les probabilités de couplage (Brevet N° 13 57410) ; après fixation, les microbobines sont désactivées, libérant les MO sains dans la canalisation fluide. Ne resteront donc sur les électrodes fonctionnalisées que les MO inflammatoires. Le dimensionnement des électrodes est une étape très importante afin de garantir le piégeage de toutes les cellules inflammatoires, compte tenu du fait que l'attraction magnétique opère de manière équivalente sur les MO inflammatoires et sains.

Le comptage des cellules est réalisé par spectroscopie d'impédance électrochimique. En mesurant l'impédance à l'interface cellule/électrode pour une large gamme de fréquences il est possible, de relier la variation d'impédance au taux de recouvrement et donc au nombre de cellules piégées.

3. Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été de développer **le second module microfluidique de tri et comptage cellulaire**, le but étant de se rapprocher de la détection de la cellule unique. Ces travaux de thèse s'appuient sur les premiers essais réalisés en mode statique et fluide sur des macro-électrodes lors de la thèse d'Armelle Montrose²³. Ces travaux ont nécessité la conception et la réalisation des systèmes de microélectrodes, leur intégration dans un réseau de microcanaux, la mise au point du procédé de fonctionnalisation en microfluidique et la validation du concept à partir de systèmes cellulaires exprimant (ou non) les antigènes CD14 et/ou CD16 (tests de sensibilité et de sélectivité). Par ailleurs, dans un second temps la possibilité d'utiliser ces puces microfluidiques pour la caractérisation d'interactions récepteur-ligand sur cellule entière a également été testée.

3.1. Influence de la taille des microélectrodes

En utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique comme méthode d'analyse, chaque géométrie d'électrode va posséder une réponse impédimétrique différente suivant le nombre de cellules adhérentes à sa surface. Ces géométries sont caractérisées par une certaine limite de détection et un rapport signal sur bruit. Les mesures d'impédance vont permettre de caractériser les propriétés résistives et capacitives de chaque système. Comme

les cellules se fixent à la surface du biocapteur, les parties réelle et imaginaire de l'impédance varient, conduisant à des variations de la capacitance interfaciale, de la conductance moyenne ou de la capacitance moyenne. En général, pour toutes les géométries d'électrodes, la variation d'impédance est inversement proportionnelle à la surface active²⁴. Cette propriété a été démontrée lors du piégeage de THP-1 sur des macroélectrodes d'or de 1 à 0,04 cm² (thèse A. Montrose) (Figure II-5).

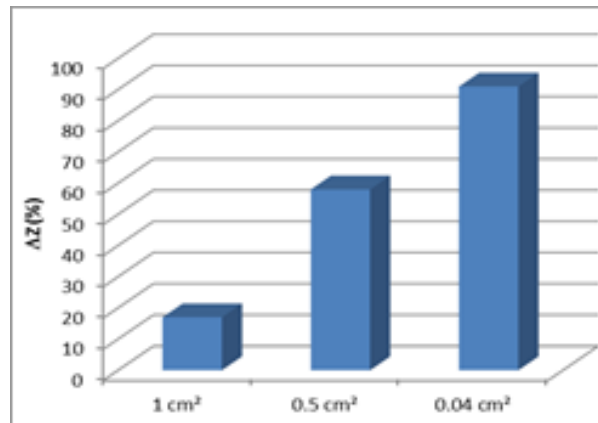


Figure II-5 : Variation du module d'impédance en fonction de la taille des électrodes en présence de suspensions cellulaires (1 million de cellules / mL)

Dans la région des hautes fréquences, les paramètres d'impédance sont plus ou moins insensibles à la surface d'électrode active, mais très sensibles dans la région des basses fréquences. De plus, il est observé un saut de l'angle de phase dans la région des hautes fréquences lorsque l'aire de l'électrode de travail augmente, et aux basses fréquences lorsque celle-ci diminue. La résistance au transfert de charge et la capacitance diminuant avec l'augmentation de l'aire de l'électrode, il y a donc un réel intérêt à miniaturiser encore plus les électrodes, afin d'augmenter la sensibilité de détection. Pour cela, les apports des technologies de salle blanche, tels que la photolithographie ou encore le « lift-off », sont très importants. Les procédés de fabrication mis en œuvre pour la miniaturisation de l'électrode de travail et de la contre-électrode seront présentés dans le chapitre 3 au fil des expériences.

3.2. Bio fonctionnalisation des microélectrodes

Le succès du dispositif de comptage et d'analyse par impédance repose sur la capacité des cellules à être piégées spécifiquement à la surface des microélectrodes afin de limiter une éventuelle perte de signal électrique due aux courants de fuites entre l'électrode et l'électrolyte et ainsi d'améliorer la sensibilité de détection. Ainsi, les mécanismes régissant la fixation des cellules sont d'une importance significative.

Le piégeage est réalisé par l'intermédiaire d'électrodes fonctionnalisées à l'aide d'anticorps particuliers (anti-CD14 ou anti-CD16) capables de reconnaître avec une extrême

spécificité l'antigène correspondant présent sur la cellule que l'on souhaite piéger (monocyte ou monocytes pro-inflammatoire). Les premiers essais réalisés sur macroélectrodes ont démontré que les anticorps pouvaient être greffés par l'intermédiaire d'un système multicouche comprenant des couches auto-assemblées (SAM pour *self assembled monolayer*) de thiols mixtes, c'est-à-dire de thiols présentant différents groupements terminaux (dont un groupement fonctionnel, COOH) et ayant des longueurs de chaîne très différentes (Figure II-6). L'utilisation de thiols mixtes permet :

- d'augmenter la densité des chaînes et ainsi éviter les adsorptions non spécifiques avec l'or ;
- de diluer le nombre de groupements fonctionnels et ainsi d'éviter les adsorptions non spécifiques qui pourraient se produire au niveau de la SAM ;
- de prévenir la dénaturation de la biomolécule qui serait due à un trop grand nombre de liaisons entre la surface de thiols et la molécule.

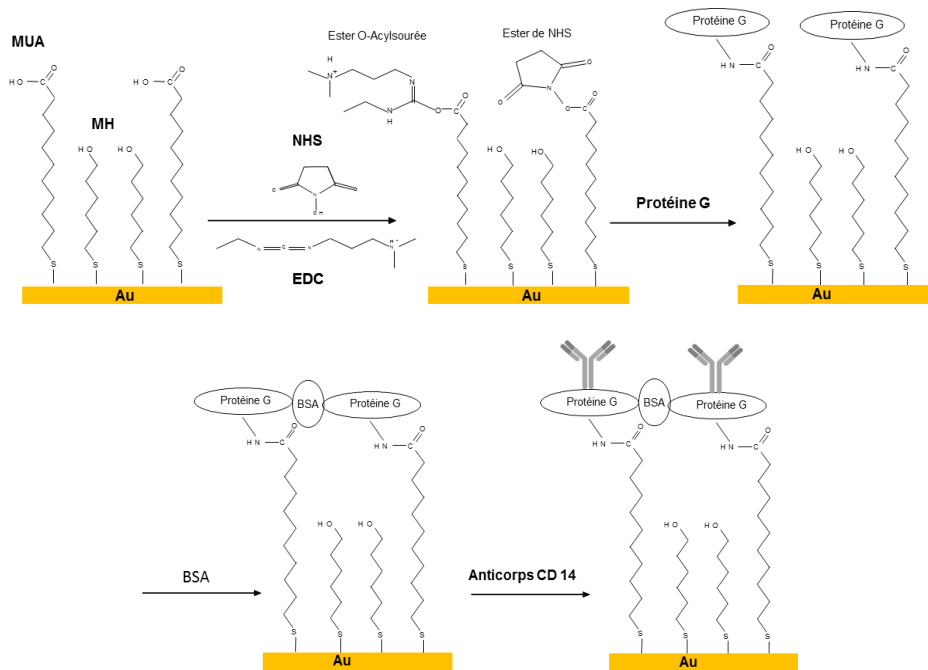


Figure II-6 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du procédé de fonctionnalisation

Les couches auto-assemblées ont été réalisées à partir d'un mélange d'acide 11-mercaptoundecanoïque (MUA) et de 6-mercaptohexanol (MH) en proportion 1/10. D'autre part, afin d'éviter une diminution de l'activité de piégeage des anticorps, la fixation des anticorps à la surface de la monocouche auto-assemblée est réalisée par l'intermédiaire d'une protéine d'attachement, la protéine G (PG). Cette protéine se lie spécifiquement à la molécule d'immunoglobuline par la région Fc sans interagir avec le site actif de l'antigène et permet ainsi d'obtenir une orientation donnée de l'anticorps. Le greffage de la protéine G sur la couche de SAM se fait après activation des groupements carboxyliques terminaux par un

mélange de NHS (N-hydroxysuccinimide) et EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide). Les interactions non spécifiques de type cellules/SAM ou cellules/or, sont limitées par l'ajout d'albumine de sérum bovin (BSA), avant fixation des anticorps (Figure II-6).

Comme le démontrent les diagrammes ci-dessous (thèse A. Montrose) la modification des électrodes d'or par le système multicouches SAM / PG / BSA / anticorps permet un piégeage spécifique (Figure II-7-A) et quantitatif (Figure II-7-B) des monocytes pro-inflammatoires. Ce dernier résultat est cohérent avec une augmentation de l'impédance (donc de la sensibilité) lorsque la surface de l'électrode (et le courant) diminue ($Z = U/I$).

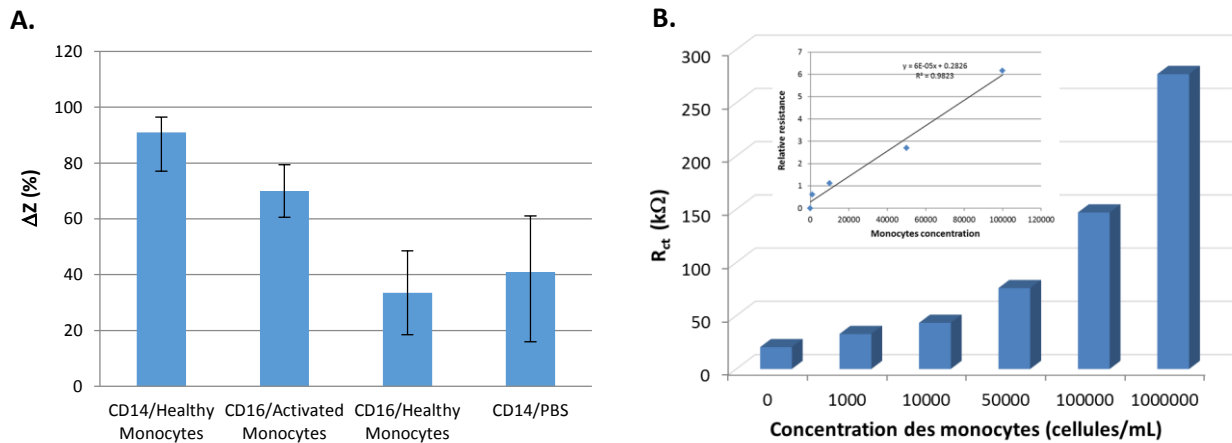


Figure II-7 : A- Sélectivité des électrodes vis-à-vis des monocytes sains ou activés (LPS), B-Variation du module de l'impédance en fonction du nombre de cellules déposées

Dans ce cas (mode statique), la modification des électrodes (électrode de travail et contre électrode) a été réalisée par l'intermédiaire de gouttes déposées sur la surface du dispositif. La première partie du travail de thèse consiste à transposer le protocole de modification des surfaces au dispositif microfluidique c'est-à-dire aux électrodes situées à l'intérieur des canalisations. La modification de ces électrodes sera réalisée par passages successifs dans la canalisation de solutions contenant l'agent modifiant, pour chaque étape de fonctionnalisation, comme décrit par Fertier *et al*²⁵.

3.3. Matériels et Méthodes d'analyses

L'étude de la réponse de chaque étape de la fonctionnalisation par spectroscopie d'impédance électrochimique permet, en les reliant à la nature des différentes surfaces générées, d'accéder à des informations sur les processus physicochimiques ayant lieu à la surface de l'électrode, tels que le transfert de charge et le taux de recouvrement de l'électrode.

Pour les qualifications en mode statique, les mesures impédimétriques sont réalisées à partir d'une goutte d'électrolyte déposée à la surface des microélectrodes, par rapport à une électrode de référence au calomel saturé immergée dans la goutte. Pour les qualifications en mode fluide, les mesures impédimétriques sont réalisées à partir d'un flux d'électrolyte immergeant la canalisation (recouvrant ainsi la surface des microélectrodes), avec un système à deux électrodes (l'électrode de référence et la contre-électrode étant en court-circuit).

Toutes les mesures impédimétriques sont réalisées à température ambiante (25°C), dans une cage de Faraday afin de limiter le bruit, avec un Autolab PGSTAT 128n (Metrohm) et le logiciel NOVA. Les spectres d'impédance sont enregistrés pour une gamme de fréquences de 100 mHz à 50 kHz au potentiel d'équilibre de l'électrolyte après chaque étape de fonctionnalisation ou de piégeage cellulaire. L'amplitude de la tension alternative imposée est de 10 mV. On considère que le film formé est stable et n'évolue pas pendant la mesure. Les mesures sont effectuées en mode faradique à l'aide d'une sonde redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1:1)), 5 mM dans du PBS (pH = 7,4). Comme l'illustre le schéma ci-dessous, ce mode de mesure traduit la capacité de la sonde à venir s'oxyder ou se réduire à la surface de la microélectrode de manière plus ou moins aisée.

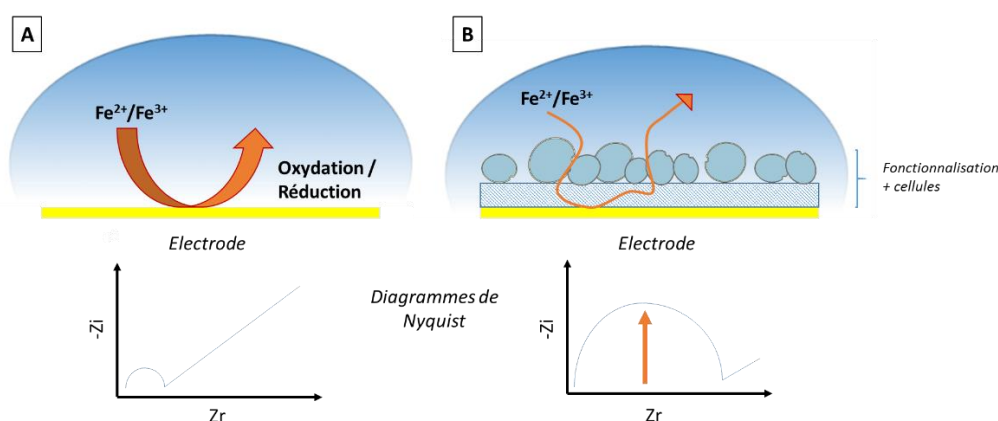


Figure II-8 : Réponse impédimétrique d'une électrode en mode faradique, A- Réponse d'une microélectrode nue, B- Réponse d'une électrode fonctionnalisée par des objets isolants

Dans un premier temps, la réponse impédimétrique de chaque électrode est déterminée « à nu » (sans aucune étape de fonctionnalisation/piégeage). En l'absence de structure biologique isolante à la surface de l'électrode, la sonde redox s'oxyde ou se réduit facilement. Ce phénomène se traduit sur le diagramme de Nyquist par un demi-cercle de faible diamètre traduisant une faible résistance au transfert de charge suivi d'une droite de diffusion. Après les étapes de fonctionnalisation ou de piégeage cellulaire, la sonde redox va rencontrer plus de difficultés à atteindre la surface active de l'électrode ce qui va se traduire d'une part par une augmentation du diamètre du demi-cercle en raison de l'augmentation de la résistance

au transfert de charge mais aussi par une diminution de la fréquence d'apparition du phénomène de diffusion (droite de Warburg) traduisant une diffusion plus lente.

La sensibilité de piégeage cellulaire de chaque dispositif sera donc déterminée par l'étude des variations moyennes (au minimum 3 puces testées pour une même configuration) du module d'impédance Z mesurées à fréquence fixe par rapport à celle de la couche d'anticorps Z_{AC} ,

$$\Delta Z_{/AC} = Z - Z_{AC}$$

en fonction du logarithme de la concentration cellulaire.

4. Conclusion

S'il est encore impossible de situer les performances de ce dispositif par rapport à celles de la cytométrie de flux classique, il est toutefois évident que ses caractéristiques (simplicité de mise en œuvre et d'utilisation, coût) seront des avantages majeurs pour ouvrir de nouveaux marchés sur des applications encore inexplorées. C'est donc bien le développement d'une technique de test « rapproché » qui est ici recherché. Le comptage cellulaire est un marché en pleine expansion comme le démontrent les politiques d'investissements des sociétés comme Miltényi ou Véridex (Johnson and Johnson). Ce type de dispositifs se positionne dans un secteur aujourd'hui très demandeur et très actif et représente des volumes de marchés conséquents.

Le tri de cellules à partir de suspensions cellulaires hétérogènes est un élément essentiel de la recherche clinique actuelle ainsi que de la recherche fondamentale. L'isolement de sous-populations de cellules constitue un élément essentiel pour la recherche fondamentale en infectiologie. Plus récemment, compte tenu des avancées importantes en biologie des cellules souches, l'isolement de cellules rares est devenu un domaine de recherche en expansion. Les dispositifs miniatures de séparation cellulaire offrent de nombreux avantages par rapport aux techniques classiques de séparation (centrifugation en gradient de densité), tels que l'utilisation de petits volumes, la portabilité, le faible coût, une amélioration des conditions stériles dans lesquelles est effectué le tri ainsi que des possibilités d'intégration avec des techniques d'analyse.

La validation du système est basée sur l'identification des phénotypes CD14+CD16+/CD14+CD16- mais est générique de beaucoup d'autres possibilités. Il pourra être facilement décliné pour la détection de cellules présentant des caractéristiques d'une pathologie donnée ou surexprimés en réaction à une molécule donnée (suivi de traitement). On peut ainsi imaginer envoyer le même échantillon sur plusieurs voies en parallèle ou en série, spécifiques d'autres anticorps et ainsi cribler en parallèle, ou de façon séquentielle ou combinatoire, l'expression de plusieurs marqueurs d'inflammation/infection/pathologies.

Bibliographie

- ¹ Lafleur J.P., Jonsson A., Senkbeil S., Kutter J.P., Recent advances in lab-on-a-chip for biosensing applications, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 76, 213-233.
- ² Temiz Y., Lovchik R.D., Kaigala V., Delamarche E., Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?, *Microelectron. Eng.*, 2015, 132, 156–175.
- ³ Ben-Yoav H., Dykstra P.H., Bentley W.E., Ghodssi R., A controlled microfluidic electrochemical lab-on-a-chip for label-free diffusion-restricted DNA hybridization analysis, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 64, 579–585.
- ⁴ Ozhikandathil J., Balidescu S., Packirisamy M., A portable on-chip assay system for absorbance and plasmonic detection of protein hormone in milk, *J. Dairy Sci.*, 2015, 7, 4384-4391.
- ⁵ Pizziconi V.B., Page D.L., A cell-based immunobiosensor with engineered molecular recognition- Part I: design feasibility, *Biosens. Bioelectron.*, 1997, 12(4), 287-299.
- ⁶ Wang J., “Portable electrochemical systems”, *Trends anal. Chem.*, 2002, 21(4), 226-232.
- ⁷ Marco M-P., Barcelo D., Chapter 22: Fundamentals and applications of biosensors for environmental analysis, *Tech. Instr. Anal. Chem.*, 2000, 21, 1075-1105.
- ⁸ Di Carlo D., Irimia D., Tompkins R.G., Toner M., Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(48), 18892-18897.
- ⁹ Yamada M., Kano K., Tsuda Y., Kobayashi J., Yamato M., Seki M., Okano T., Microfluidic devices for size-dependent separation of liver cells, *Biomed. Microdevices*, 2007, 9(5), 637-645.
- ¹⁰ Pething R., Dielectrophoresis: Status of theory, technology, and applications, *Biomicrofluidics*, 2010, 4, 022811.
- ¹¹ Adams J.D., Thévoz P., Kim U., Bruus H., Soh H. T., Integrated acoustophoretic-magnetophoretic separation device for rapid multi-target cell sorting, *Intern. Conf. On Microtech. In Med. And Biol. (MMB2009)*, Québec City, Canada, April 1-3 2009.
- ¹² Emre N., Vidal J., Boyce C., Wilensky L., Corselli M., Carson C.T., Chapter 16 – Multiparameter Flow Cytometry Applications for Analyzing and Isolating Neural Cell Populations Derived from Human Pluripotent Stem Cells, *Neural Surface Antigens*, 2015, 187-198.
- ¹³ Chang Q., Hedley D., Emerging applications of flow cytometry in solid tumor biology, *Methods*, 2012, 57, 359-367.
- ¹⁴ Bianchetti L., Isgro M., Marini M.A., Bellini A., Schmidt M., Mattoli S., Enumeration of circulating fibrocytes for clinical use in asthma by an optimized single-platform flow cytometry assay, *BBA Clinical*, 2014, 1, 52-58.

- ¹⁵ Xiong H., Pamer E.G., Monocytes and infection: Modulator, messenger and effector, *Immunology*, 2015, 220(2), 210-214.
- ¹⁶ Bieber K., Autenrieth S.E., Insights how monocytes and dendritic cells contribute and regulate immune defense against microbial pathogens, *Immunobiology*, 2015, 220(2), 215-226.
- ¹⁷ Nockher W. A., Scherberich J. E., Expanded CD14+ CD16+ Monocyte Subpopulation in Patients with Acute and Chronic Infections Undergoing Hemodialysis, *Infect. Immun.*, 1998, 66(6), 2782-2790.
- ¹⁸ Rogacev K.S., Cremers B., Zawada A.M., Seiler S., Binder N., Ege P., Große-Dunker G., Heisel I., Hornof F., Jeken J., Rebling N.M., Ulrich C., Scheller B., Böhm M., Fliser D., Heine G.H., "CD14++ CD16++ Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events: A Cohort Study of 951 Patients Referred for Elective Coronary Angiography", *J. Am. Coll. Cardio.*, 2012, 60(16), 1512-1520.
- ¹⁹ Fingerle G., Pforte A., Passlick B., Blumenstein M., Strobel M., The Novel Subset of CD14+/CD16+ Blood Monocytes Is Expanded in Sepsis Patients, *Blood*, 1993, 82(10), 3170-3176.
- ²⁰ Wildgruber M., Lee H., Chudnovskiy A., Yoon T.-J., Etzrodt M., Pittet M. J., Nahrendorf M., Croce K., Libby P., Weissleder R., Swirski F. K., Monocyte Subset Dynamics in Human Atherosclerosis Can Be Profiled with Magnetic Nano-Sensors, *PLoS ONE*, 2009, 4, 5, e5663.
- ²¹ Lambotte O., Taoufik Y., de Goër MG, Wallon C, Goujard C, Delfraissy JF., Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2000, 23(2), 114-119.
- ²² Cargou S., Développement d'outils microfluidiques appliqués à la biologie. Réalisation de dispositifs de tri cellulaire magnétique vertical., *Micro et nanotechnologies / Microélectronique*, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2014, Français.
- ²³ Montrose A., Développement d'un immunocapteur impédimétrique pour la détection et la quantification d'une sous-population cellulaire : Application au diagnostic précoce des infections, Université Paul Sabatier – Toulouse III, 2013, Français.
- ²⁴ Ahmed R., Reifsnider K., Study of Influence of Electrode Geometry on Impedance Spectroscopy, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2011, 6, 1159-1174.
- ²⁵ Fertier L., Cretin M., Rolland M., Durand J.O., Raehm L., Desmet R., Melnyk O., Zimmermann C., Déjous C., Rebière D., Love wave immunosensor for antibody recognition using an innovative semicarbazide surface functionalization, *Sensor. Actuat. B-chem*, 2009, 140(2), 616-622.

Chapitre 3 : Etudes de la sensibilité des microélectrodes

Chapitre 3 : Etudes de la sensibilité des microélectrodes

1. Introduction	76
2. Première génération de dispositif.....	77
2.1. Technologie de microfabrication.....	77
2.1.1. Préparation du substrat.....	77
2.1.2. Photolithographie et structuration des électrodes d'or	78
2.1.3. Métallisation.....	79
2.1.4. Réalisation des canalisations en PDMS	80
2.2. Qualification en mode statique.....	83
2.3. Qualification en mode fluide.....	85
3. Seconde génération de dispositif.....	88
3.1. Technologie de microfabrication.....	88
3.2. Qualification en mode statique.....	89
3.2.1. Tests de spécificité	89
3.2.2. Fonctionnalisation et piégeage cellulaire.....	90
3.3. Qualification en mode fluide.....	94
3.3.1. Modifications technologiques de microfabrication	94
3.3.2. Tests de fonctionnalisation de la SU-8	98
3.3.3. Fonctionnalisation des microélectrodes	99
3.3.4. Piégeage cellulaire.....	100
4. Optimisation du design des microélectrodes Interdigitées	102
4.1. Variation de l'espace inter-électrode.....	103
4.2. Influence du nombre de brins	106
4.2.1. Modifications technologiques	106
4.2.2. Piégeage cellulaire.....	108
5. Conclusion	110
Bibliographie	111

1. Introduction

Contrairement aux électrodes conventionnelles, les microélectrodes possèdent de nombreux avantages comme la réduction du coût de fabrication¹, des densités de courant importantes (faibles courants) en raison de l'amélioration du transport de masse², des constantes temporelles relativement courtes, de faibles chutes ohmiques, ainsi que la possibilité de développer des systèmes portables³. Dues à leurs faibles courants, les microélectrodes présentent des valeurs d'impédance plus élevées que les macroélectrodes⁴, et permettent l'étude d'échantillon de résistivité plus élevée⁵. Par ailleurs, la configuration spatiale des microélectrodes offre la possibilité d'étudier plusieurs applications cellulaires, allant de la différenciation de populations cellulaires⁶ à la détection de cellules uniques⁷.

Cependant, les géométries des électrodes jouent un rôle important sur la distribution des champs électriques dans leurs voisinages et influencent les mesures d'impédance. Cette influence a été démontrée par Wang et al.⁸. En effet, les électrodes parallèles induisent un champ électrique plus uniforme que les autres électrodes avec un maximum localisé près des angles des électrodes ainsi qu'une meilleure sensibilité de détection cellulaire. Ainsi, la géométrie des microélectrodes est un paramètre important dans les mesures impédimétriques (influence sur la sensibilité de détection^{9,10} de chaque dispositif) et son optimisation représente un facteur clé pour de nombreuses analyses cellulaires, comme le démontre plusieurs travaux^{11,12}.

Les tests effectués précédemment avec différentes surfaces de macroélectrodes (1 – 0,5 - 0,04 cm²) ont démontré une forte augmentation de la sensibilité de détection avec la diminution de la surface active des électrodes (amélioration de 90% due à la variation du module d'impédance avec des électrodes de 0,04 cm² par rapport aux électrodes de 1 cm²) sans aucune perturbation liée au bruit¹³. Ces premiers résultats sont cohérents avec l'idée que la sensibilité de détection ne cesserait de s'améliorer en continuant de diminuer la surface active, jusqu'à avoisiner une taille relativement proche du diamètre cellulaire étudié. Pour cette raison, l'électrode de travail ainsi que la contre-électrode vont être miniaturisées au maximum, par utilisation de procédés classiques de micro-fabrication en salle blanche, axés sur la photolithographie et le lift-off.

Cette étude porte donc dans un premier temps sur l'optimisation du design des microélectrodes, et dans un second temps sur l'étude de l'impact de l'écoulement microfluidique sur les performances de la mesure.

2. Première génération de dispositif

Les premiers dispositifs microfluidiques réalisés sont constitués de microélectrodes d'or (électrode de travail (WE) et contre-électrode (CE)) déposées sur support silicium sur lesquels sont reportés des puces en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) comprenant les canalisations (Figure III-1-A). Trois géométries de microélectrodes d'or ont été réalisées dans un premier temps (Figure III-1-B) :

- les électrodes dites « simples », composées d'une électrode de travail et d'une contre-électrode,
- les électrodes dites « multiples », composées de 5 électrodes de travail reliées entre-elles et d'une contre-électrode commune,
- les électrodes dites « interdigitées », composées d'une alternance d'électrodes de travail et de contre-électrodes.

Afin de qualifier ces électrodes, les mesures ont dans un premier temps été réalisées en mode statique pour effectuer des mesures sans écoulement, avant adaptation de canaux microfluidiques.

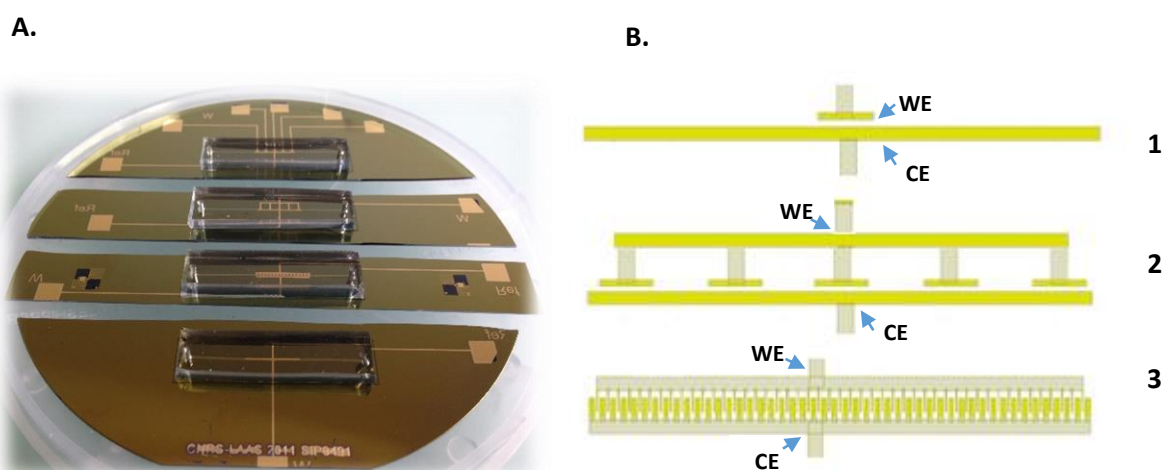


Figure III-1 : A-Dispositif de microélectrodes avec puces PDMS sur wafer en silicium, B-Représentation schématique des différentes géométries de microélectrodes, 1-Simples, 2-Multiples, 3-Interdigitées

2.1. Technologie de microfabrication

2.1.1. Préparation du substrat

Le substrat de silicium (type P, 8-12 Ω/cm) est nettoyé dans un bain d'acide sulfurique et d'eau oxygénée pour éliminer toute trace organique en surface du silicium. Une fine couche d'oxyde est alors créée. Le wafer de silicium est ensuite rincé à l'eau désionisée (EDI) et séché à l'azote avant de subir une attaque chimique dans une solution d'acide fluorhydrique à 10 %

pendant 30 secondes afin d'enlever la couche d'oxyde. Après rinçage et séchage à l'azote, une couche de nitrure de silicium de 80 nm est déposée à haute température par LPCVD (Low-Pressure Chemical Vapor Deposition) pour isoler électriquement les électrodes de la surface du substrat.

La résine étant sensible à l'humidité, le wafer recouvert d'une couche de nitrure est nettoyé puis soigneusement déshydraté pour l'étape de photolithographie du procédé lift-off. Le substrat subit ensuite un traitement de surface à l'HexaMéthylDiSiloxane (HMDS) afin d'améliorer l'adhérence de la résine photosensible.

2.1.2. Photolithographie et structuration des électrodes d'or

La structuration des électrodes en or est réalisée suivant le procédé de photolithographie « lift off ». La photolithographie consiste à recouvrir le substrat avec une résine photosensible puis, par insolation de la résine à travers le masque contenant les motifs, à transférer ce motif sur le substrat. Le masque est constitué d'une plaque de verre ou de quartz métallisée au chrome sur laquelle est dessiné le motif des éléments à transférer dans les dimensions réelles. Ces motifs sont soit transparents soit opaques, en fonction de la nature de l'étape, de l'élimination ou du dépôt d'un matériau, et de la polarité de la résine.

L'élimination de la résine se fait grâce à des solvants appelés développeurs et/ou révélateurs. La solubilité de la résine dans les développeurs varie suivant la polarité de la résine. Pour une résine positive, les parties insolées sont dégradées et dissoutes dans le révélateur. Dans le cas d'une résine négative, la résine polymérise et réticule à la lumière et les parties insolées sont insolubles dans le révélateur. Il existe également des résines réversibles qui se comportent soit comme une résine positive soit comme une résine négative. Après

La photolithographie peut être réalisée aussi bien pour la définition des motifs de l'électrode que pour la définition de la couche de passivation qui définit les zones actives de l'électrode. La structuration des microélectrodes est le plus souvent réalisée par lift-off. Ce procédé se décompose en trois phases principales, comme présenté par la figure III-2 : la définition des motifs des électrodes sur la résine par photolithographie, la métallisation du substrat sur toute sa surface et la révélation des motifs de l'électrode par élimination de la résine sous-jacente au métal. La disparition du métal sur les zones où la résine est présente sur le substrat permet ainsi la structuration des électrodes.

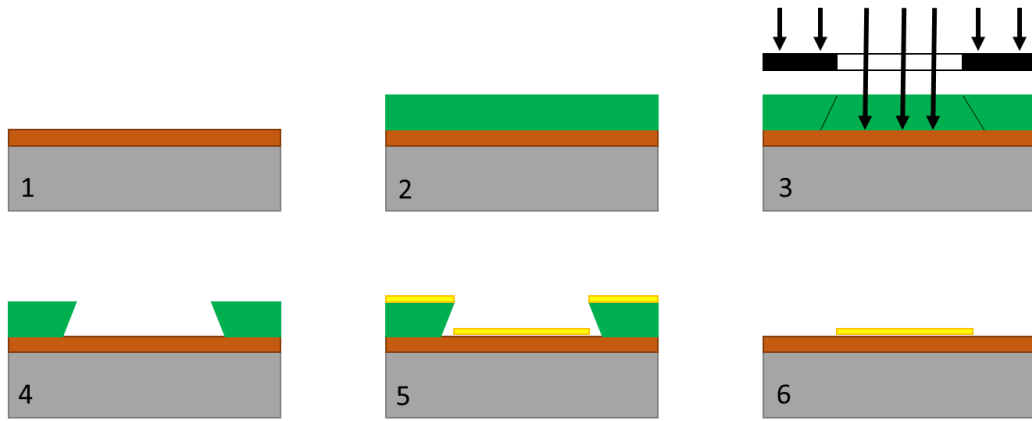


Figure III-2 : Etapes technologiques du procédé lift-off : 1-Substrat recouvert d'une couche d'oxyde, 2-Dépôt puis recuit d'une résine photosensible positive, 3-Insolation de la résine photosensible à travers le masque et impression du motif, 4-Révélation de la résine et apparition du profil du motif, 5-Métallisation, 6-Suppression de la résine et obtention du motif désiré

Pour les microélectrodes de première génération, le dépôt de la résine photosensible AZ Nlof 2035 a été réalisé à la tournette à une vitesse et un temps définis (vitesse : 5000 tr/min ; accélération : 500 tr/min ; temps : 30 secondes) pour obtenir un film parfaitement adhérent au substrat et d'une épaisseur uniforme de 2,5 μm . L'ensemble est pré-recuit (105°C pendant 60 secondes) afin d'éliminer les solvants, d'améliorer l'adhérence et de supprimer les contraintes. Le masque, définissant les motifs du système d'électrodes, est aligné sur le substrat et la structure est insolée aux UV (puissance : 20 mW/cm² ; temps : 5 secondes). Cette insolation permet de créer une image latente du masque dans la résine. Le substrat est à nouveau recuit (110°C pendant 60 secondes) et la résine est développée à l'aide d'une solution de révélation (MF CD 26 pendant 80 secondes) afin d'éliminer les parties solubles correspondant aux zones non insolées à métalliser. Après rinçage et séchage à l'azote, une autre étape de recuit, le post-recuit, permet d'éliminer les solvants résiduels, d'augmenter l'adhérence et d'accroître la résistance de la résine aux agents chimiques.

2.1.3. Métallisation

Les métaux nobles n'ayant pas de bonnes propriétés d'adhérence avec le silicium sur lequel ils sont déposés, il est nécessaire de déposer préalablement une couche d'accroche de chrome (Cr) ou de titane (Ti). Dans notre cas, une couche d'accroche en Ti de 100 nm d'épaisseur a été déposée par évaporation avant le dépôt de la couche d'or de 800 nm d'épaisseur. Le dépôt métallique présente des discontinuités au niveau des ouvertures de la résine, ce qui facilite l'étape de libération (immersion dans un bain d'acétone du wafer entièrement métallisé) en permettant au solvant d'être en contact avec une grande surface de résine.

Pour la couche de nitrure de silicium, un procédé proche du lift off est réalisé. Pour cela, une première résine photosensible est déposée à l'aide d'une tournette puis l'ensemble est recuit avant l'enduction de la seconde résine photosensible. Le substrat est ensuite recuit

et insolé à travers un deuxième niveau de masque (ouverture des contacts extérieurs et des surfaces actives). Après développement des deux résines, les zones actives et de contact des électrodes sont protégées et les résines sont éliminées des zones devant être passivées. Un dépôt de 200 nm de nitrure de silicium est réalisé en phase vapeur couplée inductivement au plasma (appelé Inductivity Coupled Plasma Chemical Vapor Deposition : ICP-CVD) à 90 °C.

Cette technique de dépôt à basse température présente l'avantage de limiter la diffusion des atomes des différents métaux constituant la couche métallique. De plus, il n'y a pas de gravure chimique susceptible d'altérer la surface des électrodes, puisqu'une étape d'élimination de la résine dans différents solvants permet de libérer les zones actives et de contact de la couche de nitrure. Cette étape de libération est très longue et est répétée jusqu'à ce que toute la résine ait disparue des ouvertures.

Enfin, le wafer est découpé à l'aide d'un stylo diamant de manière à individualiser chaque système d'électrodes. Les trois géométries décrites précédemment sont réalisées selon cette technologie. Leurs dimensions sont données de façon synthétique dans le tableau ci-dessous.

	ELECTRODE DE TRAVAIL				CONTRE - ELECTRODE		
Géométrie	Nombre	Longueur (mm)	Largeur (μm)	Surface totale(mm^2)	Nombre	Longueur (mm)	Largeur (μm)
Simple	1	1	125	0,125	1	10	250
Multiple	5	1	125	0,625	1	10	250
Interdigitée	47	0,4	20	0,376	48	0,4	100

Tableau III-1 : Caractéristiques des trois géométries de microélectrodes

En spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE), le bruit mesuré augmentant avec la diminution de la taille de l'électrode, il est important que la contre-électrode soit plus grande que l'électrode de travail car deux électrodes équivalentes modifient le signal. Ces déviations peuvent être limitées en optimisant le design et la géométrie des microélectrodes.

A partir de ce wafer métallisé définissant les différentes géométries de microélectrodes, une première série de mesures en mode statique peut être réalisée. Par ailleurs, des canalisations en PDMS peuvent être intégrées au système afin de réaliser des mesures en mode fluide.

2.1.4. Réalisation des canalisations en PDMS

Ce polymère biocompatible à bas coût présente de nombreux avantages tels que la transparence optique, l'hydrophobie ou encore l'élasticité, ce qui explique sa forte utilisation dans la fabrication de microsystèmes¹⁴.

La canalisation est composée d'une entrée et d'une sortie et est délimitée par deux cadres. Le premier cadre sert de repère pour l'alignement à posteriori de la canalisation sur les électrodes et le second a pour but de faciliter la découpe manuelle des canalisations de 500 μm de large et 3 cm de long. Deux niveaux de masques ont été nécessaires : l'un correspondant aux canalisations et au cadre de découpe et l'autre définissant le cadre d'alignement.

La méthode générale de fabrication des microsystèmes en PDMS consiste à réaliser à partir du masque des canalisations, un moule en SU-8 sur lequel le PDMS est versé et réticulé. Après l'étape de nettoyage et de traitement de surface à l'HMDS, un substrat en silicium est enduit de SU-8 et précuit. L'étape de précuit est suivie du détournage, dont le but est d'enlever le surplus de résine au bord du substrat pour éviter la déformation du motif par diffraction lors de l'insolation. Après l'insolation de la résine au travers du masque (1^{er} niveau de masque), le substrat est recuit et développé. Ainsi, la résine qui n'a pas été exposée aux ultraviolets, est éliminée et il ne reste sur le substrat de silicium que le motif des canalisations d'épaisseur 50 μm ¹³.

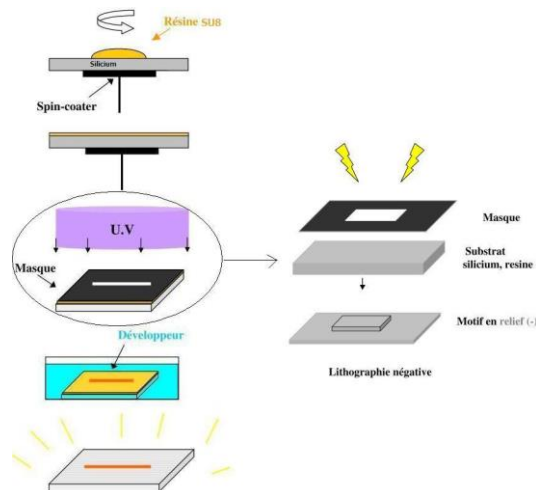


Figure III-3 : Schéma du principe de fabrication du moule en SU-8

Le moule en SU-8 obtenu subit un traitement à l'HMDS qui facilite le démoulage du PDMS. Le moule est réutilisable plusieurs fois et permet la fabrication d'un grand nombre de canalisations. L'étape de moulage consiste dans un premier temps à préparer le PDMS qui est un fluide visqueux à température ambiante. Il est obtenu par mélange d'un élastomère de silicone, le PDMS Sylgard 184, avec un agent réticulant dans les proportions 10:1. Le mélange est dégazé avant d'être versé sur le moule en SU-8 et chauffé à 90°C pendant 30 min. Le PDMS réticulé est ensuite démoulé, les canalisations découpées et les entrées et sorties des canalisations percées pour permettre l'injection des fluides lors des futures expériences¹³.

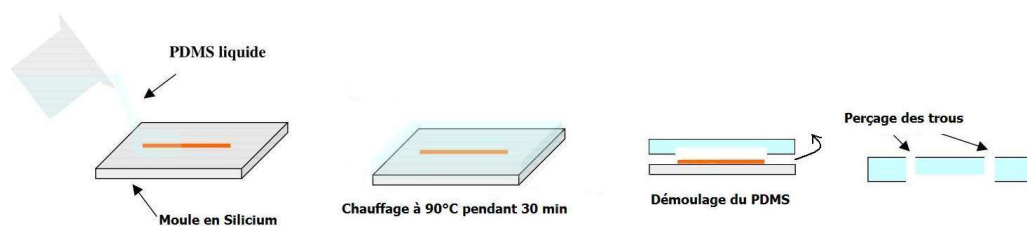


Figure III-4 : Schéma de l'étape de moulage des canalisations en PDMS

A ce stade, les deux parties constituant le dispositif microfluidique sont fabriquées et peuvent être assemblées. L'une des premières étapes de l'assemblage consiste à structurer le cadre facilitant l'alignement sur le substrat contenant les systèmes d'électrodes. Une photolithographie de la résine SU-8 d'épaisseur 50 μm est réalisée à l'aide du 2^{ème} niveau de masque des canalisations. Les électrodes étant sur le substrat, il ne peut être modifié par HMDS et l'adhérence de la résine sur le substrat n'est pas optimale. Le substrat des électrodes est ensuite découpé à l'aide d'un stylo diamant.

Après nettoyage des deux parties à l'isopropanol et séchage à l'azote, elles sont traitées au plasma O_2 avec un débit de 1000 mL/min de O_2 et une puissance de 200 W pendant 30 s et collées par simple contact suite à un alignement visuel dans le cadre d'alignement. Ce traitement de surface est très utilisé lors des assemblages du PDMS et de divers matériaux tels que le verre, le silicium et ses oxydes, le nitrure de silicium, le quartz, le carbone vitreux et le polyéthylène¹⁵. Il consiste à oxyder les deux surfaces pour permettre la formation de liaisons covalentes Si-O-Si. Les dispositifs sont ensuite placés dans une étuve à 100 °C pendant 15 minutes pour consolider les liaisons et rendre le collage irréversible¹³.

L'utilisation de ces puces PDMS vont permettre de réaliser les étapes de fonctionnalisation ainsi que de piégeage cellulaire en mode fluidique.

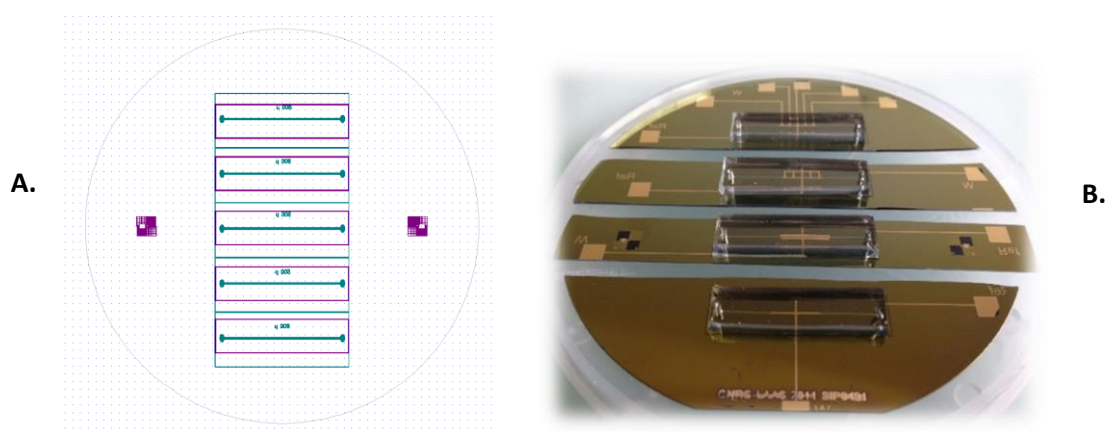


Figure III-5 : A-Masque photolithographique représentant les motifs de la canalisation microfluidique, B- Dépôt des canalisations microfluidiques sur les microélectrodes

2.2. Qualification en mode statique

La fonctionnalisation des trois géométries de microélectrodes par des anticorps CD14 a été réalisée comme décrit dans le chapitre précédent par l'intermédiaire de couches auto-assemblées (SAM) et de protéines d'adhésion permettant une meilleure orientation de l'anticorps. En mode statique, la modification des électrodes est réalisée par l'intermédiaire de gouttes de solutions contenant l'agent modifiant (Figure III-6-A).

Chaque étape du processus de modification a été caractérisée par spectroscopie d'impédance électrochimique. La mesure est réalisée en mode faradique par l'intermédiaire d'une goutte de PBS (pH = 7,4) contenant 5 mM de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1:1) déposée sur chaque microélectrode dans laquelle est immergée l'électrode de référence (ECS) (Figure III-6-B et C), constituant ainsi un système de mesure à trois électrodes (l'électrode de travail ainsi que la contre-électrode étant présentes à la surface du wafer).

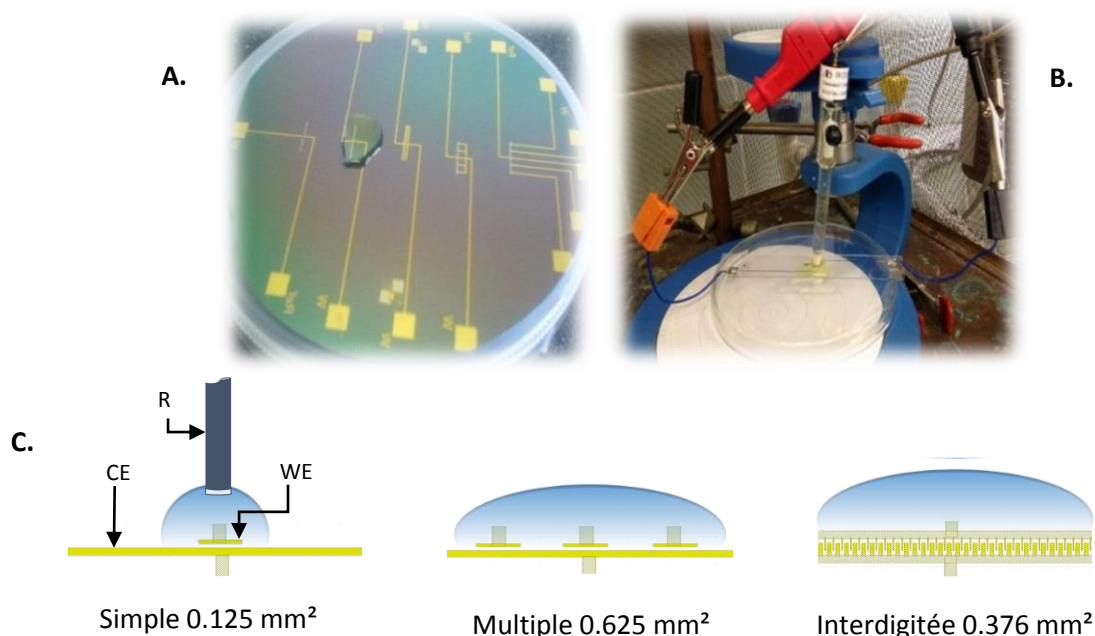


Figure III-6 : A-Photo du wafer silicium avec microélectrode+goutte, B-Système de mesure d'impédance par goutte, C- Représentation schématique du système de mesure statique sur chaque géométrie de microélectrodes

Les résultats correspondant aux géométries multiples et interdigitées sont présentés Figure III-7 sous la forme de diagrammes de Nyquist pour une gamme de fréquences étudiée de 50 kHz à 100 mHz.

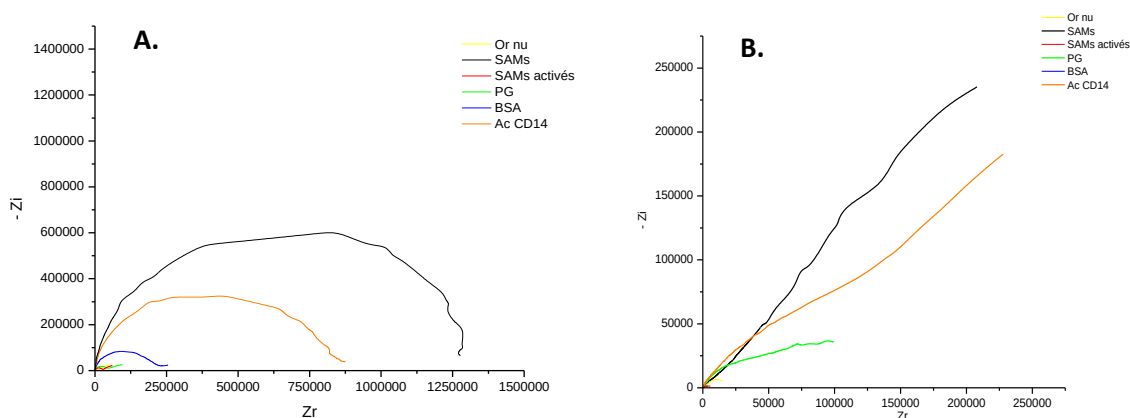


Figure III-7 : Exemples de diagrammes de Nyquist obtenus après fonctionnalisation de microélectrodes, A-multiples et B-interdigitées

Comme constaté sur les différents diagrammes, chaque géométrie présente une réponse impédimétrique différente. Cependant, il est important de noter que chaque étape du protocole de fonctionnalisation présente des caractéristiques particulières et répétables quelle que soit la géométrie de la microélectrode.

La courbe d'électrode d'or nu présente un faible demi-cercle, correspondant à une faible résistance au transfert de charge (R_{tc}), suivi d'une droite de diffusion. L'ajout de SAMs mixtes entraîne une forte augmentation du diamètre du demi-cercle¹⁶. Les SAM forment en effet un film suffisamment homogène et compact pour masquer les imperfections de l'électrode d'or nu, dont en particulier les joints de grain, et passiver l'électrode, empêchant ainsi le transfert d'électrons. De plus, la présence de charges négatives sur les fonctions carboxyliques des thiols exercent une force électrostatique répulsive sur les ions ferri/ferrocyanure de l'électrolyte limitant ainsi leur diffusion dans la couche.

L'activation des SAMs par NHS/ EDC se traduit par une diminution du rayon du demi-cercle de la courbe de Nyquist comparativement à la couche de SAMs. L'activation permet en effet de remplacer les groupements terminaux carboxyliques chargés négativement par des esters de NHS et d'urée de charge neutre ou positive et ainsi de rétablir la diffusion des ions à l'électrode et leur oxydoréduction (diminution de la R_{tc} et augmentation des courants d'oxydation et de réduction).

L'immobilisation de la Protéine G (PG) entraîne à son tour une augmentation du diamètre du demi-cercle, représentatif du caractère isolant de la couche. L'augmentation de la capacité de double couche, comme dans le cas des SAMs, peut s'expliquer par le fait que la PG soit chargée négativement au pH de la solution, avec un point isoélectrique (pI) de 4,8. La diminution de la capacité du film est due, quant à elle, à l'augmentation de l'épaisseur du film (thèse A. Montrose).

L'ajout de la BSA, dont le rôle est de limiter les interactions non spécifiques dans les zones exemptes de PG, entraîne une légère augmentation du diamètre du demi-cercle, limitant un peu plus la diffusion des ions de l'électrolyte.

Finalement, le greffage des anticorps CD14 entraîne une augmentation de l'impédance qui se traduit par une augmentation de la R_{tc} , la capacité du film restant du même ordre de grandeur que pour la couche de PG. L'augmentation de la capacité de double couche est probablement due aux charges négatives portées par les anticorps.

Ces résultats montrent donc bien une modification cohérente de l'impédance (déjà observée sur macroélectrodes) suivant les différentes étapes de fonctionnalisation ce qui valide le processus de fonctionnalisation sur microélectrodes pour le piégeage cellulaire.

2.3. Qualification en mode fluidique

La canalisation microfluidique en PDMS empêchant la fonctionnalisation des microélectrodes par l'intermédiaire de gouttes, la fonctionnalisation est dans ce cas réalisée en faisant circuler dans la canalisation les solutions contenant l'agent modifiant. De la même manière, les mesures impédimétriques sont réalisées en faisant circuler dans la canalisation l'électrolyte contenant la sonde redox. D'autre part, compte tenu de l'impossibilité d'immerger une électrode de référence comme dans le cas des mesures statiques, les mesures impédimétriques sont réalisées avec un système à deux électrodes, une électrode de travail et une pseudo-électrode qui sert à la fois de contre-électrode et de référence. Dans ce cas, à la différence des systèmes électrochimiques à trois électrodes, la polarisation de l'électrode de travail entraîne la présence d'un potentiel indéterminé et peut conduire à des déviations de mesures.

Les canalisations sont alimentées par un contrôleur de pression FLUIGENT® (SA FLUIGENT), appareil permettant d'imposer une pression constante, l'écoulement du fluide étant laminaire dans les microcanaux. Afin d'éviter l'apparition de bulles durant les mesures d'impédance, les conditions opératoires optimales de l'écoulement microfluidique ont été déterminées en étudiant l'influence de la pression d'entrée sur les mesures impédimétriques. Les diagrammes de Nyquist obtenus pour une électrode d'or simple à différentes pressions d'entrée variant entre 40 et 200 mB (avec une pression de sortie P_s égale à la pression atmosphérique P_A) sont présentés Figure III-8.

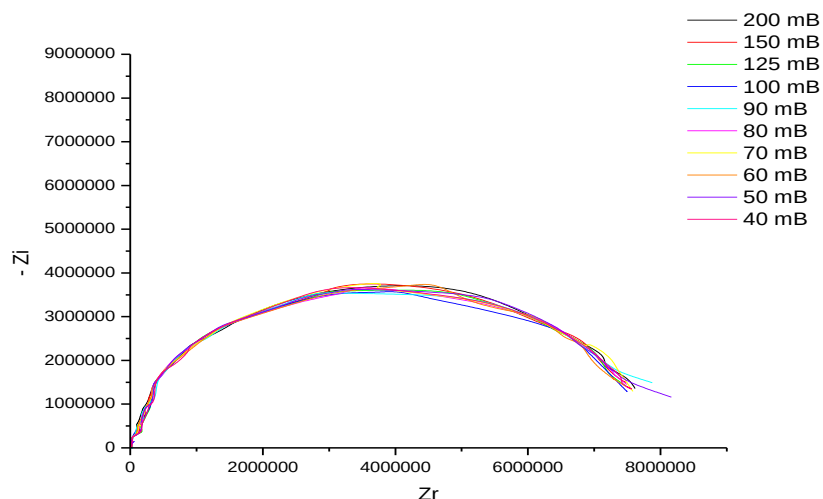


Figure III-8 : Diagrammes de Nyquist obtenus avec une microélectrode d'or simple pour différentes pressions d'entrée

Le diagramme de Nyquist semble varier très peu avec la pression d'entrée appliquée. Cependant afin d'affiner les résultats, les courbes ont été modélisées à l'aide du logiciel FRA en circuit électrique équivalent (CEE) comprenant les éléments suivants :

- R_s : résistance de la solution
- Y_o : capacité de double couche
- n : valeur relative aux imperfections de surface dues à la rugosité, comprise entre 0.5 et 1 ($n=1$ pour une surface lisse)
- R_{tc} : résistance au transfert de charge
- W : constante de Warburg

L'interprétation de ces résultats suppose que le système est pseudo-linéaire en imposant une perturbation très faible. Chaque élément du circuit est lié à une composante de l'interface mais il n'y a pas forcément de correspondance une à une entre les éléments du circuit et les processus physiques du système électrochimique. En effet, l'interprétation des résultats est rarement simple en raison de la présence d'adsorbats, d'intermédiaires et de l'hétérogénéité de la surface.

La valeur des différents composants sont regroupés dans le tableau III-2.

Pression d'entrée (mB)	Rs (kohm)	Yo (F)	n	Rtc (Mohm)
40	43.1	3.36E-08	0.99	7.51
50	7.22	8.44E-10	0.971	7.7
60	91	1.04E-08	0.99	7.5
70	15.23	1.16E-09	0.9647	7.89
80	77.7	2.91E-09	0.9885	7.6
90	5.57	1.01E-10	0.9793	7.7
100	45.5	1.45E-09	0.9712	7.82
125	77.6	2.68E-09	0.958	7.78
150	74.8	1.56E-09	0.9662	7.66
200	35.2	5.80E-09	0.9952	7.55

Tableau III-2 : Variation des paramètres de modélisation suivant la pression d'entrée

Comme attendu, la valeur de R_{tc} dans le circuit de modélisation électrique varie très peu avec la pression d'entrée. Ce paramètre ne présente donc pas d'importance fondamentale vis-à-vis de la mesure d'impédance pour ce type de canalisation. Par conséquent, afin de maintenir des débits relativement faibles, les différentes analyses seront réalisées avec une pression d'entrée de 50 mB.

Un exemple de diagramme de Nyquist (cas d'une microélectrode simple) obtenu dans ces conditions ($\Delta P_{E/S} = 50$ mB, gamme de fréquence 50 kHz-100 mHz) après chaque étape de fonctionnalisation est présenté Figure III-9. L'évolution des courbes est conforme à ce qui avait été enregistré lors de la fonctionnalisation par goutte (ordre de variation des diamètres des demi-cercles semblable). Ces résultats confirment l'efficacité de la fonctionnalisation en mode microfluidique.

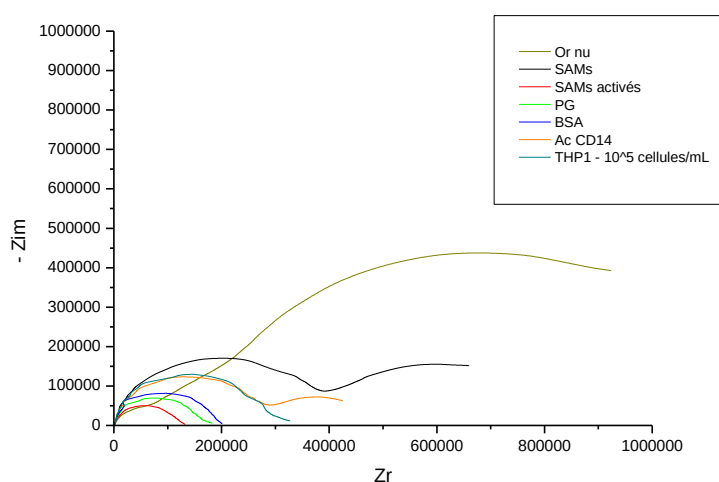


Figure III-9 : Diagramme de Nyquist de fonctionnalisation et de piégeage de THP-1 sur microélectrode simple sur wafer de Silicium possédant une canalisation en PDMS

Cependant, en ce qui concerne le piégeage des cellules, comme le montre la Figure III-9, aucune variation d'impédance significative n'a été enregistrée après deux heures d'incubation d'une suspension contenant 10^5 cellules (monocytes THP-1) par millilitre, comparativement au diagramme obtenu avec les anticorps. Les résistances au transfert de charge sont quasiment les mêmes avant et après passage de la suspension cellulaire. On peut donc conclure que très peu de cellules ont été piégées par ce système.

La quantité de cellules piégées est donc beaucoup trop faible pour induire une variation significative de l'impédance. Des problèmes d'alignement des électrodes sous la canalisation, due à la mauvaise adhérence de la SU-8 et du cadre d'alignement sur le nitrure de silicium pourraient être à l'origine de ces problèmes. La sensibilité de ce type de design et de cette structure fluide n'est donc pas optimale pour le piégeage de sous-populations cellulaires. Une nouvelle approche consistant à réaliser des canaux microfluidiques directement sur les électrodes par photolithographie a été envisagée afin de pallier à ces problèmes d'alignement.

3. Seconde génération de dispositif

Pour cette seconde génération de dispositifs, les microélectrodes d'or ont été réalisées sur des wafers en verre. Le verre présente de nombreux avantages pour les utilisations chimiques ou biologiques des systèmes optiques, comme une haute température active, une constante diélectrique stable, des pertes diélectriques faibles ou encore une faible conductivité thermique. Pour les mesures fluidiques, les canalisations ont été fabriquées directement sur le wafer par photolithographie de résine photosensible SU-8 (les mesures statiques étant réalisées préalablement avant l'ajout de canaux). La circulation des fluides est effectuée au travers de plots PDMS collés à chaque entrée et sortie des canaux.

3.1. Technologie de microfabrication

Comme pour la première génération, la première étape consiste à nettoyer le substrat de verre (acide sulfurique / eau oxygénée) puis à le déshydrater (plasma O_2 / étuve) avant de lui faire subir un traitement de surface à l'HMDS. La structuration des électrodes d'or est faite suivant le procédé de photolithographie « lift off » en utilisant la résine photosensible AZ Nlof 2035 (épaisseur $5\ \mu m$; volume : 3 mL ; vitesse : 1350 tr/min ; accélération : 5000 tr/min ; temps : 30 secondes). L'ensemble est pré-recuit ($110^\circ C$ pendant 90 secondes) afin d'éliminer les solvants, d'améliorer l'adhérence et de supprimer les contraintes.

Le substrat contenant les motifs du masque est ensuite entièrement recouvert d'une couche de Titane-Or (50/200 nm) par évaporation. Une sous-couche de titane (Ti) est nécessaire, en raison des mauvaises propriétés d'adhérence de l'or sur les substrats en verre.

Les étapes classiques de la photolithographie décrites précédemment ont été utilisées pour recouvrir le wafer d'une couche de 5 μm de résine SU-8 afin d'isoler les contacts électriques ainsi que les différentes géométries (volume : 4 mL ; vitesse : 350 tr/min ; accélération : 300 tr/min ; temps : 10 secondes puis, vitesse : 3500 tr/min ; accélération : 3500 tr/min ; temps : 30 secondes). Les dernières traces de résines non insolées sont éliminées par plasma O_2 (200 W pendant 2 min). Le wafer est ensuite recouvert d'une résine photosensible de protection et découpé à l'aide d'un stylo diamant.

Le wafer en verre, présenté Figure III-10, reprend les mêmes structures de microélectrodes que le wafer en silicium, à savoir trois géométries de microélectrodes différentes : simples, multiples et interdigitées.

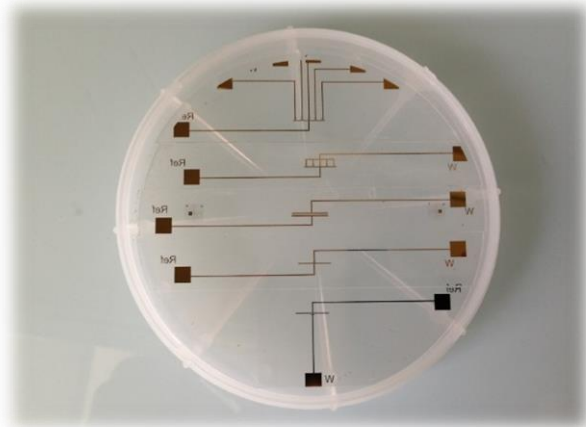


Figure III-10 : Différentes géométries de microélectrodes étudiées sur wafer verre en mode statique

Comme dans le cas précédent, les microélectrodes ont dans un premier temps été caractérisées en mode statique par un système à trois électrodes. Dans ce cas, des tests de spécificité ont préalablement été réalisés afin de vérifier la non adhérence des cellules aux électrodes en l'absence de fonctionnalisation par les anticorps spécifiques.

3.2. Qualification en mode statique

3.2.1. Tests de spécificité

Ces tests sont réalisés sur microélectrodes d'or nu après incubation pendant 4 heures de suspensions cellulaires de concentration variant de 10^3 à 10^5 THP-1/mL déposées sous forme de goutte. La présence des cellules a été mesurée, comme précédemment par SIE en mode faradique à l'aide d'une goutte d'électrolyte de 200 μL déposée sur les microélectrodes. Les diagrammes de Nyquist correspondants enregistrés pour une gamme de fréquence 50 kHz à 100 mHz sont présentés Figure III-11.

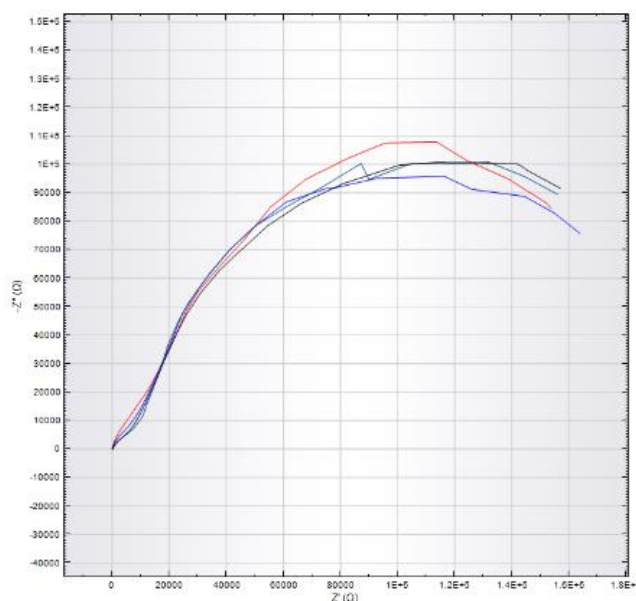


Figure III-11 : Variation de l'impédance en mode faradique de microélectrodes d'or nues (courbe bleue) après incubation en présence de suspensions cellulaires de 10^3 cellules/mL (noir), 10^4 cellules/mL (cyan) et 10^5 cellules/mL (rouge)

Comme démontré par ce diagramme, les variations de diamètre des demi-cercles des différentes concentrations, caractéristiques de l'accroche cellulaire, sont très faibles, voire nulles par rapport l'or nu. L'absence de cette augmentation d'impédance en fonction de la concentration cellulaire croissante, indique que très peu de cellules ont été piégées de manière stable sur la surface d'or nue.

La fonctionnalisation précédemment décrite est donc nécessaire au piégeage de THP-1. De plus, cette étude montre bien que chaque augmentation d'impédance enregistrée après passage d'une suspension cellulaire, sera bien caractéristique des cellules greffées sur la structure fonctionnalisée et non le résultat de piégeage non spécifique (directement sur l'or par exemple).

3.2.2. Fonctionnalisation et piégeage cellulaire

Les diagrammes de Nyquist obtenus après chaque étape de fonctionnalisation de la surface sont présentés Figure III-12 pour chacune des géométries. Quelle que soit la géométrie de l'électrode, l'évolution des courbes est conforme à ce qui avait été enregistré dans le cas des microélectrodes réalisées sur wafer de silicium confirmant la présence de l'anticorps CD14 à leur surface. La courbe d'électrode d'or nu présente un faible demi-cercle, correspondant à une faible résistance au transfert de charge, suivi d'une droite de diffusion. Les SAMs mixtes forment un film compact pour passiver l'électrode d'or, empêchant ainsi le transfert d'électrons, et se traduisant par une forte augmentation du demi-cercle. La suppression de la répulsion des charges par ajout de NHS/EDC réduit le demi-cercle, qui augmente de nouveau avec l'ajout de la PG, de la BSA et des anticorps CD14.

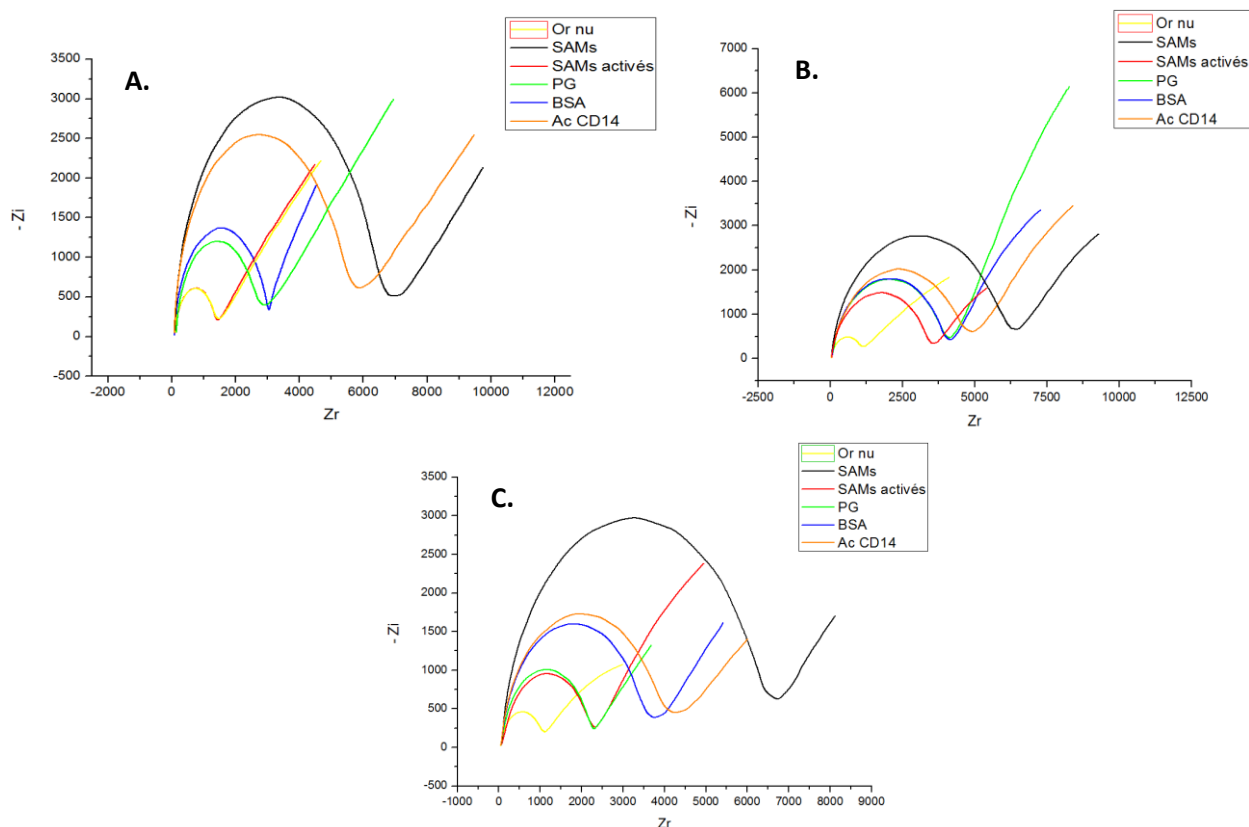


Figure III-12 : Exemples de diagrammes de Nyquist obtenus en mode faradique ($\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ 5mM) après chaque étape de fonctionnalisation sur microélectrodes d'or en mode statique, A-Simples, B-Multiples, C-Interdigitées

Les électrodes ont ensuite été testées pour leur capacité à piéger des monocytes. Les électrodes ont alors été incubées deux heures en présence de suspensions cellulaires de différentes concentrations variant entre 10^3 à 10^9 cellules/mL appliquées sous forme de gouttes. A la fin de ce temps, l'électrode de référence est immergée dans la goutte afin de réaliser les mesures impédimétriques. Les diagrammes de Nyquist enregistrés pour chaque concentration sont regroupés Figure III-13-A. Ces diagrammes mettent logiquement en évidence une augmentation du demi-cercle, avec la concentration de la suspension (en raison du caractère isolant de la membrane cellulaire) et donc du nombre de cellules piégées. Comme le montre les diagrammes de Bode enregistrés, pour chaque géométrie, avant et après piégeage de cellules, la variation du module de l'impédance est maximale à la fréquence de 100 Hz^{17,18} (Figure III-13-A). Les variations moyennes du module d'impédance mesurées à 100 Hz par rapport à la couche d'anticorps, $\Delta Z_{AC} = Z - Z_{AC}$ en fonction du logarithme de la concentration cellulaire sont regroupées pour chacune des géométries Figure III-13-B. Les mesures ont été réalisées pour chaque géométrie sur trois puces différentes pour lesquelles la fonctionnalisation et le piégeage ont été réalisés de manière indépendante. L'impédance mesurée peut être considérée comme la somme des signaux correspondant aux parties libres et recouvertes de l'électrode ce qui signifie que l'impédance est liée au taux de recouvrement. Une surface libre de toute cellule présenterait la plus faible impédance $\Delta Z_{AC}=0$

alors qu'une électrode totalement recouverte de cellules présenterait la plus grande variation d'impédance ΔZ_{AC} max.

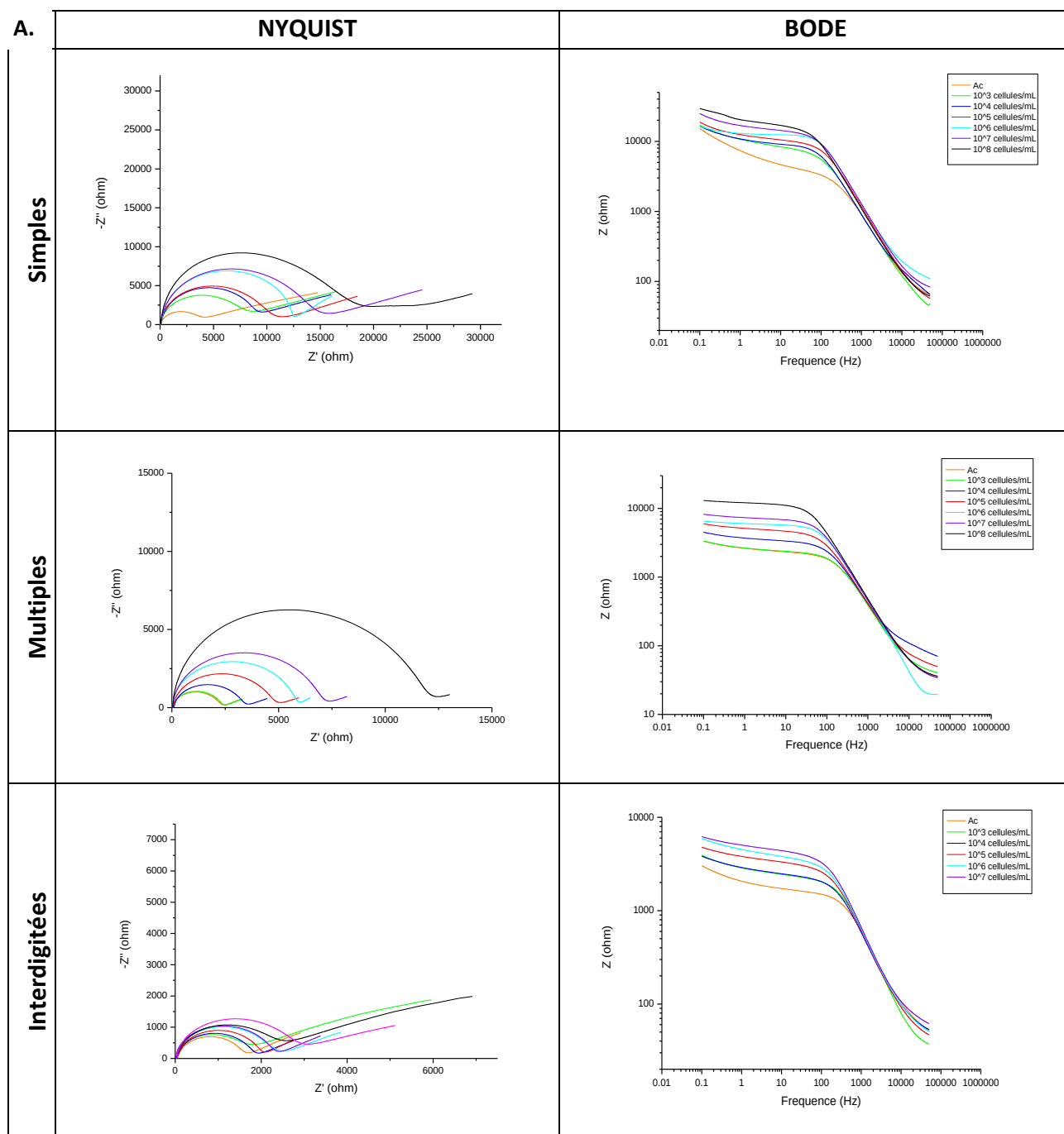


Figure : III-13 : A- Exemples de diagrammes de Nyquist et de Bode obtenus en mode faradique ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5mM dans PBS) après incubation des électrodes en présence de différentes concentrations cellulaires (10^3 à 10^9 cellules/mL) pour les trois géométries étudiées

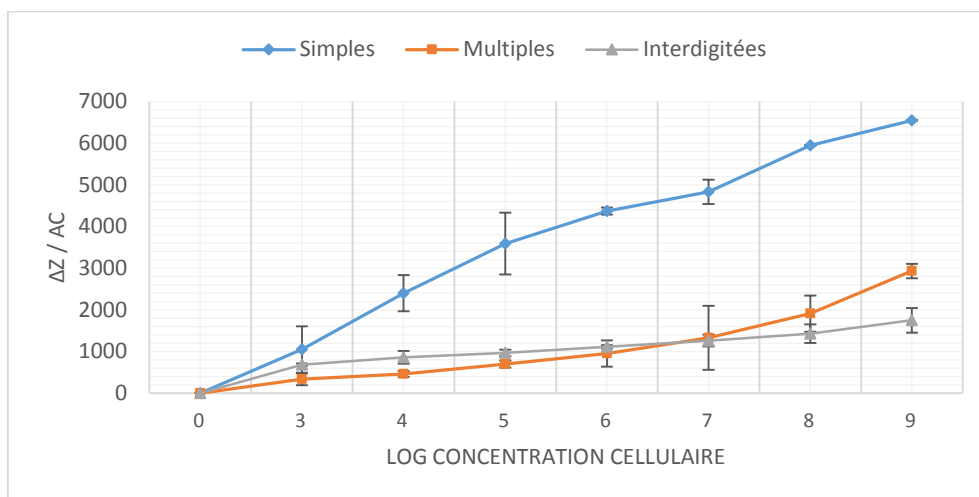


Figure III-13 : B- Variation correspondante du module d'impédance à $f=100\text{Hz}$ en fonction du logarithme de la concentration cellulaire (10^3 à 10^9 cellules/mL)

Dans ces conditions, la meilleure sensibilité a été obtenue avec des électrodes simples notamment dans la gamme 10^3 et 10^5 cellules/mL (environ $1400 \Omega / \text{unité}$). Ce résultat est cohérent avec une diminution de la sensibilité lorsque la surface de l'électrode augmente ($0,125 \text{ mm}^2$ pour les simples, $0,376 \text{ mm}^2$ pour les interdigitées, $0,625 \text{ mm}^2$ pour les multiples). Le graphique démontre clairement différents profils de sensibilité en fonction de la géométrie ; l'impédance pour les électrodes ayant les plus petites surface semble saturer comme si elles étaient totalement recouvertes, alors que pour des surfaces plus grandes, l'impédance augmente de façon exponentielle avec la concentration cellulaire. La différence entre les électrodes simples et multiples s'explique facilement par le fait que les électrodes multiples correspondent à des électrodes simples en parallèle, et dans ce cas l'impédance totale est donnée par $1/Z = \sum (1/Z_i)$. L'impédance des électrodes multiples correspond alors à $Z_{\text{simple}}/5$.

En outre, on peut noter que les impédances enregistrées avec les électrodes interdigitées sont plus faibles que pour les autres types d'électrodes. Ce résultat pourrait s'expliquer par le recouvrement des couches de diffusion de chaque électrode¹⁹, conduisant à une amplification du courant et donc une diminution de l'impédance : une espèce réduite à l'électrode de travail sera rapidement ré-oxydée à la contre-électrode voisine. On passe dans ce cas-ci à un régime pseudo-stationnaire, et la droite de Warburg²⁰ obtenue dans le cas des autres géométries est remplacée par une boucle de lemniscate^{21, 22} (apparition d'un deuxième demi-cercle).

Cependant ce système de piégeage par l'intermédiaire de gouttes de suspension cellulaire n'est pas optimal puisque dans ce cas le piégeage se fait uniquement par sédimentation et diffusion des cellules. Un grand nombre de cellules risque donc de ne jamais avoisiner les anticorps greffés et ainsi être détecté par mesures d'impédance. En prenant en compte le diamètre d'une goutte (environ 3 mm pour $200 \mu\text{L}$ d'électrolyte), et pour la cellule une vitesse de sédimentation d'environ 1.10^{-6} m/s , la probabilité pour qu'une cellule atteigne la surface fonctionnalisée reste très faible. Le nombre de cellules pouvant être piégées sur une

microélectrode simple est ainsi estimé à 600 cellules pour une goutte comprenant 10^6 cellules/mL (1000 cellules au maximum pouvant être piégées). Comme la variation d'impédance est corrélée au taux de couverture de la surface, cette estimation pourrait expliquer le phénomène de saturation observé seulement au-delà de 10^6 cellules dans le cas des microélectrodes simples.

C'est pourquoi, afin de favoriser les échanges anticorps-cellules, des canalisations en SU-8 ont été incorporées sur chaque géométrie de microélectrodes.

3.3. Qualification en mode fluide

3.3.1. Modifications technologiques de microfabrication

Afin de s'affranchir des problèmes liés à l'utilisation de puces PDMS, les canaux microfluidiques sont fabriqués en SU-8 dans ce nouveau dispositif (cf. § 2.1). Ce procédé a l'avantage de diminuer le temps de fabrication en salle blanche et d'éviter les problèmes d'alignement des microcanaux sur la surface active des microélectrodes d'or.

Les trois étapes photolithographiques nécessaires à l'incorporation de ces canalisations microfluidiques en SU-8, sont totalement compatibles avec le protocole décrit précédemment pour la réalisation des microélectrodes sur verre sans canalisation. Trois niveaux de masques photolithographiques complémentaires ont donc été réalisés, tout en conservant les trois géométries étudiées (simples, multiples et interdigitées), comme le démontre le schéma de la figure III-14. Un premier niveau de 5 μm de SU-8 permet d'isoler les lignes de contact ainsi que la tranche des microélectrodes. Les deux niveaux suivant permettent de réaliser les canalisations et le capot en SU-8 comprenant les entrées et les sorties de fluide.

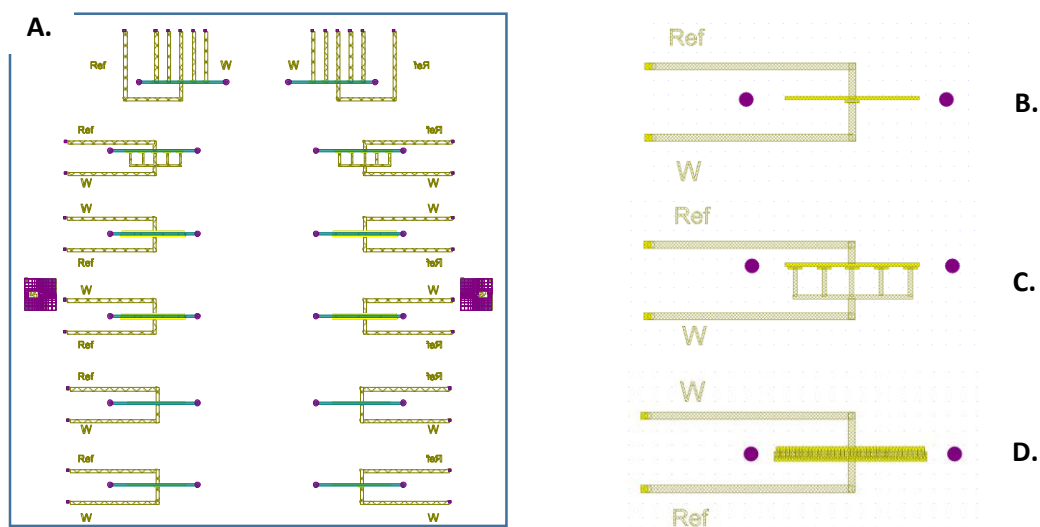
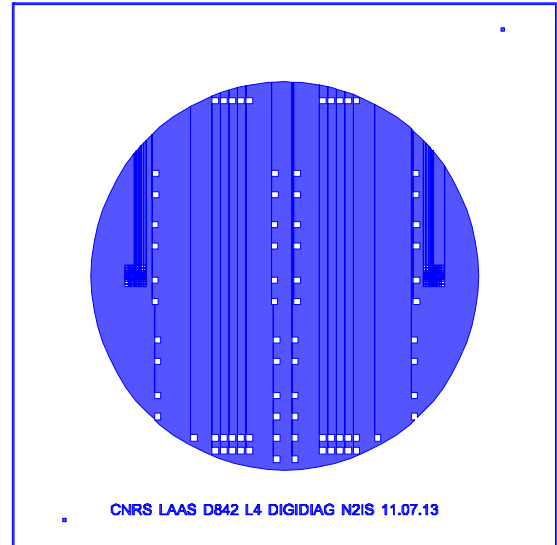


Figure III-14 : A- Niveaux des masques photolithographiques regroupant les différentes géométries de microélectrodes (en jaune : métallisation ; vert : canalisation ; violet : ouverture pour la connectique fluide). B- Simples, C- Multiples, D- Interdigitées

De plus, afin de maximiser le nombre de dispositifs par wafer, la longueur des lignes d'amenée de courant ainsi que l'espace entre l'électrode de travail et la contre-électrode ont été réduites (Simples et Multiples : 80 μm , Interdigitées : 400 μm (espace inter-brins : 50 μm)), afin d'y déposer une canalisation de 450 μm de large. La largeur des canaux ne comprenant seulement que la surface active de chaque géométrie, chaque cellule sera donc en mesure de se greffer à la surface fonctionnalisée. Les étapes de nettoyage du wafer et de métallisation Titane-Or (50/200 nm) sont les mêmes que celles décrites précédemment. Avant le dépôt de la première couche de 5 μm de SU-8 d'isolation des géométries, le wafer subit une recharge électrolytique d'environ 2 μm au niveau des contacts extérieurs pour faciliter les microsoudures des câbles électriques en vue des mesures d'impédance (voir masque ci-contre).



Cette étape complémentaire a été ajoutée au process suite aux problèmes rencontrés lors de l'attache des câbles sur les contacts extérieurs. En effet, dû à la faible épaisseur des contacts et à la température élevée du fer à souder, les pastilles d'or se décollaient de la résine rendant difficile le contact entre les câbles électriques et les différentes géométries de microélectrodes. L'augmentation de l'épaisseur des contacts par recharge électrolytique a donc permis de pallier ce problème de microsoudures. De plus, les ouvertures de résine SU-8 au niveau des contacts électriques extérieurs ont été agrandies afin de permettre une meilleure approche de la pointe du fer à souder.

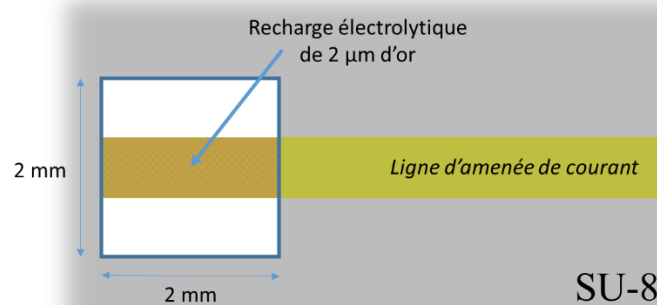


Figure III-15 : Modification technologique des contacts électriques extérieurs

Concernant la fabrication des microcanaux, la démarche technologique générale est donnée sur la figure III-16 : des structures ouvertes sont réalisées à l'aide de résine SU-8 sur un substrat rigide selon une technologie classique, puis un film sec de résine SU-8 non

réticulée est laminé. Le film est alors insolé et réticulé après report, permettant ainsi l'alignement, par photolithographie, des motifs avec les étages inférieurs.

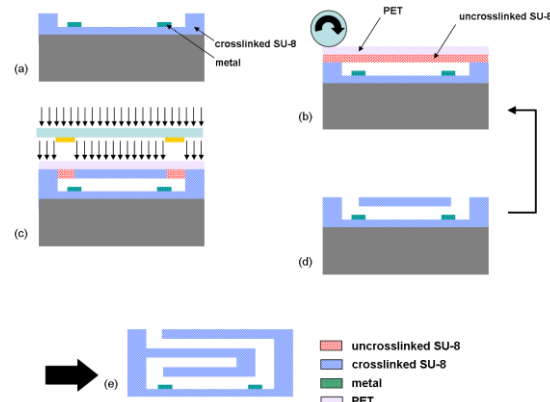


Figure III-16 : Principe de réalisation de structures microfluidiques tout SU-8

Dans notre cas, un dépôt de 100 μm de SU-8 a été réalisé à la tournette à une vitesse et un temps défini pour obtenir un film parfaitement adhérent au substrat verre et d'épaisseur uniforme (volume : 8 mL ; vitesse : 500 tr/min ; accélération : 500 tr/min ; temps : 30 secondes puis, vitesse : 1400 tr/min ; accélération : 5000 tr/min ; temps : 30 secondes). Le wafer a ensuite été insolé par UV après alignement du masque définissant les canalisations, recuit et développé. L'ensemble a ensuite été recouvert par laminage d'un film sec de 25 μm de SU-8 (volume : 4 mL ; vitesse : 350 tr/min ; accélération : 300 tr/min ; temps : 10 secondes puis, vitesse : 3700 tr/min ; accélération : 3000 tr/min ; temps : 30 secondes), préalablement recuit sur un wafer indépendant. Le masque, définissant les ouvertures microfluidiques a ensuite été aligné sur le substrat et la structure insolée sous UV. Après des étapes de recuit et de développement, un hard-bake (dernière phase de recuit à hautes températures, de 140 à 200 $^{\circ}\text{C}$ pendant 20-30 minutes) a été appliqué afin de réduire les contraintes résiduelles.

Afin d'optimiser l'adhérence entre les couches de SU-8 présentant des niveaux de contraintes résiduelles non négligeables, un traitement par plasma O_2 (200 W pendant 2 min) a été effectué entre les couches de 5 μm et 100 μm . Cette opération a été ajoutée suite aux premiers tests de structuration des résines, non concluant car conduisant à l'apparition de fissures et de décollements (Figure III-17).

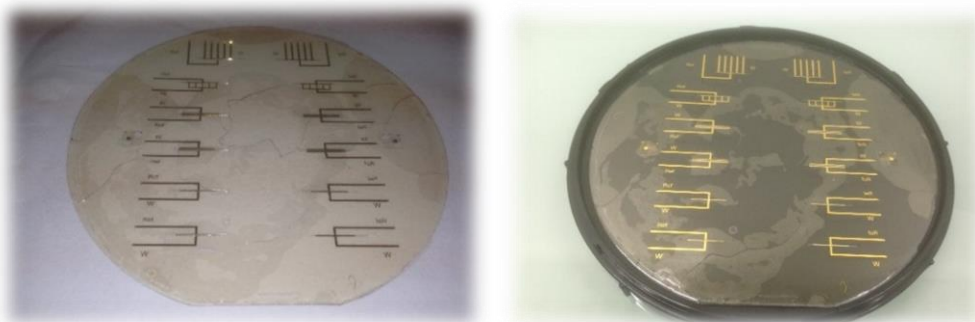


Figure III-17 : Fissures et décollements des résines

Pour exploiter la partie fluide du système, des plots en PDMS sont collés sur chaque entrée/sortie afin d'assurer la connexion fluide avec l'instrumentation extérieure. Après un traitement par plasma O_2 de 15 min, les plots sont reportés sur le wafer et collés à la surface de chaque puce grâce à une colle UV photosensible. Enfin, des fils électriques sont connectés au système par microsoudure sur les contacts extérieurs. Le wafer finalisé est présenté sur la figure III-18.

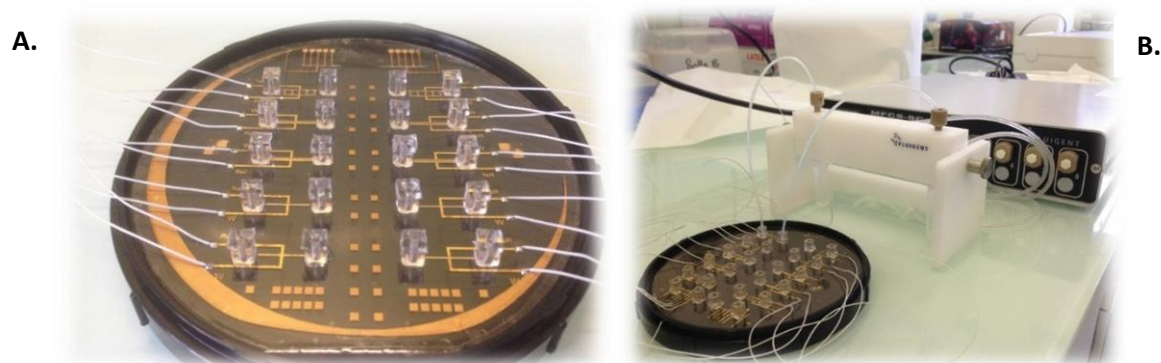


Figure III-18 : A- Wafer verre avec canalisations microfluidiques, plots PDMS et connectiques extérieurs, B- Exploitation du wafer par le FLUIGENT®

Avec ce dispositif, les phénomènes de sédimentation et de piégeage non-spécifique (cellule bloquée non greffée) seront limités par le flux imposé dans les canalisations microfluidiques. De plus, l'ajout de ces canaux a permis de réduire le temps de fonctionnalisation^{23,24,25} à un jour contre quatre en mode statique, sans aucune influence sur les diagrammes enregistrés pour chaque couche de fonctionnalisation. L'ajout de canalisations améliore l'homogénéité des couches et le flux permanent réduit le temps de structuration. Les temps d'incubation de chaque agent modifiant sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Agent modifiant	Temps de fonctionnalisation
SAMs	3 heures
NHS/EDC	30 min
PG	3 heures
BSA	30 min
Anticorps	2 heures

Tableau III-3 : Temps de fonctionnalisation en mode fluide

Néanmoins, à ce stade de l'évolution du design du capteur microfluidique, certains points restent encore à améliorer. C'est par exemple le cas du collage des plots PDMS sur chaque entrée et sortie de canalisations. La colle utilisée peut en effet fluer à l'intérieur de la canalisation, la boucher et ainsi empêcher le passage du fluide sur la surface des microélectrodes. Il est aussi important de noter qu'un plot mal centré sur une ouverture microfluidique, conduit aux mêmes problèmes techniques. Comme nous le verrons ultérieurement, ces problèmes ont été éliminés en utilisant un support mécanique permettant la gestion des flux.

3.3.2. Tests de fonctionnalisation de la SU-8

Afin de s'affranchir de tout soupçon d'accroche des différentes couches de fonctionnalisation (SAMs, PG, BSA, Anticorps) sur la SU-8, résine constituant l'ensemble de la canalisation, le protocole de fonctionnalisation a été appliqué directement sur une surface de SU-8 en l'absence d'or.

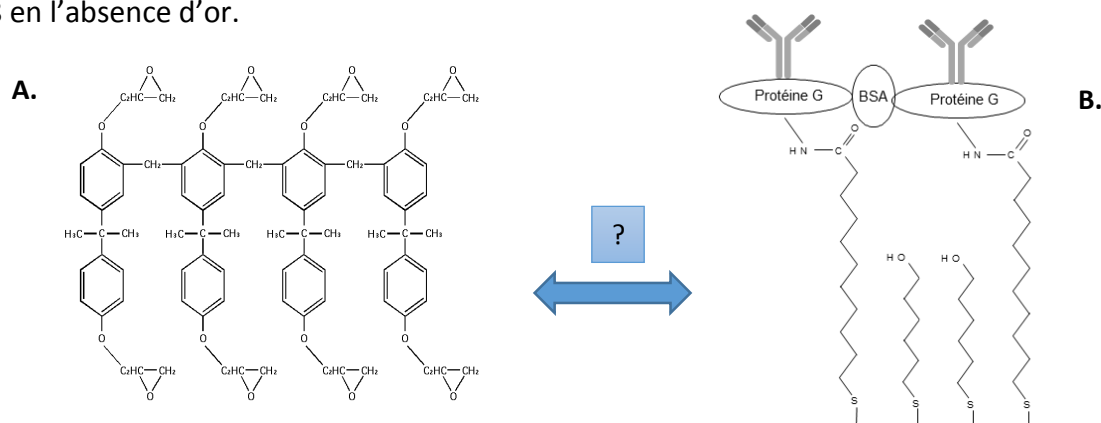


Figure III-19 : Interaction possible entre A-SU-8 et B-Thiols mixtes ?

Les tests de greffage ont été réalisés sur un wafer en verre recouvert d'une couche homogène de 5 μm de SU-8, déposée suivant un protocole classique à la tournette en salle blanche. La présence des anticorps a été évaluée grâce à l'utilisation d'anticorps fluorescents Ac-CD14-FITC. Les images de microscopie à fluorescence (Figure III-20) ne montrent aucune trace d'anticorps immobilisés à la surface de la résine comparativement à ce qui est observé pour des électrodes d'or. Le protocole de fonctionnalisation est donc bien spécifique à l'or.

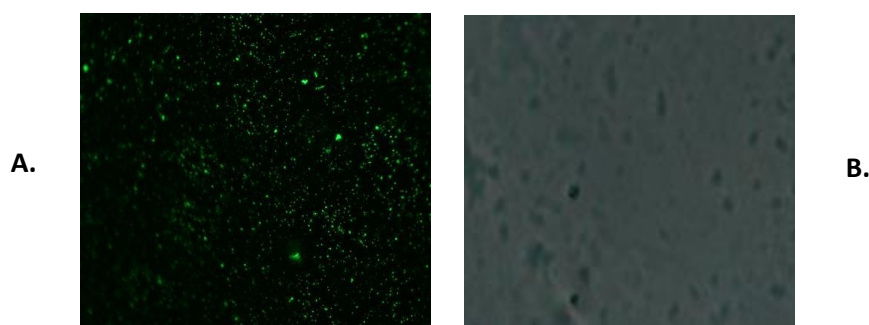


Figure III-20 : Microscopie à fluorescence, greffage d'anticorps fluorescents sur : A- de l'or, B- de la SU-8

Cette étape nous permet de valider que la modification sélective des microélectrodes d'or est possible sans modification préalable des parois des canalisations.

3.3.3. Fonctionnalisation des microélectrodes

Comme précédemment, la fonctionnalisation est effectuée en faisant circuler les agents modifiant dans la canalisation et les mesures d'impédance sont réalisées par un système à deux électrodes sous un flux d'électrolyte (5 mM de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans PBS ; $P_E = 20$ mB, $P_S = P_A$) dans une gamme de fréquences de 50 kHz à 100 mHz. Les diagrammes de Nyquist obtenus après chaque étape de fonctionnalisation sont regroupés dans la Figure III-21 pour chacune des géométries.

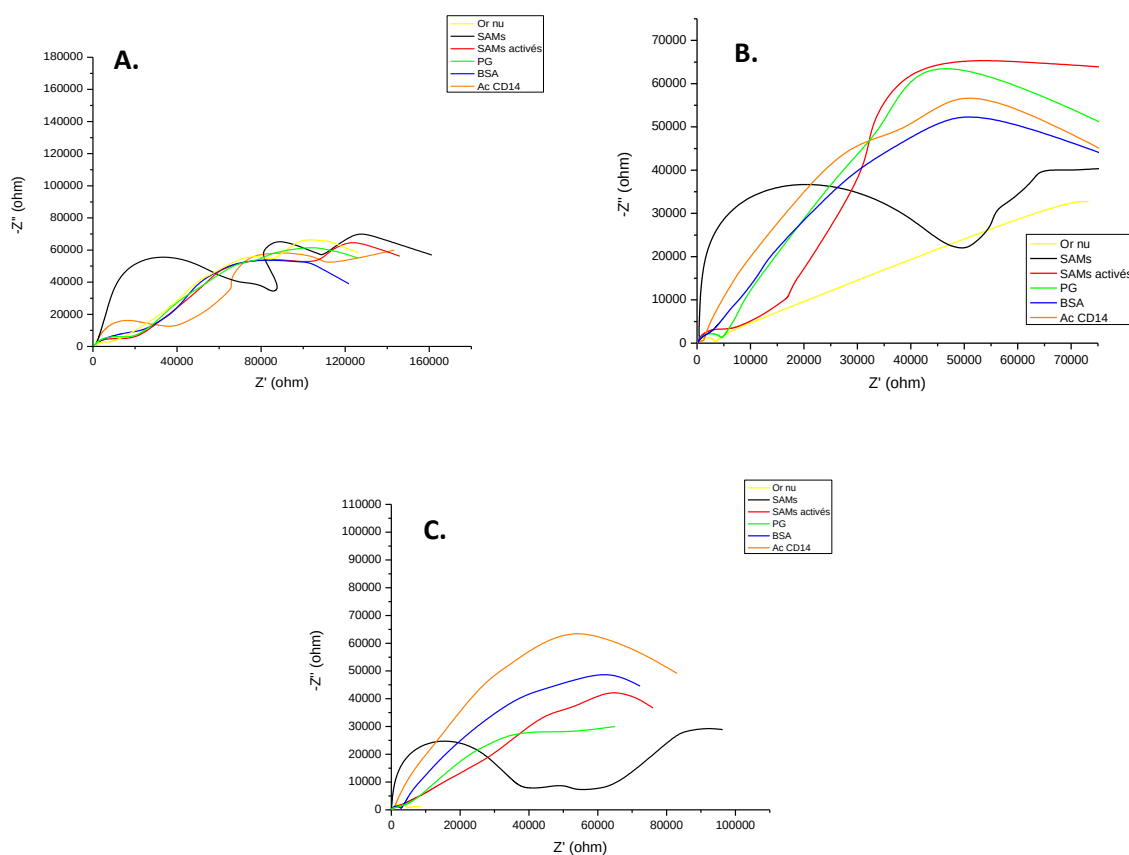
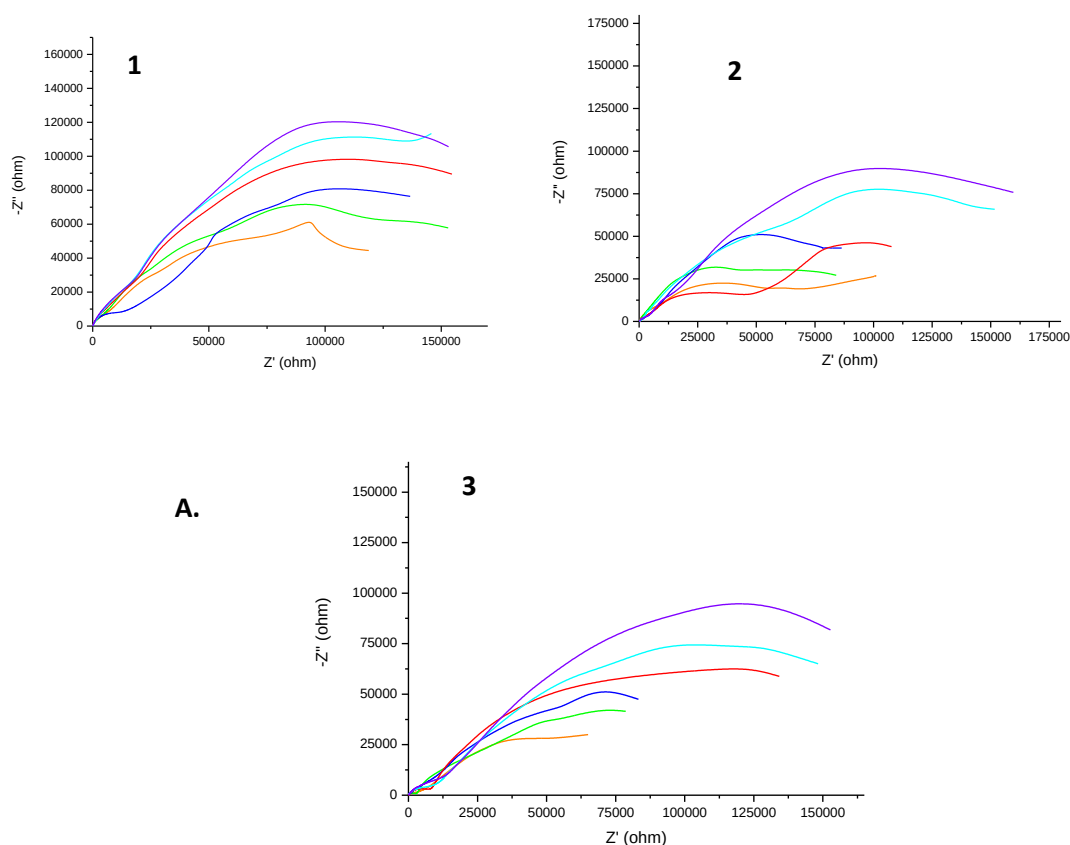


Figure III-21 : Exemples de diagrammes de Nyquist obtenus après chaque étape de fonctionnalisation sur microélectrodes d'or en mode fluide, A-Simples, B-Multiples, C-Interdigitées

Dans ce cas, le passage à la microfluidique a permis de passer en mode stationnaire, et donc d'une diffusion semi-infinie à une diffusion finie type couche de Nernst. Ceci est traduit sur les diagrammes de Nyquist par l'apparition de boucles dissymétriques type lemniscate²⁶ pour l'ensemble des géométries à la place des droites de Warburg représentatives du caractère diffusionnel du mode dynamique engendré par le système statique.

3.3.4. Piégeage cellulaire

Après fonctionnalisation, les dispositifs ont été testés pour le piégeage cellulaire. Dans ce cas, un flux de suspensions cellulaires est maintenu dans la canalisation par application d'une pression relative (entrée/sortie) de 20 mB pendant deux heures. A la fin de ce temps, le flux de cellules est remplacé par un flux d'électrolyte (mode faradique) ce qui permet de rincer les électrodes, d'évacuer les cellules non greffées puis de procéder aux mesures impédimétriques. Différentes concentration cellulaires ont été testées dans la gamme 10^3 à 10^7 cellules/mL. Après chaque mesure à une concentration cellulaire donnée, la couche d'anticorps est régénérée par rinçage au PBS sous une pression plus élevée (environ 100 mB) afin de décoller les cellules. Des exemples de diagrammes de Nyquist obtenus pour chaque géométrie sont présentés Figure III-22-A. Les variations correspondantes du module d'impédance mesurées à 100 Hz en fonction du logarithme de la concentration cellulaire sont regroupées par type de microélectrodes dans le graphique de la Figure III-22-B.



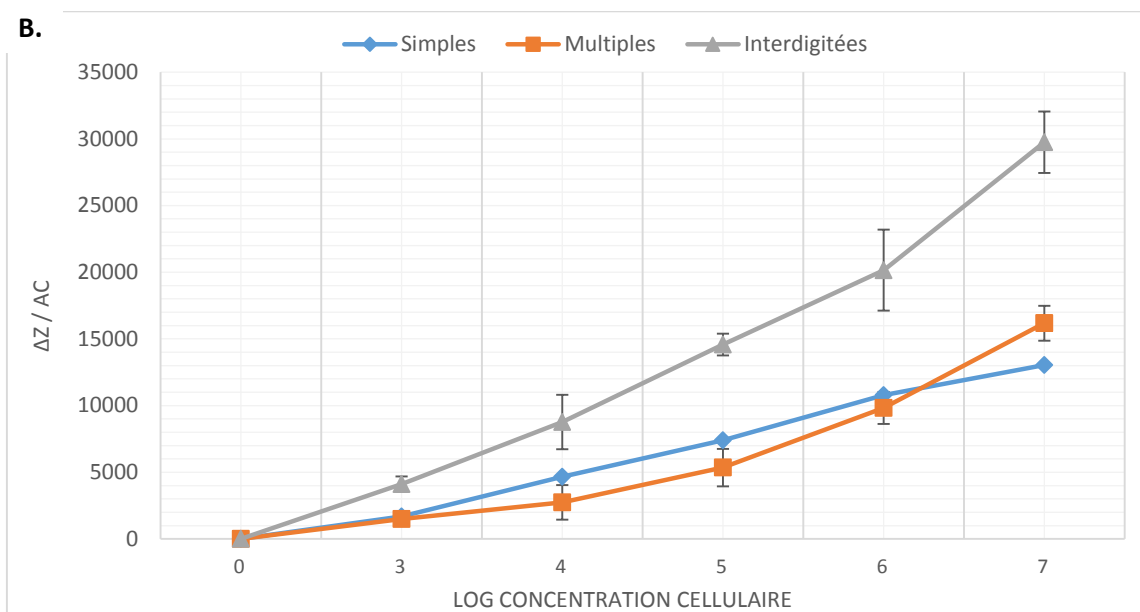


Figure III-22 : A-Exemples de diagrammes de Nyquist (1-Simples 2-Multiples 3-Interdigitées) obtenus en mode faradique après incubation en fluide en présence de suspensions cellulaires dans une gamme de 10^3 à 10^7 cellules/mL, B- Variation correspondante du module d'impédance mesuré à 100Hz en fonction du logarithme de la concentration cellulaire

Comme dans le cas précédent, les diagrammes de Nyquist montrent une augmentation relative de l'impédance avec la concentration cellulaire. Néanmoins, chaque géométrie a sa propre réponse qui diffère de celles relevées en mode statique. En effet, bien que certaines géométries conservent leur comportement (caractère « exponentiel » des multiples et phase de saturation pour les simples) les électrodes interdigitées maximisent leur sensibilité avec l'apport de la microfluidique.

Il est important de noter que l'ajout des canalisations microfluidiques a engendré l'apparition de plusieurs demi-cercles sur les diagrammes de Nyquist. Ceci provient, comme dans le cas de la fonctionnalisation, d'un passage à un régime stationnaire. On note également une augmentation relative de l'impédance. En effet, pour les mêmes concentrations, les variations du module d'impédance ΔZ ont augmenté respectivement d'un facteur 2, 12 et 15 pour les microélectrodes simples, multiples et interdigitées par rapport aux mesures statiques. Ces résultats peuvent provenir d'une part, d'une augmentation de la probabilité de piégeage cellulaire et à une meilleure organisation des couches cellulaires à la surface des électrodes dû à la présence du flux laminaire, et d'autre part, au passage d'un système de mesure de 3 à 2 électrodes. La forte sensibilité enregistrée dans le cas des microélectrodes interdigitées s'explique par la structure même de ces électrodes qui présentent une meilleure répartition dans l'espace de leur surface active (20 fois plus longue qu'une électrode simple). Les monocytes ont donc physiquement une plus grande probabilité d'interagir avec des anticorps greffés à la surface d'une électrode interdigitée que d'une électrode simple. De plus, les cellules piégées sur les bords des brins de l'électrode modifient la conductivité de l'espace inter-électrode impactant les phénomènes d'amplification liés au recouvrement des couches

de diffusion. Ce phénomène conduit à une chute du courant et par conséquent à une forte augmentation de l'impédance. Ce phénomène est d'autant plus important que l'espace entre les électrodes est petit^{27,28,29}, ce qui explique pourquoi ce phénomène n'a pas été observé dans le cas des électrodes simples et multiples présentant un gap de 80 µm contre 50 µm pour les interdigitées.

C'est pourquoi, pour la suite de l'étude visant à obtenir la meilleure sensibilité de détection, nous avons choisi de travailler exclusivement sur les microélectrodes interdigitées.

4. Optimisation du design des microélectrodes Interdigitées

Souvent citées dans la littérature, les microélectrodes interdigitées semblent être la géométrie d'électrodes la plus sensible pour ce type de détection. Cette structure d'électrodes a été largement utilisée pour la détection d'E.coli³⁰, de Salmonella enteritidis³¹ et de plusieurs autres bactéries³². De nombreuses recherches ont été menées avec la méthode impédimétrique classique, portant sur les variations de l'impédance électrique d'un milieu issu de la croissance bactérienne^{33,34}. Les changements d'impédance du milieu sont dus à la libération de métabolites ioniques issus des bactéries vivantes. Certains chercheurs ont mesuré les changements d'impédance à la fois du milieu et des électrodes.

Les microélectrodes interdigitées servent aussi à l'étude du comportement biologique des cellules. Elles permettent d'obtenir de manière rapide un signal statique, une faible chute ohmique du potentiel, et augmentent le rapport signal/bruit. De plus, le régime de diffusion devient hémisphérique et conduit à un régime pseudo-stationnaire. Cette structure géométrique correspond à un ensemble de paires d'électrodes intercalées, où des espèces peuvent s'oxyder sur l'une puis se réduire sur l'autre en raison du recouvrement des couches de diffusion. Ces cycles redox jouent le rôle d'amplificateur de courant comme constaté précédemment et influe fortement sur l'impédance.

Les dimensions des microélectrodes jouent un rôle prépondérant. Plus l'espace inter-électrode sera petit, plus le nombre de cycles redox sera important. Le courant limite peut être calculé à l'état d'équilibre par³⁵ :

$$I_{lim} = 2 m b n F C^* H D \frac{K (1 - p)}{K (p)}$$

Avec $K(p)$ l'intégrale elliptique complète, p le paramètre géométrique d'alignement de l'interdigitée, m le nombre d'électrodes, b la longueur d'électrode, n le nombre d'électrons mise en jeu dans la réaction redox, F la constante de Faraday, C^* la concentration de la molécule redox et D le coefficient de diffusion de la molécule redox.

De manière pratique, une approximation de cette équation est de la forme :

$$I_{lim} = m b n F C^* D \left[0.637 \ln \frac{2.55}{X} - 0.19 X^2 \right]$$

$$X = \frac{g}{l + g}$$

Avec g représentant l'espace inter électrode et l la largeur d'électrode.

Le temps pour atteindre l'état d'équilibre peut aussi être déterminé par :

$$t \text{ (secondes)} = 14 * \frac{(l + g)^2}{D}$$

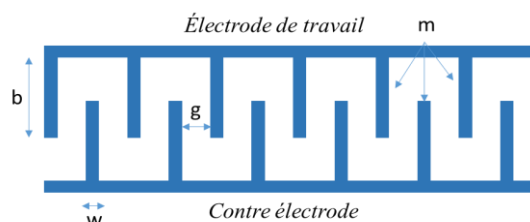


Figure III-23 : Structure d'une microélectrode interdigitée

Afin de faire chuter le plus possible la limite de détection, définie comme étant le nombre minimal de cellules détectables capturées sur la surface du capteur, et de maximiser le SNR (signal-to-noise ratio), le design des microélectrodes interdigitées peut être optimisé^{36,37,38,39}. Il est possible de faire varier différents paramètres comme le nombre d'électrodes, la largeur d'une électrode, l'espacement entre deux électrodes (gap) et la longueur d'une électrode. D'après la littérature, un faible nombre d'électrodes serait préférable à un plus grand nombre d'électrodes de faibles largeurs⁴⁰. De plus, la distribution du champ électrique est uniforme lorsque la largeur et l'espacement entre les électrodes sont égaux. Plus les dimensions des électrodes seront petites, plus il sera simple pour le système de détecter les faibles changements d'impédance aux interfaces.

Pour cela, afin de d'augmenter de manière significative la sensibilité de détection des microélectrodes interdigitées (en dessous de 10^3 cellules/mL), une étude portant sur l'amélioration de leur design a été menée. Deux paramètres importants ont été étudiés : l'espace inter-électrode (le gap) qui comme nous venons de le voir joue un rôle capital vis-à-vis de la sensibilité mais également la surface active de ce type de microélectrodes (nombre de brins).

4.1. Variation de l'espace inter-électrode

Couniot *et al.*⁴¹ ont démontré en étudiant la détection de bactéries par spectroscopie d'impédance toute l'importance du design des électrodes interdigitées sur la sensibilité de détection. Leurs études ont mis en évidence qu'il existait une corrélation entre l'espace inter-électrode (gap) et cette sensibilité. En effet, comme présenté sur le graphique issu de leur publication (Figure III-24), plus le gap est faible, plus la sensibilité augmente, au risque d'avoir une réponse bruyante. D'après leurs études le meilleur compromis semble être un rapport de

5 entre la valeur du gap et le diamètre de l'entité que l'on souhaite détecter. Selon leurs résultats, de faibles espacements inter-électrodes entraînent une forte dépendance de la position des bactéries, ce qui augmente la déviation standard et réduit le SNR.

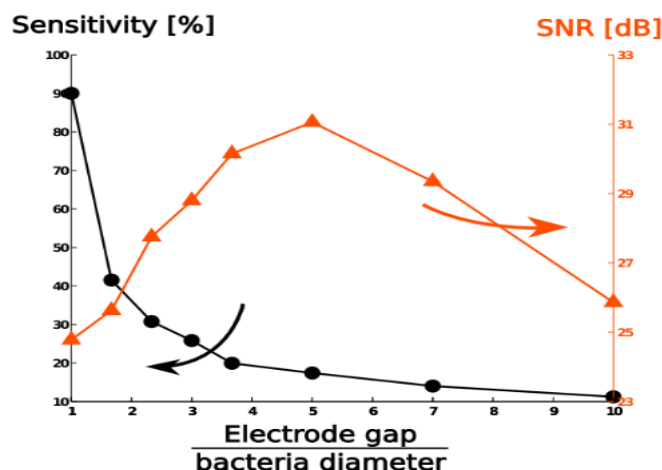


Figure III-24 : Corrélation entre sensibilité de détection et espace inter-électrode d'une interdigitée

Compte tenu du fait que le diamètre des cellules étudiées varie entre 12-13 μm ^{42,43,44} (monocytes), trois différentes valeurs de gap ont été testées : 50, 60 et 75 μm .

Les dispositifs sont réalisés selon le procédé décrit paragraphe 3.3.1. Seul le masque comportant les différents motifs de microélectrodes interdigitées a été modifié. De la même manière, des plots PDMS ont été collés à chaque entrée/sortie de canalisation afin d'exploiter la partie fluide du système.

Après fonctionnalisation des électrodes par des anticorps CD14 suivant le protocole précédemment décrit, les mesures d'impédance ont été réalisées en mode faradique après circulation pendant 2 heures d'un flux de cellules pour une gamme de concentration cellulaire de 10^3 à 10^6 cellules/mL. Les variations du module d'impédance en fonction de la concentration cellulaire sont regroupées par type de microélectrodes dans le graphique présentée Figure III-25-B.

Comme dans les cas précédemment présentés, les courbes impédimétriques présentent bien un profil de type lemniscate, c'est-à-dire une succession de demi-cercles associée à l'absence de la droite de Warburg. Les courbes mettent clairement en évidence une augmentation de la sensibilité lorsque le gap diminue. Les variations d'impédance associées au piégeage cellulaire sont nettement plus importantes lorsque le gap est faible. Ce résultat est en accord avec ce qui a déjà été évoqué auparavant concernant le phénomène d'amplification lié au recouvrement des couches de diffusion d'autant plus fortement impacté par la présence de cellules lorsque l'espace interélectrode est faible. On note également que les valeurs des variations d'impédance enregistrées dans le cas d'espace inter-électrodes plus

larges (60 et 75 μm), sont proches de celles relevés précédemment avec des électrodes simples.

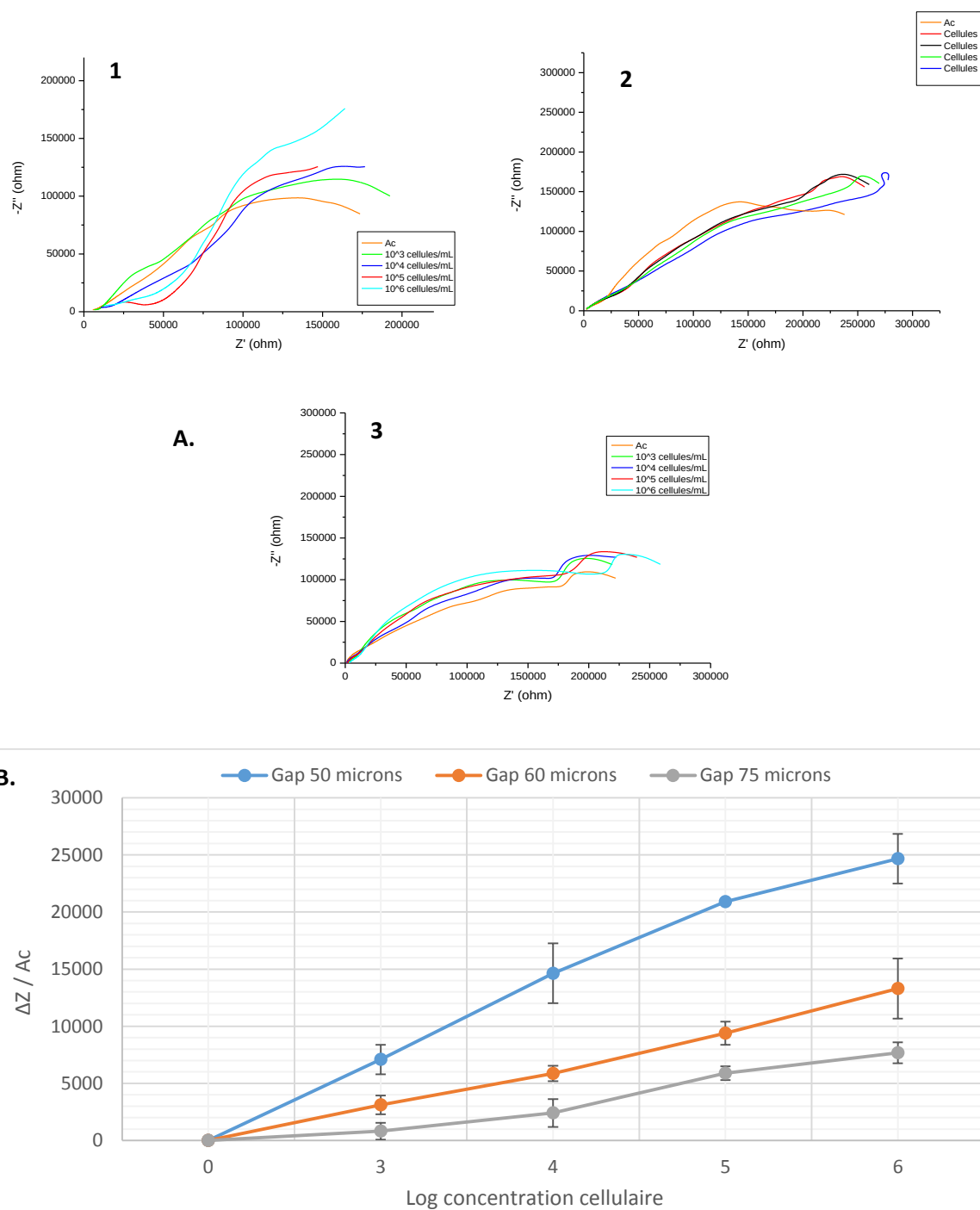


Figure III-25 : A- Exemples de diagrammes de Nyquist obtenus en mode faradique après incubation en présence de suspensions cellulaires dans une gamme de 10^3 à 10^6 cellules/mL pour des électrodes interdigitées ayant différentes valeurs de gap 1) 50 μm 2) 60 μm et 3) 75 μm , B- Variation correspondante du module d'impédance mesuré à 100Hz en fonction du logarithme de la concentration cellulaire

Si l'on considère le diamètre moyen des monocytes égal à 12-13 μm , la meilleure sensibilité obtenue correspond à un rapport d'environ 4 entre le gap et la taille de la cellule. Ce résultat représente un bon compromis entre sensibilité et SNR, en accord avec les travaux

de Couniot. Cependant il aurait été intéressant de diminuer davantage les valeurs de gap afin de vérifier qu'il n'était pas possible d'augmenter davantage la sensibilité.

La géométrie et l'espace inter-électrode étant fixés, un autre paramètre doit être pris en compte dans l'optimisation du design et concerne la surface et donc la longueur de l'électrode. En effet, le nombre de brins composant l'électrode interdigitée peut lui aussi avoir une influence sur la limite de détection. La longueur de la microélectrode représente donc un facteur important dans cette étude.

4.2. Influence du nombre de brins

4.2.1. Modifications technologiques

Afin de réduire les temps et coûts de fabrication des dispositifs, la résine SU-8 a été remplacée par des films époxy secs DF-1050 (EMS) (annexe 2) qui ne nécessitent pas de recuit, en suivant le protocole décrit par Courson *et al.*⁴⁵, pour la structuration des couches de 25 et de 100 μm .

Concernant l'évolution du design du wafer, les deux peignes ont été rapprochés afin de déposer une canalisation de 100 μm de large. Le wafer contient 12 puces contenant chacune 2 microélectrodes interdigitées de même longueur, cinq entrées/sorties fluidiques possibles, ainsi que dix paires de contacts électriques. Quatre longueurs d'électrodes ont été étudiées : 3, 1, 0,5 et 0,1 mm.

L'ensemble des microélectrodes interdigitées réalisées est repris dans la figure suivante :

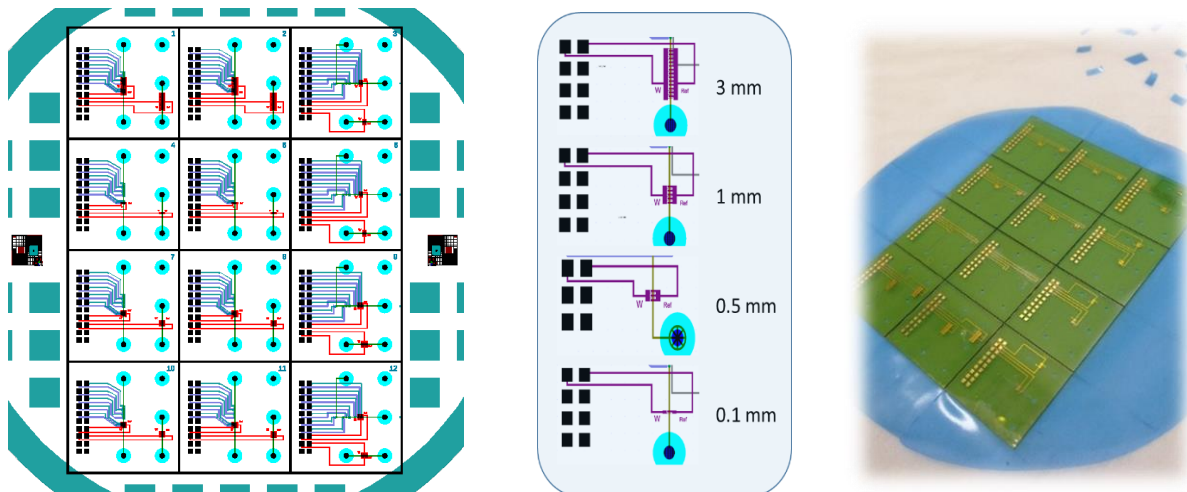


Figure III-26 : Niveaux des masques photolithographiques, détails des différentes longueurs de microélectrodes et réalisation des nouvelles puces microfluidiques

Les microélectrodes de 3 mm possèdent au total 27 brins (travail + contre électrode), celles de 1 mm, 9 brins, celles de 0,5 mm, 5 brins et celles de 0,1 mm, 2 brins.

D'autre part, afin de s'affranchir des microsoudures des fils de contacts ainsi que du collage des plots PDMS, un nouveau système de mesures a été mis en place. Dans ce cas, l'ensemble des parties électriques et fluidiques est géré par un même support mécanique, pouvant incorporer individuellement chaque puce afin d'être testée (Figure III-27). Le support mécanique contient une partie d'ajustement composée de deux vis micrométriques permettant d'aligner ses contacts électriques sur ceux de la puce microfluidique en réglant les positions horizontales et verticales de cette partie.

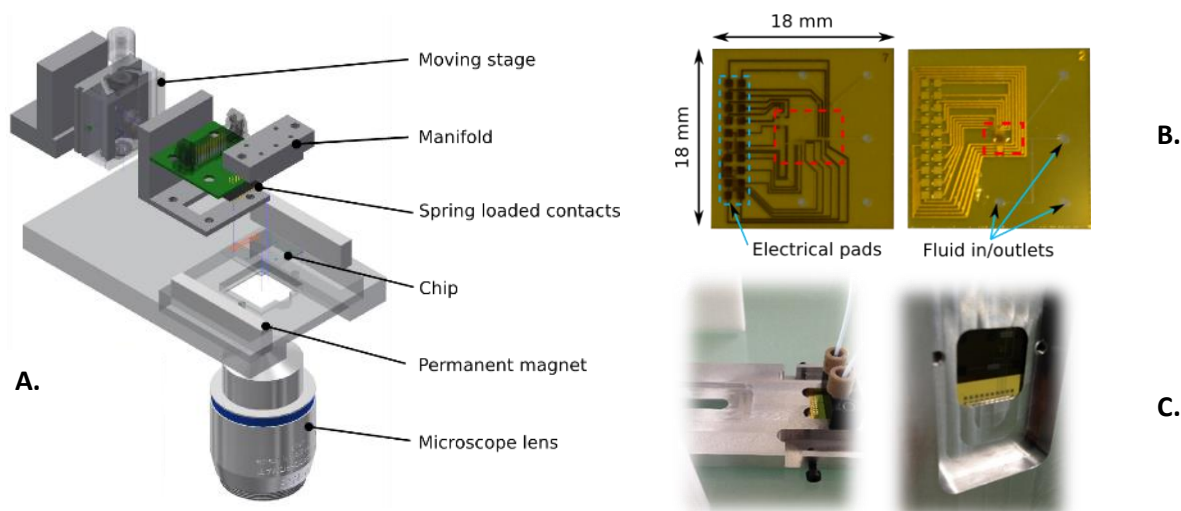


Figure III-27 : A- Schéma général du capteur, B- Description individuelle des puces, C- Observation microscopique du piégeage cellulaire

Lorsque la puce est en place dans le support et les contacts électriques établis, l'étanchéité de la partie fluidique est gérée par des joints toriques à chaque entrée/sortie des canalisations. Les entrées et sorties de fluides s'intègrent sur la partie supérieure du réservoir par un nouveau système de joints. Cette structure permet de travailler sur les deux microélectrodes de chaque puce simultanément. De plus, ce support contient une ouverture sur sa partie inférieure permettant de faire une observation microscopique simultanée. Ce système permet de gérer successivement la fonctionnalisation et le piégeage cellulaire sur chaque puce dans son intégralité, sans jamais avoir à retoucher manuellement chaque composant.

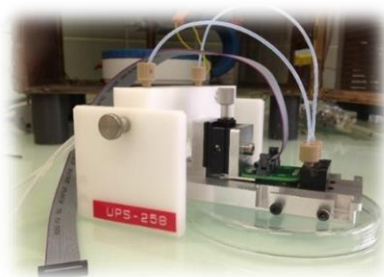


Figure III-28 : Support mécanique avec puce microfluidique intégrée

4.2.2. Piégeage cellulaire

Après fonctionnalisation, une gamme de concentration cellulaire de 10^1 à 10^7 cellules/mL est appliquée à chaque microélectrode interdigitée. Les mesures impédimétriques sont réalisées comme précédemment en mode faradique sous un flux d'électrolyte ($\Delta P_{E/S}$ de 20 mB) dans une gamme de fréquences de 50 kHz à 100 mHz. Les variations du module d'impédance enregistrées en fonction de la concentration cellulaire ainsi que quelques exemples de diagrammes de Nyquist obtenus sont regroupés pour chaque longueur de microélectrodes sur la Figure III-29-A.

Il est important de noter que grâce à l'utilisation du support mécanique les courbes impédimétriques sont beaucoup plus régulières et reproductibles que dans les cas précédents. Comme le montre La Figure III-30B, chaque longueur de microélectrodes interdigitées semble posséder une gamme de concentration cellulaire pour laquelle sa sensibilité est maximum ($>6000 \Omega / \text{unité}$). Dans le cas des électrodes les plus courtes (0,1 mm) leur sensibilité est maximale jusqu'à une concentration de l'ordre de 100 cellules/mL, après quoi la surface semble rapidement saturée. Pour les microélectrodes de 0,5 mm, la sensibilité est maximum dans une gamme de concentration comprise entre 10^2 to 10^5 cellules/mL, et 10^6 pour les électrodes de 1 mm de long. Dans le cas même des microélectrodes de 3 mm la sensibilité est maximale à partir de 10^5 cellules/mL. Ces résultats prouvent qu'il existe un seuil au-delà duquel chaque surface de microélectrode interdigitée est exploitable pour une concentration cellulaire donnée.

Il est très important de noter que ces microélectrodes permettent d'atteindre des limites de détection très faibles. En effet, dans le cas de l'électrode de 0,1 mm la limite de détection est inférieure à 10 cellules par mL. Pour détecter les éléments rares et en particulier pour le diagnostic précoce, les microélectrodes de 0,1 mm semblent être les plus adaptées.

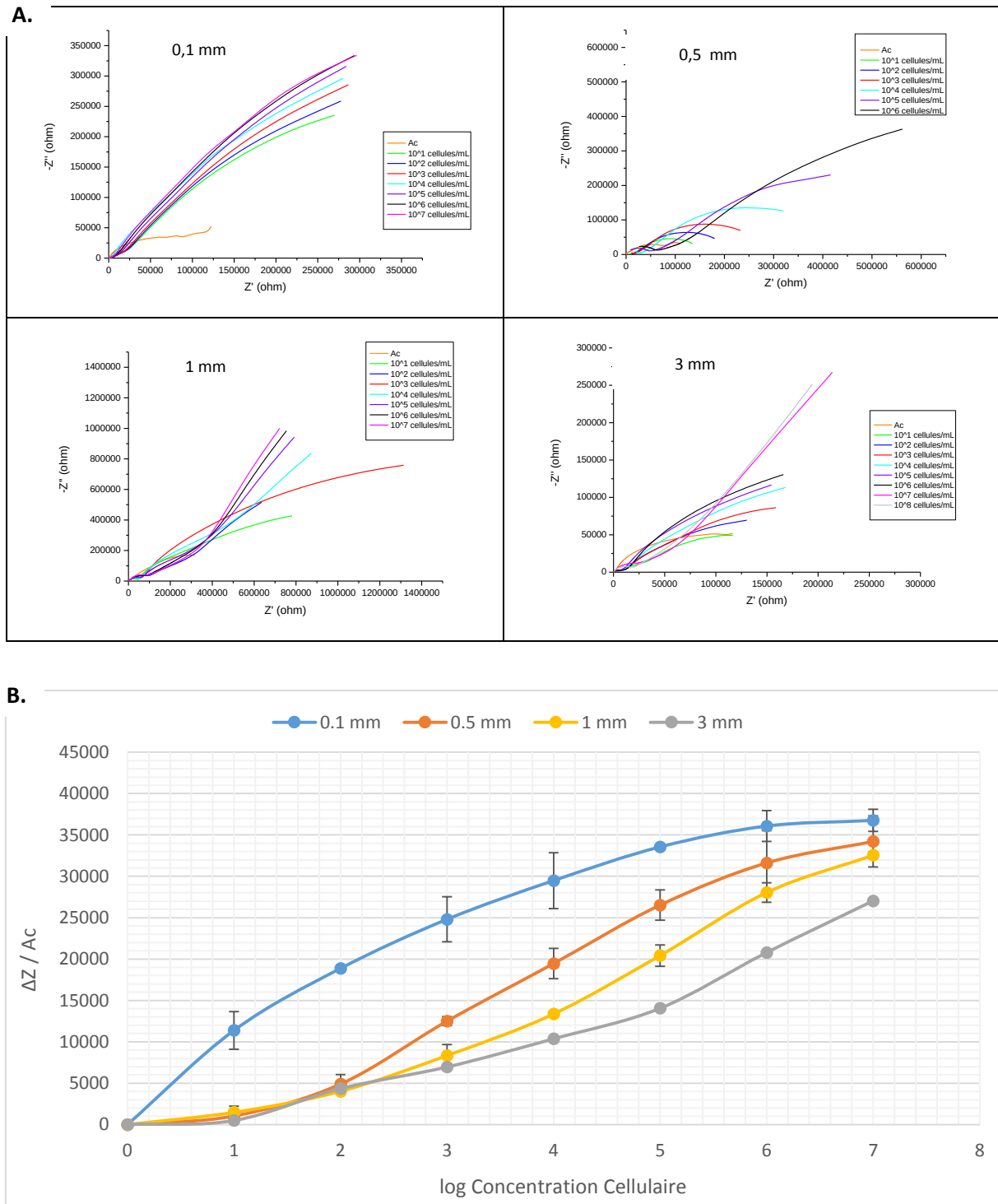


Figure III-29 : A- Exemples de diagrammes de Nyquist obtenus en mode faradique après incubation en présence de suspensions cellulaires dans une gamme de 10^1 à 10^7 cellules/mL pour des électrodes interdigitées de différentes longueurs : 0,1 mm, 0,5mm, 1 mm et 3mm, B- Variation du module d'impédance mesuré à 100Hz en fonction du logarithme de la concentration cellulaire

5. Conclusion

Les résultats présentés de ce chapitre ont permis de mettre en évidence un gain considérable de sensibilité grâce d'une part à la miniaturisation des électrodes de travail et contre-électrodes et d'autre part à l'apport de la microfluidique. Les différentes géométries d'électrodes testées ont permis de mettre en évidence des performances remarquables dans le cas des électrodes interdigitées en mode microfluidique. Ces performances sont attribuées d'une part à une meilleure répartition de leur surface active dans l'espace par rapport à des géométries simples mais aussi aux phénomènes d'amplification du courant se produisant, compte tenu de la proximité des deux électrodes et du recouvrement de leur couche de diffusion.

Compte tenu de l'importance des dimensions de ces électrodes sur les impédances mesurées, les sensibilités d'électrodes interdigitées ont été évaluées pour différentes valeurs de l'espace inter-électrode mais aussi pour différentes longueurs c'est-à-dire différentes surfaces. Les résultats ont permis de mettre en évidence des sensibilités plus importantes pour les espaces inter-électrodes plus faibles. En ce qui concerne la longueur des électrodes il semblerait que chaque surface de microélectrode interdigitée soit exploitable pour une gamme de concentration cellulaire donnée. Les surfaces les plus faibles ont permis d'atteindre une limite de détection de l'ordre de quelques cellules/mL. Ces résultats sont très encourageants et pourraient ouvrir de nouvelles voies de recherche comme par exemple la détection de cellules souches circulantes.

Par ailleurs ces différentes études ont également permis d'améliorer les processus de microfabrication pour un gain de temps, une diminution des coûts de fabrication mais aussi pour une meilleure reproductibilité des mesures.

Afin d'augmenter davantage les taux de piégeage, différentes voies sont actuellement envisagées. La première voie prévoit l'ajout de bobines magnétiques sous les microélectrodes. L'idée est d'amener par attraction magnétique les complexes cellule/billes au voisinage des électrodes fonctionnalisées sur lesquelles vont se fixer sélectivement les cellules d'intérêt par interaction antigène-anticorps. Après fixation, les microbobines sont désactivées, libérant les cellules non accrochées dans la canalisation fluidique. Ne resteront donc sur les électrodes fonctionnalisées que les cellules spécifiques. De plus, en réalisant des bobines en regard, « sol et plafond », une alternance du sens du champ magnétique pourra être effectué, et ainsi provoquer des cycles de piégeage/libération.

D'autre part, de nouvelles géométries d'électrodes seront envisagées. En effet, depuis peu, de nouvelles évolutions des électrodes ont émergé pour leur utilisation dans des biocapteurs impédimétriques. Ces nouveaux designs peuvent être une variante des géométries actuelles, comme l'arrondissement de la forme interdigitée⁴⁶, ou bien l'établissement de nouveau design de microélectrodes, comme la structure Serpentine⁴⁷.

Bibliographie

- ¹ Judy J.W., Microelectromechanical systems (MEMS): Fabrication, design and applications, *Smart Mater. Struct.*, 2001, 10, 1115-1134.
- ² Justin G., Finley S., Abdur Rahman A., Guiseppi-Elie A., Biomimetic hydrogels for biosensor implant biocompatibility: electrochemical characterization using micro-disc electrode arrays (MDEAs), *Biomed. Microdevices*, 2008, 11(1), 103-105.
- ³ Nwankire C.E., Venkatanarayanan A., Glennon T., Keyes T.E., Forster R.J., Ducrée J., Label-free impedance detection of cancer cells from whole blood on an integrated centrifugal microfluidic platform, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 68, 382-389.
- ⁴ Franks W., Schenker I., Schmutz P., Hierlemann A., Impedance characterization and modeling of electrodes for biomedical applications, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2005, 52(7), 1295-1302.
- ⁵ Matysik F.M., Meister A., Werner G., Electrochemical detection with microelectrodes in capillary flow systems, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 305(1-3), 114-120.
- ⁶ Greve D.W., Huang X., Nguyen D., Domach M.M., Proceedings of the IEEE Sensors 2003 (IEEE Cat. No. 03CH37498), 2003, 2, 1358-1363.
- ⁷ Huang Y., Rubinsky B., Microfabricated electroporation chip for single cell membrane electroporation, *Sens. Actuat. A-Phys.*, 2001, 89(3), 242-249.
- ⁸ J.-W. Wang, M.-H. Wang, L.-S. Jang, Effects of electrode geometry and cell location on singlecell impedance measurement, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25(6), 1271-1276.
- ⁹ Ekins R., Edwards P., On the meaning of sensitivity, *Clin. Chem.*, 1997, 43(10), 1824-31.
- ¹⁰ McNaught A.D., Wilkinson A., IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Oxford: Blackwell Science, 1997.
- ¹¹ Cho S., Thielecke H., Design of electrode array for impedance measurements of lesions in arteries, *Physiol. Meas.*, 2005, 26(2), S19-S26.
- ¹² Price D.T., Rahman A.R., Bhansali S., Design rule for optimization of microelectrodes used in electric cell-substrate impedance sensing (ECIS), *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24(7), 2071-2076.
- ¹³ Montrose A., Cargou S., Nepveu F., Manczak R., Gué A.M., Reybier K., Impedimetric immunosensor for the detection of circulating pro-inflammatory monocytes as infection markers, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 49, 305-311.
- ¹⁴ Sia S. K., Whitesides G. M., Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies, *Electrophoresis*, 2003, 24(21), 3563-3576.
- ¹⁵ McDonald J. C., Whitesides G. M., Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices, *Accounts chem. Res.*, 2002, 35(7), 491-499.

- ¹⁶ Komura T., Yamaguchi T., Shimatani H., Okushio R., Interfacial charge-transfer resistance at ionizable thiol monolayer-modified gold electrodes as studied by impedance spectroscopy, *Electrochim. Acta.*, 2004, 49(4), 597-606.
- ¹⁷ Gebbert A., Alvarezicaza M., Stocklein W., Schmid R.D., Real-time monitoring of immunochemical interactions with a tantalum capacitance flow-through cell, *Anal. Chem.*, 1992, 64(9), 997-1003.
- ¹⁸ DeSilva M.S., Zhang Y., Hesketh P.J., Maclay G.J., Gendel S.M., Stetter J.R., Impedance based sensing of the specific binding reaction between Staphylococcus enterotoxin B and its antibody on an ultra-thin platinum film, *Biosens. Bioelectron.*, 1995, 10(8), 675-682.
- ¹⁹ Ordeig O., Del Campo J., Munoz F.X., Banks C.E., Compton R.G., 2007. *Electroanal.* 19, 1973-1986.
- ²⁰ Bard A.J., Faulkner L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons: New York, 2001, 681.
- ²¹ Offer G.J., Shearing P., Golbert J.I., Brett D.J.L., Atkinson A., Brandon N.P., Using electrochemical impedance spectroscopy to compensate for errors when measuring polarisation curves during three-electrode measurements of solid oxide fuel cell electrodes, *Electrochim. Acta*, 2008, 53(26), 7614–7621.
- ²² Bastidas D.M., Cano E., Analysis of Copper Diffusion Processes Using Impedance Data, *ACS Transactions*, 2008, 15(1), 215-219.
- ²³ Sasan A., Microfluidic-Based In-Situ Functionalization for Detection of Proteins in Heterogeneous Immunoassays, thesis Waterloo, Ontario, Canada 2012.
- ²⁴ Li P., Abolmaaty A., Barek T., Time optimization of Heterogeneous immunoassay using PDMS microfluidic chip for quantitative detection of a model analyte, *Proceedings of the Sixth International ASME Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels ICNMM2008*, 2008, Darmstadt, Germany.
- ²⁵ Chen X., Liu J., Zhu J., Optimization of Microfluidic Immunomagnetic Chip for Circulating Tumor Cell Capture, *Sensor. Mater.*, 2013, 25(9), 667-671.
- ²⁶ Wragg A.A., 5th European Symposium on Electrochemical Engineering, *Icheme symposium series*, 1999, 145, 41-50.
- ²⁷ Wang L., Wang H., Wang L., Mitchelson K., Yu Z., Cheng J., Analysis of the sensitivity and frequency characteristics of coplanar electrical cell-substrate impedance sensors, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24(1), 14–21.
- ²⁸ Wang X., Xu X., Impedance based apparatuses and methods for analyzing cells and particles, *Google Patents*, 2003, US 20040152067 A1.
- ²⁹ Keese C.R., Giaever I., A biosensor that monitors cell morphology with electrical fields, *IEEE Eng. Med. Biol.*, 1994, 13, 402–408.
- ³⁰ Settu K., Liu J.T., Concept for E.coli Detection Using Interdigitated Microelectrode Impedance Sensor, 35th Annual International Conference of the IEEE EMBS, 2013.

- ³¹ Kim G., Morgan M., Interdigitated microelectrode based impedance biosensor for detection of salmonella enteritidis in food samples, *J. Physics*, 2008, Conference Series 100 052044.
- ³² Couniot N., Flandre D., Francis L. A., Afzalian A., Bacteria detection with interdigitated microelectrode : noise consideration and design optimization, *Procedia Engineering*, 2012, 47, 188-191.
- ³³ Varshney M., Li Y., Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24(10), 2951–2960.
- ³⁴ Yang L., Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes, *Talanta*, 2008, 74(5), 1621–1629.
- ³⁵ Iwasaki Y., Morita M., Electrochemical measurements with interdigitated array microelectrodes, *Current Separation*, 1995, 14(1), 1-8.
- ³⁶ Yuan Q., Yang K., Wu J., Optimization of planar interdigitated microelectrode array for biofluid transport by AC electrothermal effect, *Microfluid. Nanofluid.*, 2014, 16, 167–178.
- ³⁷ Alexander F., Dorielle T., Optimization of Interdigitated Electrode (IDE) Arrays for Impedance Based Evaluation of Hs 578T Cancer Cells, *IOP Publishing Ltd, J. Physics Conf. Series*, 2010, 224, 1.
- ³⁸ Zhao W.P., Jia H.Y., Sun X., Mao Z.H., Wang X.Y., Impedance Immunsensor Based on Interdigitated Array Microelectrode and its Experiment Parameter Optimization, *Sensor. Transduc.*, 2014, 170(5), 35-40.
- ³⁹ Baccar H., Mejri M.B., Prehn R., del Campo R.J., Baldrich E., Interdigitated Microelectrode Arrays Integrated in Microfluidic Cell for Biosensor Applications, *J. Nanomed. Nanotech.*, 2014, 5:243. doi: 10.4172/2157-7439.1000243.
- ⁴⁰ Blume S.O.P., B-M. Ridha, Sullivan P.E., Characterization of coplanar electrode structures for microfluidic-based impedance spectroscopy, *Sensor. Actuat. B*, 2015, 218, 261–270.
- ⁴¹ Couniot N., Flandre D., Francis L. A., Afzalian A., Signal-to-noise ratio optimization for detecting bacteria with interdigitated microelectrodes, *Sensor. Actuat. B*, 2013, 189, 43-51.
- ⁴² Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K., Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer*, 1980, 26(2), 171-176.
- ⁴³ Auwerx J., The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation, *Reviews Experientia*, 1991, 47(1), 22-31.
- ⁴⁴ Aldo P.B., Craveiro V., Guller S., Mor G., Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, 70(1), 80–86.
- ⁴⁵ Courson R., Cargou S., Conedera V., Fouet M., Blatche M. C., Serpentin C. L., Gue A.M., Low-cost multilevel microchannel lab on chip: DF-1000 series dry film photoresist as a promising enabler, *RSC Adv.* 2014, 4, 54847.
- ⁴⁶ Zou L., Wang Q., Tong M., Li H., Wang J., Hu N., Detection of diarrhetic shellfish poisoning toxins using high-sensitivity human cancer cell-based impedance biosensor, *Sensor. Actuat. B*, 2016, 222, 205–212.

⁴⁷ Rivadeneyra A., Ferandez-Salmeron J., Banqueri J., Lopez-Villanueva J.A., Capitan-Vallvey L.F., Palma A.J., A novel electrode structure compared with interdigitated electrodes as capacitive sensor, *Sensor. Actuat. B*, 2014, 204, 552–560.

Chapitre 4 : Application à l'étude d'interactions récepteurs / ligands

Chapitre 4 : Application à l'étude d'interactions récepteurs / ligands

1. Introduction	118
2. Choix du système étudié	119
3. Fonctionnalisation des microélectrodes	120
3.1. Etudes préliminaires sur macroélectrodes.....	121
3.2. Transposition aux microélectrodes	123
4. Les interactions Ligands – Récepteurs A2a	126
4.1. Mesures d'impédance en mode faradique	126
4.1.1. Interactions avec cellules présentant le récepteur A2a	126
4.1.2. Cas des cellules n'exprimant pas le récepteur A2a	129
4.1.3. Analyse de mélanges	130
4.2. Mesures d'impédance en mode non faradique	132
5. Compétition d'interactions au récepteur A2a entre le c-di-AMP et des molécules libres.....	134
5.1. Cas du ZM 241385	135
5.2. Cas du CGS 21680	136
6. Discussions	137
Bibliographie	140

1. Introduction

Les études biochimiques d'interactions moléculaires sont le plus souvent effectuées par l'intermédiaire des techniques SPR¹ (Surface Plasmon Resonance), de cytométrie en flux ou par microscopie. Bien que la SPR donne des informations quantitatives sur les processus d'interactions tels que les constantes cinétiques d'association K_{on} , de dissociation K_{off} , de dissociation à l'équilibre (affinité) K_D (K_{off} / K_{on}) ou encore les temps de demi-vie ($t_{1/2}$), cette technologie se révèle moins efficace pour les interactions molécules / surface cellulaire. Celles-ci sont généralement analysées par l'intermédiaire de procédés optiques basés sur des transferts d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) ou de bioluminescence (BRET). Cependant dans de tels cas, les analyses visuelles résultantes permettent la mise en évidence de liaisons mais dans une moindre mesure la détermination des valeurs des paramètres de liaison.

En parallèle de ces méthodes classiques d'analyse d'interactions biomoléculaires, la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) a gagné en popularité car elle ne nécessite pas de marquage, est non invasive et permet des analyses en temps réel (*cf.* chapitre 1). En outre, nous avons vu précédemment que l'intégration de biocapteurs microfluidiques utilisant la SIE fournit des plates-formes miniaturisées présentant de nombreux avantages, parmi lesquels la portabilité, la polyvalence dans la conception, la réduction du volume de l'échantillon, la diminution du temps de traitement, une faible consommation de réactifs et par conséquent une analyse à faible coût. Les études présentées dans le chapitre 3 ont permis de montrer que ce type de biocapteur microfluidique impédimétrique permettait, compte tenu du caractère isolant de la cellule, la détection immunologique de cellules avec une sensibilité pouvant aller jusqu'à 10 cellules/mL.

Nous avons donc étudié la possibilité d'utiliser les dispositifs microfluidiques, précédemment décrits dans le cadre de la détection immunologique de cellules, pour l'étude d'interactions récepteur-ligand à partir de cellules entières. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Jean-Jacques Fournié du Centre de Recherche Contre le Cancer de Toulouse (CRCT) pour l'analyse de l'interaction entre un récepteur de surface couplé à la protéine G, le récepteur A2a avec un dinucléotide cyclique, le c-di-AMP (diadénosine monophosphate cyclique).

2. Choix du système étudié

Les mononucléotides sont les principaux médiateurs de la protection et de la régénération des tissus comme par exemple l'adénosine, qui est libérée des cellules endommagées. Les microorganismes utilisent au contraire des dinucléotides cycliques comme le di-AMP cyclique (c-di-AMP) et le di-GMP cyclique (cdi-GMP) qui sont sécrétés respectivement par les bactéries ou les protozoaires^{2,3}. Pour se défendre, les cellules de mammifères ont évolué et mis en place des systèmes de reconnaissance de ces dinucléotides cycliques afin d'adapter leur réponse immunitaire. Les dinucléotides cycliques extracellulaires font également partie des molécules libérées de cellules infectées ou de tissus endommagés et représentent donc des signaux importants. Néanmoins, la façon dont ces signaux sont reconnus et traités par les cellules est encore peu connue. L'équipe du Dr Jean-Jacques Fournié du CRCT a démontré que les dinucléotides cycliques extracellulaires c-di-AMP et cGAMP étaient spécifiquement reconnus par les monocytes humains exprimant le récepteur A2a de l'adénosine et pouvaient induire sélectivement leur apoptose⁴. L'analyse du rôle de A2a dans cette réponse apoptotique a montré qu'il contrôlait la survie des monocytes à travers sa signalisation constitutive.

Cependant, l'étude de l'interaction récepteur A2a/ c-di-AMP ou cGAMP est difficile à mettre en œuvre avec les techniques couramment utilisées comme la résonance de plasmon de surface (SPR, procédé Biacore). En effet, cette technique requiert de grandes quantités de molécules et le récepteur A2a, récepteur de type GPCR (G protein coupled receptor), est inséré dans la membrane cellulaire, et par conséquent est très difficile à purifier sans modifier sa structure et donc son activité. Un moyen de pallier ce problème est de travailler directement sur les membranes mais dans ce cas de très grandes quantités de cellules sont nécessaires par expérience. D'autre part en SPR il est préférable que les deux entités aient des poids moléculaires proches ce qui n'est pas le cas ici.

Dans ce contexte, la possibilité de suivre l'interaction du récepteur A2a à partir de cellules entières avec le ligand c-di-AMP à l'aide des dispositifs microfluidiques a été analysée. Dans ce cas, le ligand c-di-AMP est immobilisé à la surface de l'électrode et son interaction avec le récepteur A2a est évaluée au travers du piégeage des cellules sur l'électrode.

Pour cette étude, des cellules CHO, cellules issues d'une lignée cellulaire d'ovaires de hamster de Chine (*Cricetulus griseus*) ont été utilisées. Ces cellules sont couramment utilisées en recherche dans le domaine médical, en biotechnologie et par l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines thérapeutiques⁵. En effet, ces cellules se prêtent très bien à la culture en masse, et possèdent la capacité de synthétiser des protéines complexes de poids moléculaire élevé. Ce type cellulaire n'exprimant pas naturellement le récepteur A2a, les cellules ont été transfectées par introduction du gène ADORA2A codant pour le récepteur A2a humain. L'ensemble des cellules, exprimant ou non A2a, a été cultivé au CRCT et récupéré le jour même avant chaque étude.

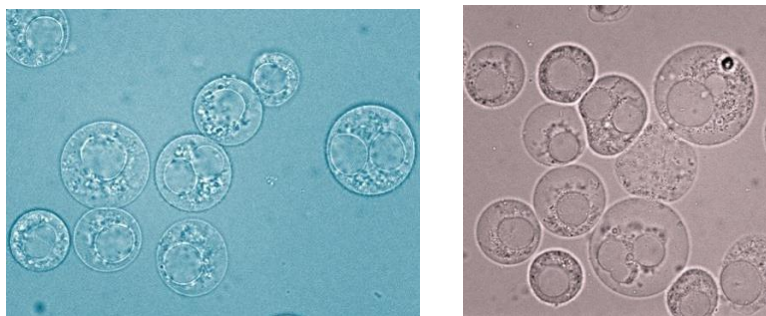


Figure IV-1 : Cellules CHO

3. Fonctionnalisation des microélectrodes

Les ligands c-di-AMP ont été greffés par l'intermédiaire d'interaction avidine/biotine grâce à l'utilisation de ligands (c-di-AMP) biotinylés. Ce type de réaction est régulièrement utilisé dans de très nombreuses applications biologiques, comme des séparations basées sur des affinités spécifiques⁶ ou encore des tests de diagnostic^{7,8} en raison de leur haute et spécifique affinité d'interaction (constante d'association $K_{on} = 10^{15} \text{ M}^{-1}$). L'immobilisation de biomolécules par l'intermédiaire de structures avidine/biotine permet en effet la construction de complexes moléculaires stables entre l'avidine et des protéines marquées par la biotine tout en maintenant de manière optimale l'activité de la biomolécule^{9,10,11}.

La fonctionnalisation des électrodes par l'avidine a été réalisée selon le protocole de fonctionnalisation décrit par Ding *et al.*¹². Il s'appuie sur une première couche de MUA (acide 11-Mercaptoundecanoïque), dont les groupements COOH terminaux ont été activés par une solution de NHS (N-hydroxysuccinimide) / EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide), afin de réagir avec les groupements de l'avidine. Afin d'éviter toute interaction non-spécifique, l'ensemble de cette structure fonctionnalisée est préalablement recouverte de glycine avant le greffage de la dernière couche d'oligomères biotinylés de c-di-AMP.

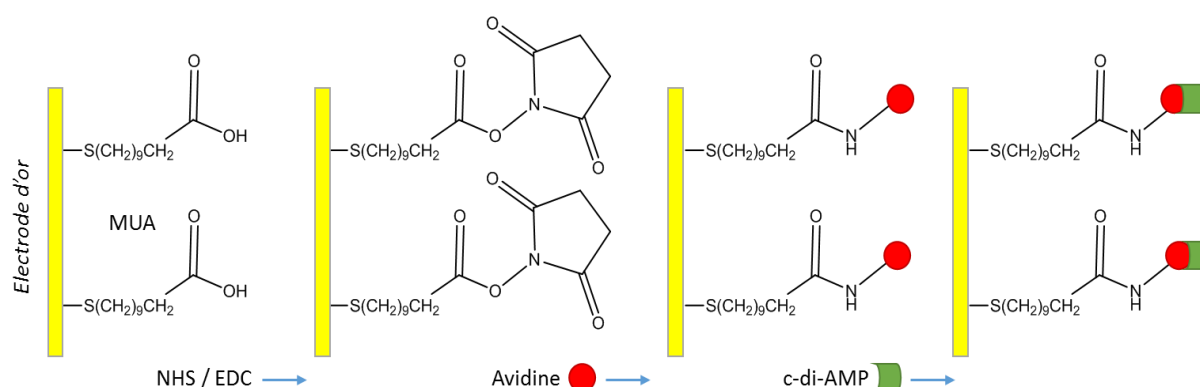


Figure IV-2 : Principe du protocole de fonctionnalisation

Les électrodes ont été fonctionnalisées à température ambiante par application sur les électrodes d'agents modifiants pendant un temps donné :

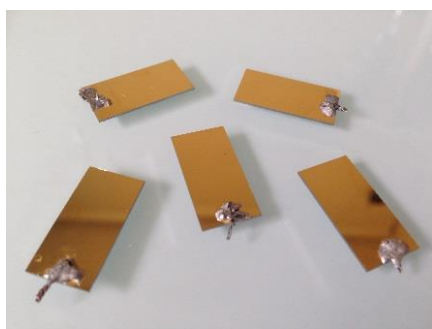
- MUA (1 mM dans l'éthanol absolu) : 30 min puis rinçage à l'éthanol
- NHS / EDC (15/75 mM dans eau déionisée) : 30 min puis rinçage à l'eau
- Avidine (1 g/L dans PBS) : 30 min puis rinçage au PBS
- Glycine (1 mol.L⁻¹ dans eau déionisée) 30 min puis rinçage à l'eau
- Oligomères biotinylés (2 ; 4 ou 6 µg/mL) : 30 min puis rinçage au PBS

Afin de valider la capacité de l'avidine immobilisée sur l'électrode à réagir avec les oligomères biotinylés, des analyses préliminaires ont été réalisées en mode statique sur des macroélectrodes.

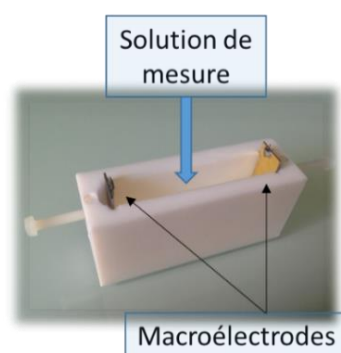
3.1. Etudes préliminaires sur macroélectrodes

Cette première étude a été réalisée sur des macroélectrodes d'or de 1 cm² (Figure IV-3-A), le contact électrique étant établi par soudure à l'étain d'un câble sur l'électrode. Avant fonctionnalisation les électrodes sont préalablement lavées dans un bain de piranha (70% d'acide sulfurique / 30 % d'eau oxygénée), rincées à l'eau et séchées sous flux d'azote. Après chaque étape du processus de fonctionnalisation réalisée par l'intermédiaire de goutte, les électrodes ont été caractérisées par SIE en mode faradique. Les mesures d'impédance sont réalisées dans un bac en téflon contenant l'électrolyte ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1 : 1) 5 mM dans PBS pH = 7,4) (Figure IV-3-B), dans une gamme de fréquence de 50 kHz à 100 mHz. Un exemple de diagramme de Nyquist correspondant à ces différentes étapes de fonctionnalisation est représenté Figure IV-3-C.

A.



B.



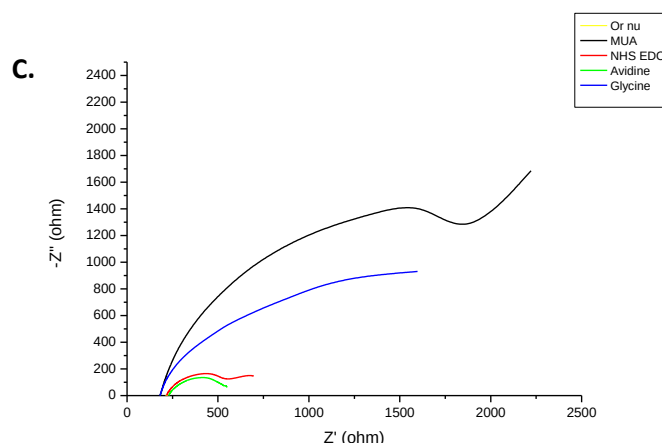


Figure IV-3 : A- Macroélectrodes d'or de 1 cm², B- système de mesure, C- Exemple de diagramme de Nyquist de fonctionnalisation d'une macroélectrode d'or sur wafer silicium

Le protocole de fonctionnalisation est reproductible sur l'ensemble des macroélectrodes testées. Les différents diagrammes de Nyquist reprennent les caractéristiques résistives d'un protocole de fonctionnalisation classique. En effet, l'or nu présente une très faible résistance au transfert de charge. Le greffage de MUA entraîne une augmentation du demi-cercle, du fait du caractère isolant de la couche, et à la présence de groupes COO⁻ terminaux qui repoussent les complexes du fer¹³. L'activation par NHS/EDC ainsi que le dépôt d'avidine entraînent une diminution de ce demi-cercle. En comblant les différents espaces vides, la glycine engendre une augmentation des valeurs impédimétriques.

Les électrodes ainsi modifiées ont ensuite été fonctionnalisées par ajout d'oligomères biotinylés c-di-AMP et caractérisées par SIE. Afin de vérifier l'effet de la concentration en oligomères biotinylés, trois concentrations en oligomères ont été testées : 2, 4 et 6 µg/mL. Les diagrammes de Nyquist correspondant sont représentés Figure IV-4.

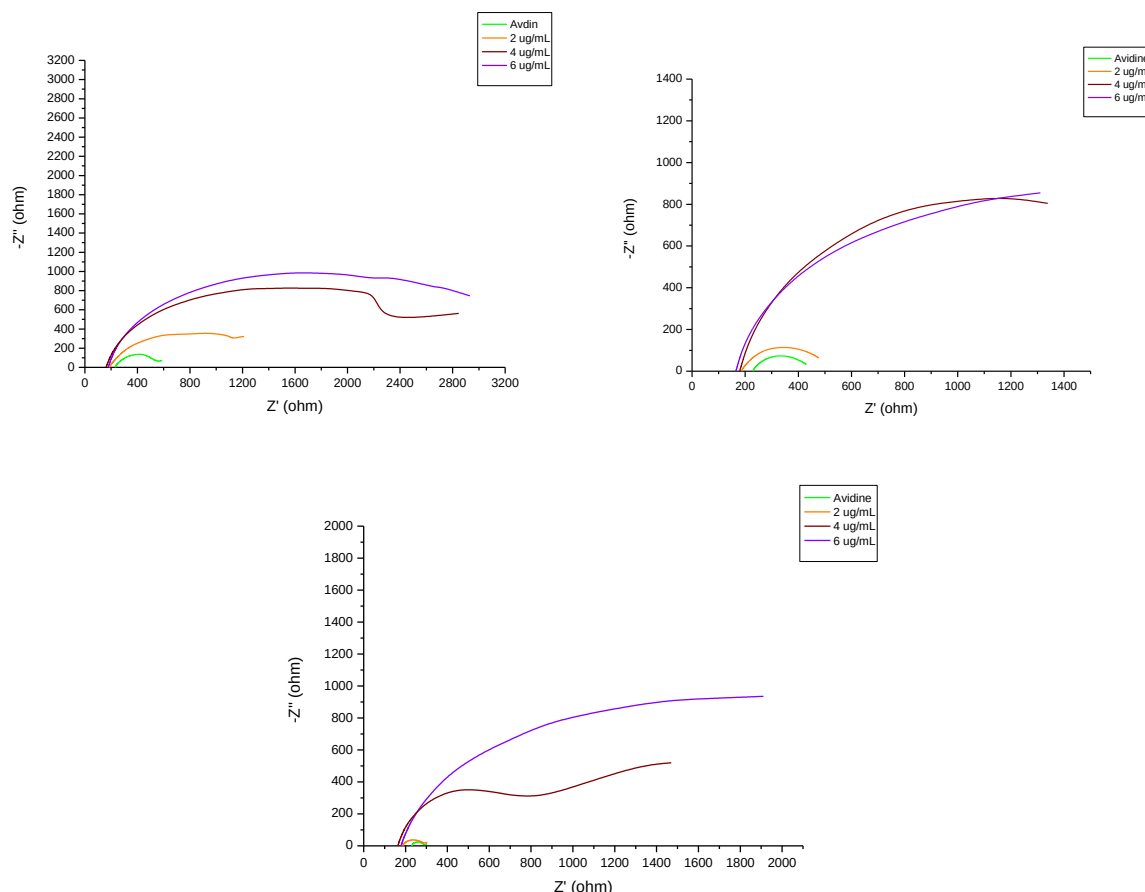


Figure IV-4 : Diagrammes de Nyquist de piégeage d'oligomères biotinylés à différentes concentrations (2, 4, 6 µg/mL) sur trois macroélectrodes d'or fonctionnalisées

Comparativement aux diagrammes obtenus en présence d'avidine, l'ajout d'oligomères engendre bien une augmentation du demi-cercle et donc de la résistance au transfert de charge, augmentation d'autant plus importante que la concentration en oligomères est élevée. Ces résultats valident le processus de greffage des oligomères.

3.2. Transposition aux microélectrodes

Cette étude porte donc sur la capacité à transférer le protocole de greffage d'oligomères c-di-AMP des macroélectrodes aux microélectrodes. Les analyses ont été réalisées sur des dispositifs microfluidiques contenant des électrodes interdigitées (cf. chapitre 3) (Figure IV-5-A).

Comme précédemment, les électrodes sont fonctionnalisées par passages successifs de solutions modifiantes. Les mesures SIE sont réalisées à deux électrodes sous un flux d'électrolyte ($\Delta P_{E/S} = 20$ mB). Les diagrammes de Nyquist correspondant aux étapes de fonctionnalisation par l'avidine sont représentés Figure IV-5-B. Ces diagrammes de Nyquist

reprennent les mêmes évolutions des demi-cercles que celles précédemment décrites dans le cas des macroélectrodes à la différence d'échelle près (augmentation des valeurs d'impédance suite au passage à la microfluidique et à la réduction des surfaces actives).

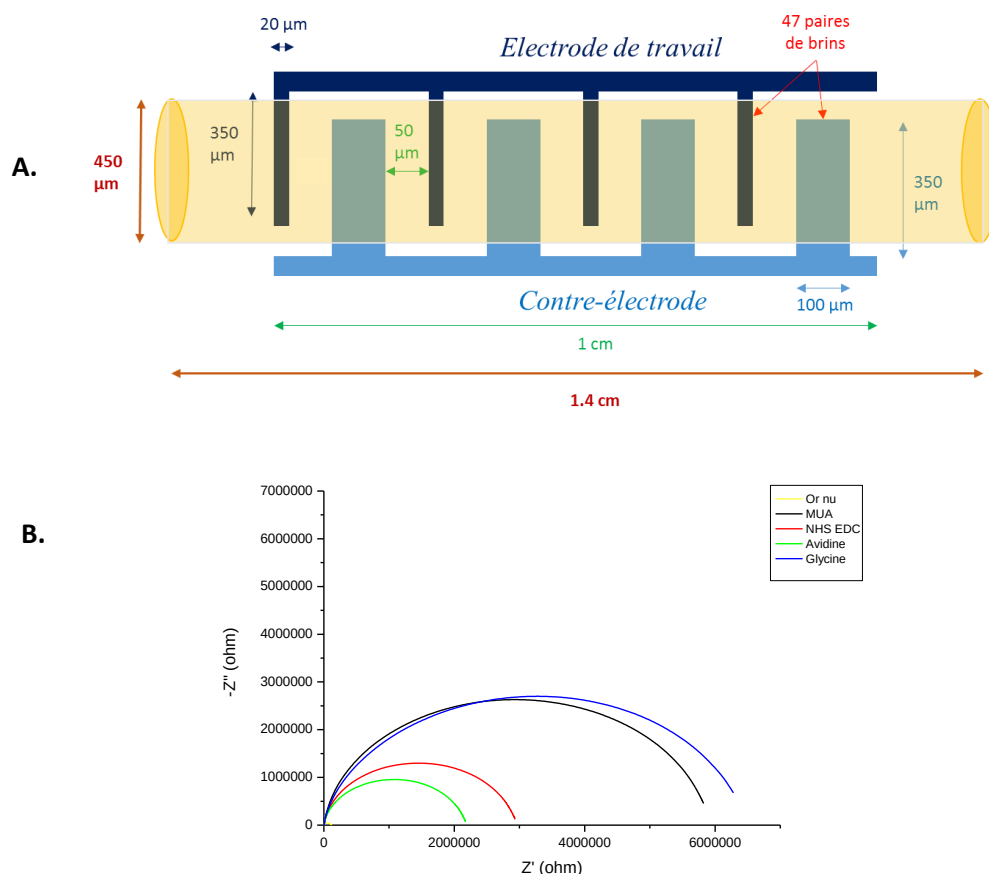


Figure IV-5 : A- Structure et dimensions de la microélectrode interdigitée et de la canalisation microfluidique, B- Exemple de diagramme de Nyquist de fonctionnalisation fluide de microélectrodes d'or interdigitées sur wafer verre

Le greffage d'avidine marquée à l'aide de FITC (Fluorescein isothiocyanate) a permis d'observer la modification des électrodes par microscopie de fluorescence. Les images correspondantes sont présentées Figure IV-6. On constate sur ces photos que l'ensemble de la puce est fluorescente ce qui suggère que l'avidine ait aussi été greffée en dehors des électrodes. Compte tenu du fait, comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, que ni les thiols ni NHS et EDC n'interagissent avec la SU-8, il est probable que ce soit l'avidine qui réagisse directement avec la SU-8.



Figure IV-6 : A- Structure chimique de l'Avidine-FITC. Greffage d'Avidine-FITC à la surface des microélectrodes, B- Grossissement *20, C- Grossissement *40

Les électrodes fonctionnalisées par l'avidine ont ensuite été modifiées dans une dernière étape par les oligomères biotinylés. Comme dans le cas des macroélectrodes, différentes concentrations en oligomères ont été appliquées (2, 4, et 6 $\mu\text{g/mL}$) avant caractérisation par impédance. Les diagrammes de Nyquist correspondant sont représentés Figure IV-7. Conformément à ce qui a été obtenu avec les macroélectrodes, plus la concentration en oligomères est importante et plus la variation d'impédance augmente confirmant le fait que les variations d'impédance enregistrées proviennent bien du greffage des oligomères.

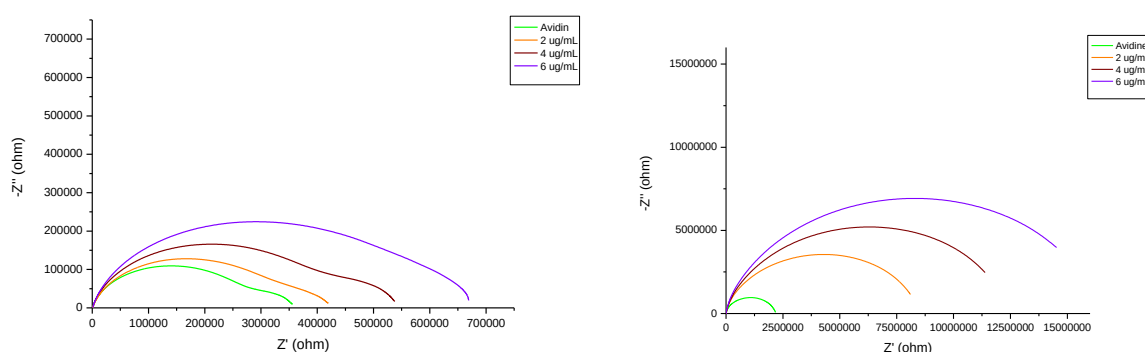


Figure IV-7 : Diagrammes de Nyquist obtenus sur deux électrodes d'or interdigitées de même géométrie préalablement modifiées par l'avidine pour différentes concentrations en oligomères (2, 4, 6 $\mu\text{g/mL}$)

Pour la suite de l'étude, la concentration en oligomères sera fixée à 2 $\mu\text{g/mL}$ dans le protocole de fonctionnalisation des microélectrodes.

4. Les interactions Ligands – Récepteurs A2a

Afin de caractériser ces liaisons c-di-AMP/A2a à partir de cellules entières, les microélectrodes modifiées à l'aide des oligomères c-di-AMP ont été placées dans un flux de cellules CHO exprimant le récepteur A2a. Afin de confirmer la spécificité des liaisons c-di-AMP/A2a, des cellules CHO n'exprimant pas A2a (ni aucun autre récepteur adénosine) ont été utilisées comme contrôle.

4.1. Mesures d'impédance en mode faradique

4.1.1. Interactions avec cellules présentant le récepteur A2a

Les mesures d'impédance ont été réalisées pour une gamme de concentration cellulaire de 10 à 10^6 CHO/mL de PBS, exprimant le récepteur A2a, les solutions étant préparées par dilutions successives. Le flux cellulaire est maintenu 30 min dans la canalisation avant changement de milieu (circulation d'électrolyte) et mesure d'impédance. Les mesures sont effectuées sur une même puce : entre chaque mesure, les surfaces d'oligomères c-di-AMP sont régénérées en rinçant la canalisation sous une pression élevée (approximativement 100 mB) afin de décoller et d'éliminer les cellules.

Les diagrammes de Nyquist sont enregistrés en mode faradique ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1 : 1) 5 mM dans PBS, pH = 7,4) dans une gamme de fréquences de 50 kHz à 100 mHz au potentiel d'équilibre avec une amplitude de 10 mV. Le principe de la méthode d'analyse reprend celui déjà évoqué dans le chapitre précédent ; la capacité de la sonde à venir s'oxyder ou se réduire à l'électrode dépendra de la présence des cellules à la surface des électrodes fonctionnalisées comme l'illustre la Figure IV-8.

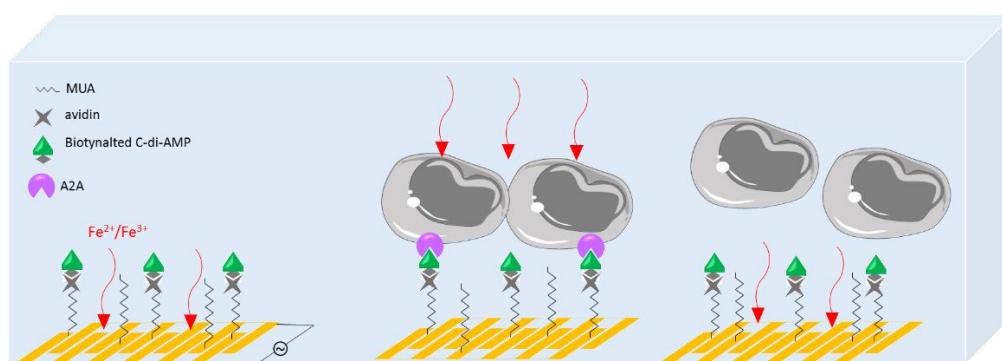


Figure IV-8 : Effet de la présence/absence de cellules greffées à la surface des microélectrodes sur la capacité de la sonde redox à venir interagir avec l'or

Les cellules exprimant le récepteur A2a vont se lier au c-di-AMP, formant une couche homogène à la surface de la microélectrode, empêchant ainsi la sonde redox d'atteindre la

surface d'or. Plus le nombre de cellules liées au c-di-AMP va augmenter, plus la résistance au transfert de charge sera élevée.

La variation du module d'impédance mesurée à 100 Hz par rapport à l'impédance de la couche d'oligomère ($\Delta Z_{\text{oligo}} = Z - Z_{\text{oligo}}$) en fonction du logarithme de la concentration en cellules, ainsi que des exemples de diagrammes de Nyquist sont présentés Figure IV-9-B et IV-9-A respectivement. Les diagrammes obtenus sont conformes aux diagrammes obtenus dans le cas du piégeage immunologique des cellules (*cf.* chapitre 3) à savoir la présence de plusieurs demi-cercles caractéristiques de l'établissement d'un régime stationnaire.

La Figure IV-9-B présente les variations d'impédance mesurées à 100 Hz, obtenues pour quatre puces indépendantes. D'une manière générale, on observe une augmentation du module d'impédance en fonction de la concentration cellulaire, caractéristique du piégeage des cellules à la surface des électrodes fonctionnalisées. On constate aussi que trois puces ont des comportements similaires (bleu, jaune, orange) alors que la quatrième puce présente des variations d'impédance relativement différentes à faibles concentrations cellulaires. Ceci est probablement dû à des problèmes de dilution limite, méthode reposant sur la loi statistique de Poisson : les suspensions cellulaires étant préparées spécifiquement, et de manière individuelle pour chaque dispositif testé, si les échantillons utilisés pour les faibles concentrations sont générés à partir d'une solution sous/surestimant la concentration cellulaire réelle, les résultats peuvent être faussés.

Cependant, il est tout de même important de noter que ces dispositifs permettent la détection de très faibles quantités de cellules inférieures à 100 cellules/mL.

Les images des électrodes prises après circulation de solutions de différentes concentrations cellulaires (Figure IV-10) illustrent bien ce phénomène d'autant plus important que la concentration en cellules est importante. Cependant on constate également la présence de cellules piégées entre les brins d'électrodes. Ce phénomène pourrait provenir soit d'une interaction cellule / SU8, soit d'une fonctionnalisation concomitante des espaces inter-électrodes par le c-di-AMP notamment dû à une interaction entre l'avidine et la SU-8 comme nous l'avons évoqué précédemment.

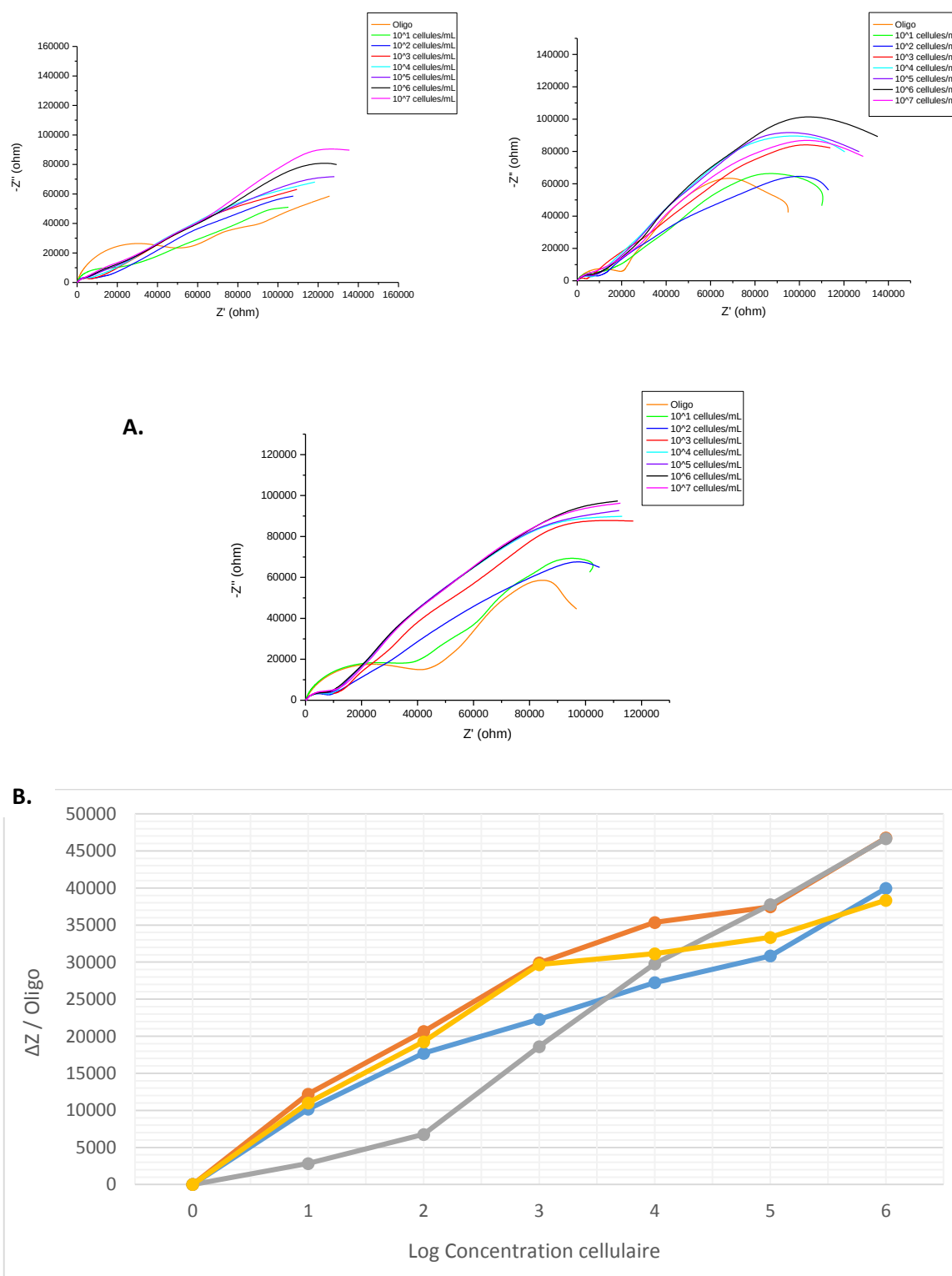


Figure IV-9 : A- Exemples de diagrammes de Nyquist obtenus après incubation de microélectrodes interdigitées fonctionnalisées par c-di-AMP en présence de solutions de différentes concentration en CHO surexprimant A2a (10 à 10⁶ cellules/mL), B-Variation du module de l'impédance mesurée à 100Hz par rapport à la couche d'oligomères obtenus pour 4 puces différentes (une puce par couleur)

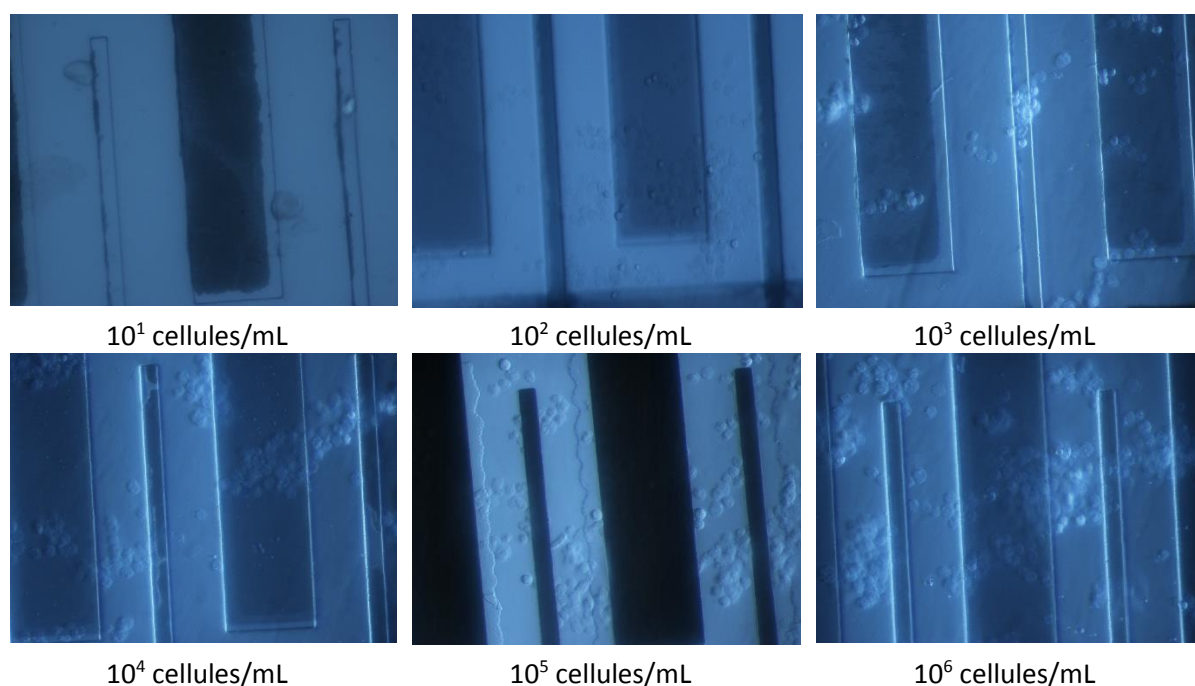


Figure IV-10 : Photo des électrodes fonctionnalisées ci-di-AMP prises après incubation des électrodes en présence de différentes concentrations de cellules CHO-A2a, Grossissement x 20

4.1.2. Cas des cellules n'exprimant pas le récepteur A2a

Afin de mettre en évidence la spécificité de l'interaction des oligomères avec les récepteurs A2a des cellules, les mêmes analyses ont été réalisées avec des cellules n'exprimant pas le récepteur A2a. Les variations d'impédance correspondantes mesurées à 100 Hz sont présentées Figure IV-11.

Dans ce cas, l'augmentation d'impédance relative au piégeage cellulaire est faible. Ceci est dû au faible nombre de cellules greffées à la surface de la microélectrode, comme le confirment les images correspondantes (Figure IV-12). Néanmoins, on observe un comportement extrêmement erratique, alternant entre augmentation et diminution du module d'impédance. L'augmentation pourrait provenir de la sédimentation des cellules pendant les 30 min de circulation, ou d'interactions non spécifiques. De même, on constate pour de très hautes concentrations en cellules, une diminution de l'impédance. Ces variations pourraient être dues soit au décollement d'amas cellulaires formés par interactions non spécifiques soit à une déstructuration de la couche de fonctionnalisation. En effet, à fortes concentrations cellulaires, le fait de faire passer en continu des cellules n'adhérant pas à la surface fonctionnalisée pourrait déstructurer l'édifice d'accroche (MUA, Avidine, C-di-AMP) par arrachement de complexes biologiques (type cellules/oligomères), libérant ainsi des zones proches de la microélectrode. De plus, on observe également une diminution du module d'impédance pour les très faibles concentrations (10 cellules/mL), probablement due au bruit de fond.

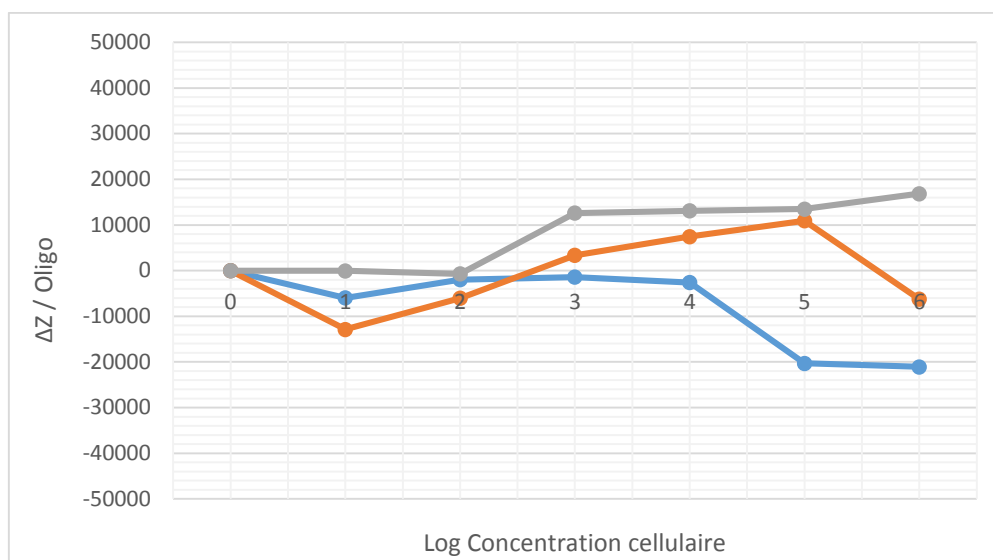


Figure IV-11 : Variation du module de l'impédance mesurée à 100 Hz par rapport à la couche d'oligomères pour 3 puces fonctionnalisées c-di-AMP après incubation en présence de suspensions de différentes concentrations en CHO ne surexprimant pas A2a

D'autre part, comme le montre les images correspondantes (Figure IV-12) le faible nombre de cellules piégées dans l'espace inter-électrode plaide également en faveur d'une fonctionnalisation de la SU8 par l'oligomère plutôt qu'une interaction SU8/cellules dans le cas des cellules CHO-A2a (Figure IV-10).

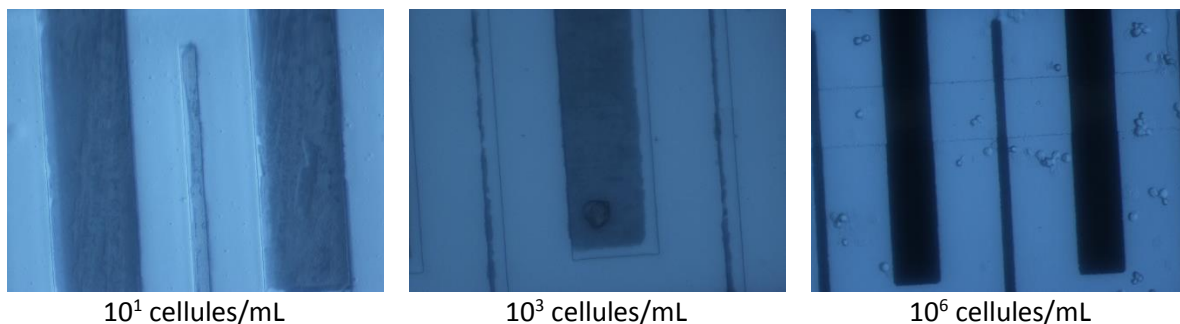


Figure IV-12 : Photo des électrodes fonctionnalisées ci-di-AMP prises après incubation des électrodes en présence de différentes concentrations de cellules CHO n'exprimant pas A2a, Grossissement x 20

4.1.3. Analyse de mélanges

Afin de confirmer ce résultat, les mêmes analyses ont été réalisées en alternant la nature ainsi que la concentration des cellules circulant dans la canalisation. Ainsi les systèmes suivants ont été incubés successivement sur les électrodes :

- A = CHO-A2a 10^1 cellules/mL
- B = CHO-A2a 10^1 cellules/mL + CHO 10^1 cellules/mL
- C = CHO-A2a 10^3 cellules/mL

- D = CHO-A2a 10^3 cellules/mL + CHO 10^3 cellules/mL
- E = CHO-A2a 10^5 cellules/mL
- F = CHO-A2a 10^5 cellules/mL + CHO 10^5 cellules/mL
- G = CHO-A2a 10^7 cellules/mL

Cette étude a pour but de caractériser l'impact de CHO n'exprimant pas A2a dans une population de CHO-A2a sur la sensibilité du dispositif. Compte tenu de la multitude de phénomènes pouvant se produire, l'évolution du module de l'impédance a été mesurée à trois fréquences différentes : 1 kHz, 100 Hz et 200 mHz. Les résultats obtenus sont présentés Figure IV-13.

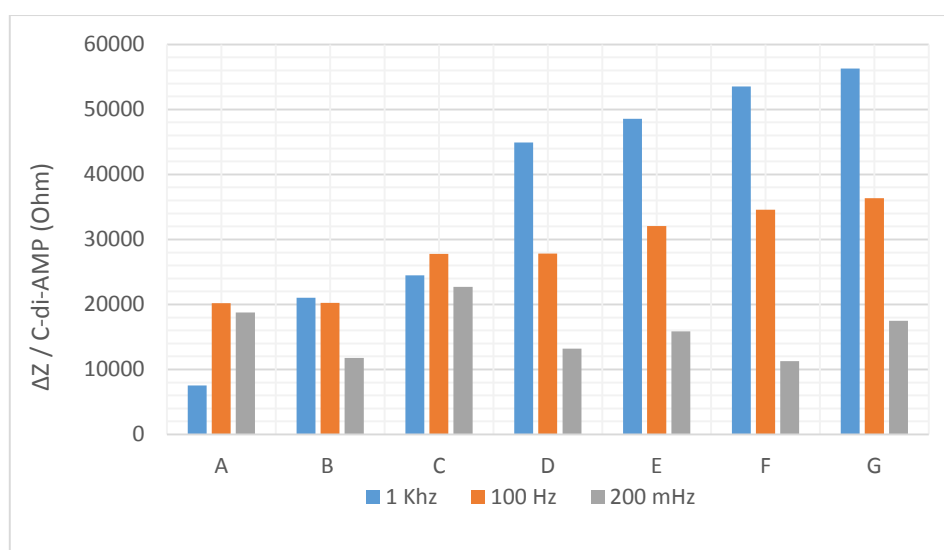


Figure IV-13 : Graphique représentant l'évolution du module d'impédance, en mode faradique, pour différents mélanges cellulaires (CHO avec/sans A2a), mesurées à trois fréquences différentes : 1 kHz, 100 Hz, 200 mHz

Les mesures des variations d'impédance relevées à 100 Hz sont cohérentes avec les expériences précédentes. En effet, l'ajout de cellules CHO-A2a engendre bien une augmentation de la variation de l'impédance, d'autant plus importante que la quantité de cellules augmente, alors qu'aucune augmentation supplémentaire n'est enregistrée lorsque ces cellules sont mélangées à des CHO n'exprimant pas A2a. Ces expériences confirment bien la spécificité de l'interaction du récepteur A2a avec le ligand c-di-AMP. Une légère augmentation qui pourrait être dû à des phénomènes d'empilement des cellules est observée à hautes concentrations (expérience E et F).

La variation du module d'impédance mesurée à 1 kHz augmente quant à elle de manière constante avec la concentration cellulaire globale. Ce phénomène pourrait provenir du fait qu'à hautes fréquences, le régime capacitif domine et la partie imaginaire de l'impédance varie fortement. Ainsi, la variation du module d'impédance à cette fréquence dépend directement du nombre de cellules en solution sans tenir compte de leur nature (ensemble d'espèces chargées).

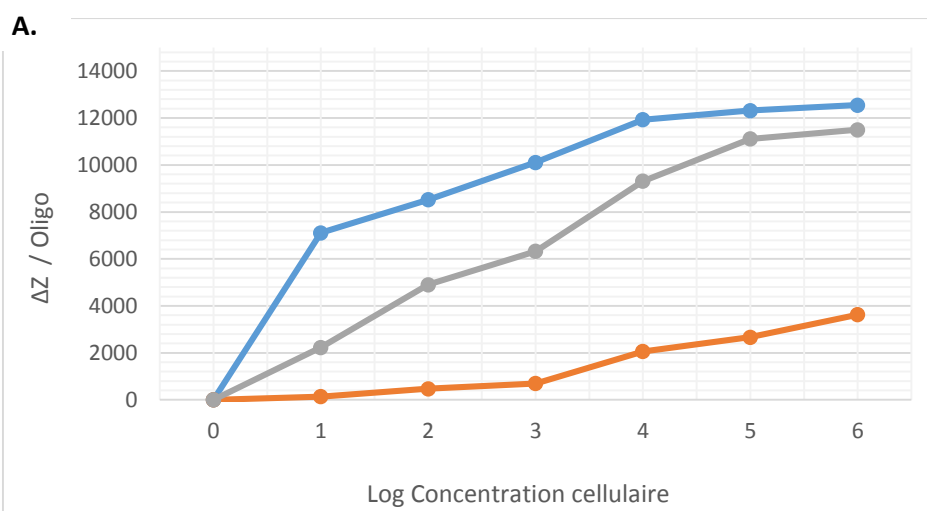
En ce qui concerne les variations du module d'impédance enregistrées à 200 mHz, de manière totalement inattendue, l'impédance augmente pour les solutions contenant seulement des CHO- A2a et diminue pour les mélanges des deux types cellulaires, comme si la présence de cellules sans A2a gênait les interactions c-di-AMP/CHO- A2a ou la diffusion de cellules.

Cependant, au vu de la complexité des multiples mécanismes d'interactions pouvant intervenir dans ce cas, l'interprétation des différentes variations du module d'impédance aux trois fréquences retenues, reste complexe et nécessite d'être approfondie.

4.2. Mesures d'impédance en mode non faradique

Afin de s'assurer que la présence de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans le milieu de mesure n'influence pas les interactions entre le c-di-AMP et les récepteurs A2a, ou ne modifie pas la cellule elle-même, les mêmes analyses ont été réalisées dans les mêmes conditions mais en l'absence de sonde redox, le milieu de mesure étant alors constitué de PBS (pH = 7,4). Les résultats obtenus avec les deux types de cellules, c'est-à-dire exprimant ou non A2a, sont présentés Figure IV-14.

Comme le montre cette figure, exceptée dans le cas d'une puce (ligne orange), on observe bien une augmentation du module de l'impédance en fonction de la concentration en cellules pour les cellules exprimant A2a (Figure IV-14-A) alors que l'augmentation est faible voire négative dans le cas des cellules ne surexprimant pas A2a (Figure IV-14-B). Cependant il apparaît clairement que les variations d'impédance sont dans ce cas bien inférieures à celles enregistrées dans le cas des mesures effectuées en mode faradique. En effet, la variation du module d'impédance atteint dans ce cas 15 k Ω contre 50 k Ω en mode faradique. Ces résultats proviennent du fait qu'en l'absence de sonde redox les courants sont déjà très faibles et donc seront très peu impactés par la présence des cellules.



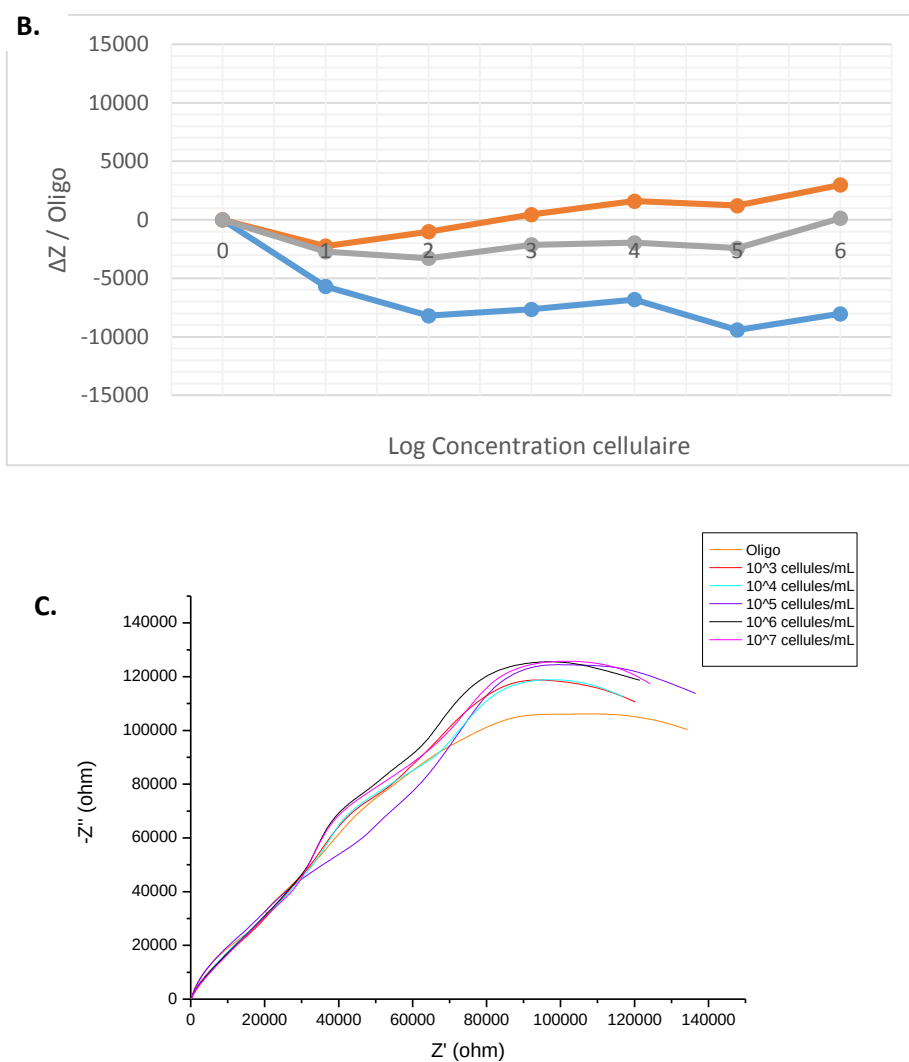


Figure IV-14 : Variation du module de l'impédance mesurée à 100 Hz par rapport à la couche d'oligomères en mode non faradique pour 3 puces fonctionnalisées c-di-AMP après incubation en présence de suspensions de différentes concentrations en CHO surexprimant (A) ou ne surexprimant pas (B) A2a, C- Exemple de diagramme de Nyquist obtenu en mode non faradique en présence de cellules CHO-A2a

La présence de cellules a également été contrôlée par microscopie. Comme le montrent les images correspondantes l'absence de ferri-ferrocyanure n'engendre aucune modification vis-à-vis du piégeage et des cellules (Figure IV-15).

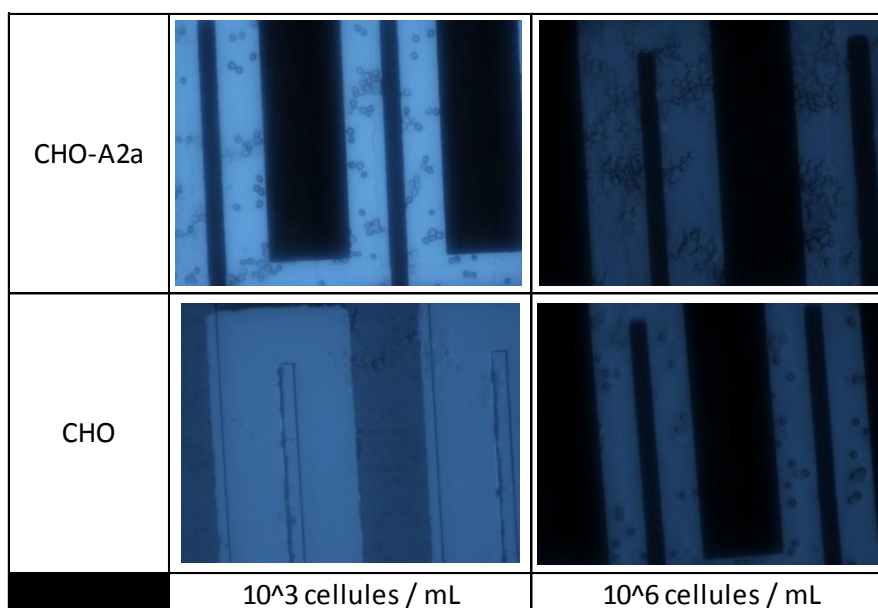


Figure IV-15 : Photo des électrodes fonctionnalisées c-di-AMP prises après incubation des microélectrodes en présence de suspensions cellulaires contenant CHO-A2a et CHO en absence de ferrocyanure, Grossissement x 20

5. Compétition d'interactions au récepteur A2a entre le c-di-AMP et des molécules libres

Comme la majeure partie des autres GPCR, les récepteurs A2a peuvent se lier à des ligands qui activent (agonistes) ou inhibent (antagonistes) leurs signalisations. Les antagonistes se divisent en deux catégories :

- les antagonistes neutres, qui sont seulement en concurrence pour le site de liaison avec les agonistes, sans émettre de signalisation.
- les agonistes inverses, qui eux émettent un signal opposé au récepteur.

Des études ont montré que le c-di-AMP serait un agoniste inverse de A2a et se comporterait comme le ZM 241385, mais la preuve définitive d'une liaison similaire de ces deux ligands reste encore à démontrer¹⁴. La structure cristallographique récemment résolue, a révélé que A2a comprend sept domaines transmembranaires et plusieurs boucles extracellulaires, formant un site complexe de liaison aux ligands dans lequel trois résidus d'acides aminés forment des liaisons critiques avec des ligands agonistes et / ou antagonistes. En raison de sa structure tridimensionnelle complexe, qui nécessite une insertion dans une membrane cellulaire, A2a n'interagit seulement avec ces ligands que lorsqu'il est exprimé à la surface cellulaire.

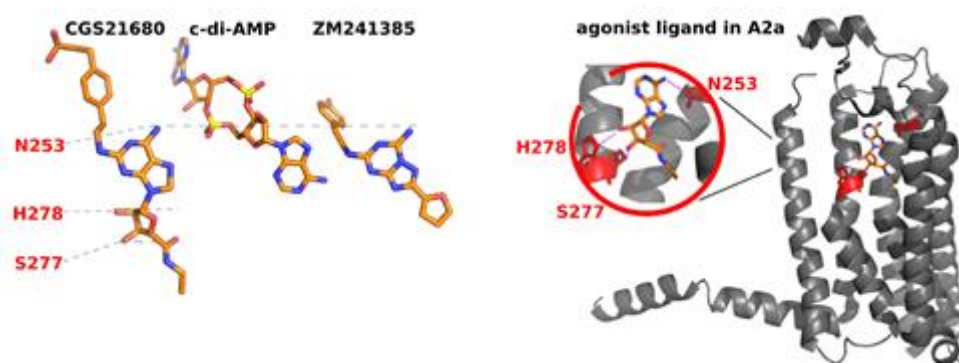


Figure IV-16 : Structure des c-di-AMP, de l'agoniste A2a (CGS21680) et de l'agoniste inverse (ZM241385). Le ligand c-di-AMP est représenté dans sa configuration de liaison à une A2a GPCR. La structure tridimensionnelle du complexe récepteur A2a/agoniste est représentée sous sa forme active (PDB code 2YDV). Les liaisons ligand/A2a sont ici représentées en rouge

Le ZM 241385 est une molécule agoniste inverse du récepteur adénosine A2a. Cette molécule va interagir avec le récepteur membranaire et bloque ou diminue l'effet physiologique de la molécule cible. L'antagoniste ne possédant pas de propriétés sur ce site de fixation (récepteur) empêche la fixation d'un ligand endogène.

Afin de démontrer la capacité des mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique à mettre en évidence l'effet de compétition vis-à-vis de l'interaction cellules-ligands les mêmes études ont été réalisées après incubation des cellules en présence de différents agonistes.

5.1. Cas du ZM 241385

Pour ces tests de compétition entre le c-di-AMP et le ZM 241385, les microélectrodes interdigitées de trois dispositifs microfluidiques ont été fonctionnalisées par greffage de c-di-AMP, comme décrit précédemment. Les mesures d'impédance ont été réalisées après passage d'une concentration de cellules de 10^5 CHO-A2a/mL ayant été préalablement incubées en fluide pendant 30 minutes en présence de différentes concentrations en ZM 241385 : 1, 5, 20, 50 et 100 mM. Les variations d'impédance mesurées pour 3 puces différentes sont résumées Figure IV-17. Toutes les mesures impédimétriques ont été réalisées comme précédemment en mode faradique dans une gamme de fréquence de 50 kHz à 100 mHz au potentiel d'équilibre pour une amplitude de 10 mV.

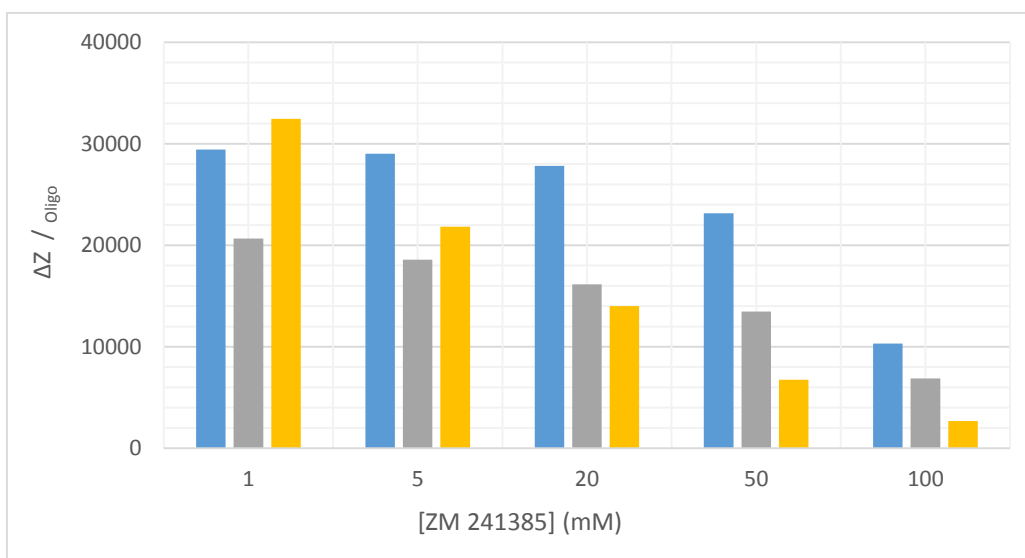


Figure IV-17 : Variation du module d'impédance à 100 Hz pour des électrodes fonctionnalisées par c-di-AMP après passage de 10^5 CHO-A2a/mL ayant été préalablement incubée en fluide en présence de différentes concentrations en ZM 241385 : 1, 5, 20, 50 et 100 mM

La variation du module d'impédance, représentative du nombre de cellules CHO-A2a fixées aux microélectrodes interdigitées fonctionnalisées c-di-AMP, décroît avec l'augmentation de la concentration du compétiteur ZM 241385. Cette réduction de ΔZ s'explique par l'augmentation des interactions entre le ZM 241385 et les récepteurs A2a des cellules CHO-A2a en solution, réduisant ainsi les possibles futures interactions avec le c-di-AMP. Ce résultat démontre que ces deux agonistes inverses sont en compétition pour des liaisons avec le récepteur A2a.

5.2. Cas du CGS 21680

Les mêmes expériences ont été réalisées après incubation en présence d'un agoniste afin d'étudier une possible influence sur les interactions récepteur A2a/c-di-AMP, le CGS 21680. Les mesures d'impédance ont été réalisées après passage d'une concentration cellulaire de 10^5 CHO-A2a/mL ayant été préalablement incubée en fluide 30 min en présence de différentes concentrations en CGS 21680 : 1, 5, 20, 50 et 100 mM. Les variations d'impédance correspondantes mesurées à 100Hz sont présentées Figure IV-18.

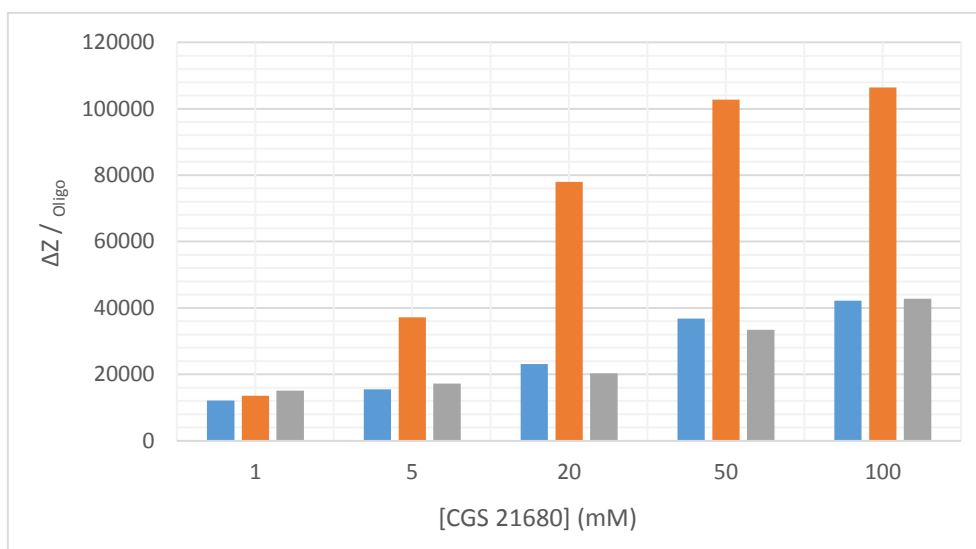


Figure IV-18 : Variation du module d'impédance à 100 Hz pour des électrodes fonctionnalisées par c-di-AMP après passage de 10^5 CHO-A2a/mL ayant été préalablement incubée en fluide en présence de différentes concentrations en CGS 21680: 1, 5, 20, 50 et 100 mM

Contrairement aux résultats obtenus dans le cas de l'agoniste inverse ZM 241385, l'incubation préalable des cellules CHO-A2a avec le CGS 21680 n'induit pas de diminution de l'impédance lorsque la concentration en agoniste augmente. Il n'existe donc pas de compétition pour le récepteur A2a entre le c-di-AMP et cette molécule agoniste. De plus, on peut même remarquer une augmentation du module d'impédance et donc de l'interaction des CHO-A2a avec c-di-AMP en présence de cette molécule agoniste. Le CGS 21680 tendrait donc bien à favoriser les liaisons entre les récepteurs A2a et le c-di-AMP.

6. Discussions

Cette étude montre que la spectroscopie d'impédance électrochimique, utilisant des dispositifs microfluidiques, peut être mise en œuvre pour l'analyse d'interactions moléculaires entre un ligand et un récepteur cellulaire de surface. Bien que l'analyse de ces types d'interactions soit généralement difficile, certaines méthodes comme la SPR permettent ce genre d'étude, mais nécessitent une quantité significative de cellules et d'être adaptées aux cellules vivantes¹⁵. De plus, les très faibles valeurs du rapport [masse moléculaire de ligands / poids moléculaire du récepteur] réduisent la sensibilité de cette méthode, en plus de la difficulté à manipuler les récepteurs tels que les GPCR profondément insérés dans la membrane plasmique.

Ces études représentent un des premiers travaux sur les petits ligands non protéiques, car en dépit d'être un dinucléotide (<1kDa), le c-di-AMP forme de manière efficace des liaisons avec des cellules vivantes hébergeant son récepteur. Compte tenu du peu de liaisons possibles

avec les récepteurs libres des cellules CHO, les résultats ouvrent un champ très large en termes d'applications basées sur les ligands de faibles poids moléculaires. Les GPCR, qui chez les humains englobent environ 800 récepteurs, représentent une famille de cibles très sujettes au développement de médicaments. Ils représentent une gamme très variée de ligands à faible ou fort poids moléculaires, à caractère agoniste ou antagoniste. C'est pourquoi, la possibilité de détecter par SIE les cellules qui lient ces ligands ouvrent de nouvelles perspectives. En effet, de tels dispositifs microfluidiques peuvent être multipliés dans des microplaques de culture de manière à permettre des expériences de criblage de liaisons moléculaires de cellules vivantes dans un milieu compatible avec une culture de cellules *in vitro*.

De plus, la possibilité de développer avec ce type de biocapteur des tests de compétition entre ligands à très forte sensibilité, constitue un avantage majeur dans le cadre d'étude d'interactions moléculaires sur des cellules vivantes. Jusqu'ici, ces tests de compétition avaient été réalisés par l'intermédiaire de radiotraceurs ou de déplacements de sonde fluorescente ou luminescente. Ces méthodes sont très instructives sur les fragments structuraux respectifs de ligand ainsi que des récepteurs impliqués dans l'interaction. Avoir réussi à démontrer la compétition entre le c-di-AMP et un agoniste inverse du récepteur A2a par SIE contraste avec les difficultés rencontrées avec d'autres méthodes de cytométrie en flux ou de déplacement d'un ligand fluorescent en raison d'artefacts liés à l'utilisation de fluorochrome¹⁶.

Les paramètres présentés dans notre étude pourraient également être modifiés de manière à favoriser la concurrence des récepteurs à la place de la concurrence de ligands, en combinant dans la solution des cellules avec et sans récepteur. Diverses variantes de combinaisons de cellules peuvent être appliquées dans des essais de compétition connexes, avec comme exemples des cellules cancéreuses exprimant le récepteur de type sauvage par rapport à des cellules exprimant le récepteur mutant.

La performance de l'immunocapteur est clairement représentée ici par la compétition entre ligands pour la liaison à l'A2a de la surface cellulaire (concurrence entre deux agonistes inverses, absente avec l'agoniste). Ce type d'interaction constitue un premier rapport démontrant qu'une surface cellulaire couplée GPCR-G α s contrôle l'apoptose des cellules humaines. Il est généralement rapporté que ce couplage délivre un signal tonique agissant sur une fonction homéostatique des cellules vivantes, un signal de pro-survie^{17,18}. Ces conclusions apparemment contradictoires sont en fait pleinement compatibles avec les modèles moléculaires actuels d'activité GPCR. En effet, la plupart des GPCR alternent continuellement entre une conformation active et inactive, dans laquelle seule la conformation active délivre un signal¹⁹. Par conséquent, l'oscillation entre l'état actif et inactif du GPCR fournit un signal tonique aux cellules favorisant leur survie. Cependant, en présence de ligands, cet équilibre est biaisé : les agonistes se lient à la forme active et favorisent le signal, alors que les antagonistes ou agonistes inverses se lient à la forme inactive et inhibent le signal. Parmi les antagonistes, les antagonistes neutres rivalisent avec les agonistes pour les sites de liaison,

mais sans perturber le signal. Au contraire, les agonistes inverses, ne rentrent pas en compétition avec les agonistes et induisent un signal opposé. Ici, le c-di-AMP se rapproche plus du comportement d'un agoniste inverse que d'un antagoniste neutre, car il n'entre pas en concurrence avec le CGS 21680.

Les mesures impédimétriques ont donc permis de différencier les différentes sous-catégories de ligands antagonistes d'une GPCR de surface cellulaire. De plus, l'augmentation des liaisons entre l'agoniste inverse et les CHO-A2a en présence d'un agoniste, le CGS 21680, dévoile une coopération allostérique entre ces deux types opposés de ligands, encore insoupçonnée. Cette dernière remarque restant à vérifier, les premières hypothèses pourraient se rapprocher d'une oligomérisation de GPCR actifs, ou d'une promotion des sites de liaisons des GPCR monomériques, liés aux agonistes inverses.

Cette technologie présente donc plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes impliquant des essais fonctionnels des réponses biologiques²⁰.

Bibliographie

- ¹ Cui X., Pei R., Wang Z., Yang F., Ma Y., Dong S., Yang X., Layer-by-layer assembly of multilayer films composed of avidin and biotin-labeled antibody for immunosensing. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, 18(1), 59-67.
- ² Pesavento C., Hengge R., Bacterial nucleotide-based second messengers, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, 12(2), 170-176.
- ³ Chen Z.H., Schaap P., The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*, *Nature*, 2012, 488, (7413), 680-683.
- ⁴ Tosolini M., Pont F., Bétous D., Ravet E., Ligat L., Lopez F., Poupot M., Poirot M., Pérouzel E., Tiraby G., Verhoeyen E., Fournié J.-J., Human Monocyte Recognition of Adenosine-Based Cyclic Dinucleotides Unveils the A2a G α s Protein-Coupled Receptor Tonic Inhibition of Mitochondrially Induced Cell Death, *Mol. Cell. Biol.*, 35, 479–495.
- ⁵ Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W.-S., Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells — 20 Years and Counting, *CHO Consortium SBE Special Section*, 40-47.
- ⁶ Ouerghi O., Touhami A., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Ouada H.B., Cosnier S., Impedimetric immunosensor using avidin-biotin for antibody immobilization, *Bioelectrochemistry*, 2002, 56(1-2), 131-133.
- ⁷ Schetters H., Avidin and streptavidin in clinical diagnostics, *Biomol. Eng.*, 1999, 16(1-4), 73-78.
- ⁸ Airene K.J., Marjomaki V.S., Kulomaa M.S., Recombinant avidin and avidin-fusion proteins, *Biomol. Eng.*, 1999, 16(1-4), 87-92.
- ⁹ Bayer E.A., Ben-Hur H., Wilchek M., A sensitive enzyme assay for biotin, avidin, and streptavidin, *Anal. Biochem.*, 1986, 154(1), 367-370.
- ¹⁰ Sugawara K., Kato R., Shirotori T., Kuramitz H., Tanaka S., Voltammetric behavior of avidin/biotin interaction at a biotin/ thionine modified Au electrode, *Electroanal. Chem.*, 2002, 536, 93-96.
- ¹¹ Lassetter T.L., Cai W., Hamers R.J., Frequency-dependent electrical detection of protein binding events, *Analyst.*, 2004, 129(1), 3-8.
- ¹² Ding S.-J., Chang B.-W., Electrochemical evaluation of avidin-biotin interaction on self-assembled gold electrodes, *Electrochimica Acta*, 2005, 50(18), 3660–3666.
- ¹³ Pei R., Cheng Z., Wang E., Yang X., Amplification of antigen-antibody interactions based on biotin labeled protein-streptavidin network complex using impedance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 16(6), 355-361.
- ¹⁴ Giaever I., Keese C. R., Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81(12), 3761-3764.

-
- ¹⁵ Lalonde S., Ehrhardt D. W., Loqué D., Chen J., Rhee S.Y., Frommer W.B., Molecular and cellular approaches for the detection of protein–protein interactions: latest techniques and current limitations, *The Plant Journal*, 2008, 53(4), 610-635.
- ¹⁶ Ciruela F., Jacobson K. A., Fernández-Dueñas V., Portraying G protein-coupled receptors with fluorescent ligands. *ACS chemical biology*, 2014, 9(9), 1918-1928.
- ¹⁷ Giaever I., Keese C. R., A morphological biosensor for mammalian cells, *Nature*, 1993, 366, 6455, 591-592.
- ¹⁸ Boucher M., Wann B. P., Kaloustian S., Cardinal R., Godbout R., Rousseau G., Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2a adenosine receptor agonist following myocardial infarction, *Apoptosis*, 2006, 11(7), 1067-1074.
- ¹⁹ Flock T., Ravarani C.N., Sun D., Venkatakrishnan A.J., Kayikci M., Tate C.G., Veprintsev D.B., Babu M.M., Universal allosteric mechanism for G [alpha] activation by GPCRs, *Nature*, 2015, 524(7564), 173-179.
- ²⁰ Inoue A., Ishiguro J., Kitamura H., Arima N., Okutani M., Shuto A., Higashiyama S., Ohwada T., Arai H., Makide K., Aoki J., TGF [alpha] shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation, *Nature methods*, 2012, 9(10), 1021-1029.

Conclusion générale

Ce mémoire présente plusieurs avancées technologiques sur le développement d'un immunocapteur basé sur des étapes de tri et de comptage par mesures impédimétriques de sous-populations cellulaires. Il démontre la compatibilité avec son intégration en système microfluidique et met en évidence la qualité de ses performances.

Après avoir testé plusieurs géométries de microélectrodes dans le cadre de la détection de monocytes infectieux après fonctionnalisation de la surface active par des anticorps spécifiques, le design le plus sensible se décrit sous la forme de structures interdigitées ayant un faible espace inter-électrode (50 μm). D'autre part les études réalisées en fonction de la surface des électrodes c'est-à-dire du nombre de brins, ont permis de montrer qu'il existe un seuil au-delà duquel chaque gamme de surface de l'immunocapteur est exploitable pour une gamme de concentration cellulaire donnée. Les résultats montrent une très bonne sensibilité et un seuil de détection bas et appellent à explorer des dimensions de dispositifs ultimes pour permettre de façon fiable la détection de très faibles concentrations (jusqu'à la cellule unique). Pour cela, il sera nécessaire de consolider les résultats obtenus à très faibles concentrations, de revoir et optimiser le design de l'électrode interdigitée. En particulier il serait intéressant de multiplier le nombre de brins tout en diminuant leur surface afin notamment d'augmenter les effets de bord.

De plus, afin d'augmenter la probabilité de piégeage des cellules sur la surface des électrodes, l'incorporation de microbobines magnétiques au voisinage des microélectrodes sera envisagée. En effet, dans ce cas les cellules préalablement marquées immunologiquement par des billes magnétiques pourront être spécifiquement attirées sur l'électrode. Afin d'obtenir davantage de renseignements sur les cinétiques de piégeage il serait intéressant de relier les variations d'impédance à une observation microscopique. L'utilisation du support mécanique décrit en fin de chapitre 3 pour les derniers designs de microélectrodes testés, permet justement une observation en temps réel et des analyses devront être réalisées dans ce sens. Il sera également nécessaire de travailler sur des échantillons réels afin de tester la sélectivité de notre système mais également d'évaluer les effets liés à la densité du milieu (masquage des électrodes, perturbation des trajectoires de piégeage, ...).

Enfin, le couplage du module de détection et comptage cellulaire sur électrodes fonctionnalisées au module de pré-tri magnétique décrit dans le chapitre 2 représente la majeure partie du travail à accomplir afin de réaliser un immunocapteur complet.

Au niveau des applications, les études présentées dans le chapitre 4 ont permis de démontrer la possibilité d'utiliser ces dispositifs intégrant des électrodes interdigitées pour l'analyse d'interactions moléculaires entre un ligand et un récepteur cellulaire de surface, le ligand

étant immobilisé sur la surface des électrodes. Ces études ont été menées dans le cadre de l'interaction de cellules CHO transfectées par une GPCR, A2a avec le ligand c-di-AMP. Les résultats sont très encourageants car ils ont permis de détecter des interactions pour de très faibles quantités de cellules. Il serait particulièrement intéressant à ce stade de l'étude de pouvoir déterminer les constantes d'association et de dissociation (k_{on} et k_{off}) afin de se rapprocher au plus près des capacités d'autres techniques comme la SPR.

Annexe 1 : Culture cellulaire des THP-1

La lignée THP-1 est dérivée de monocytes leucémiques humains du sang périphérique d'enfant âgé d'un an atteint de leucémie aigüe. C'est la lignée qui se rapproche le plus phénotypiquement et génétiquement des monocytes circulants, en vue de leurs nombreuses caractéristiques communes comme la phagocytose ou l'expression de récepteurs membranaires (CD14, CD16 par exemple).

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de cultures de 75 cm³ dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂. En l'absence de traitement de différenciation, ces cellules restent en suspension sous formes de grappes. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours en raison du temps de doublement des THP-1 (26 heures). La suspension est alors centrifugée pendant 5 min à 1600 tr/min, puis les cellules sont comptées et remises en suspension dans une nouvelle boîte de culture de manière à obtenir une concentration cellulaire de 5.10⁵ cellules/mL.

Le milieu de culture des THP-1 est composé de :

- 500 mL de milieu de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640,
- 50 mL de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min,
- 5 mL de bicarbonate de sodium à 7,5% (1,5 g/L),
- 5 mL de L-Glutamine à 200 mM,
- 5 mL d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) à 1 M,
- 5 mL de pyruvate de sodium à 100 mM,
- 5 mL de D-(+)-Glucose à 4,5 g/L,
- 17,4 µL de 2-Mercapto-Ethanol à 0,05 mM

Toutes les solutions sont filtrées (0,22 µm) avant d'être ajoutées au milieu RPMI.

Congélation-Décongélation des cellules THP-1 :

La décongélation des cellules est réalisée en plaçant un cryotube contenant les cellules dans un bain marie à 37°C pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite transférées dans 10 mL de milieu de culture.

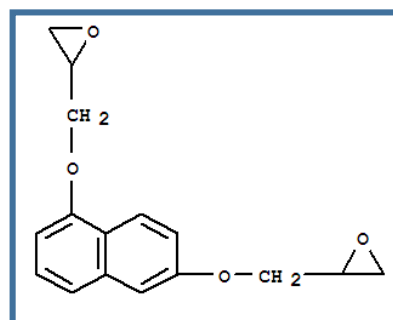
Le milieu de congélation utilisé comprend 90% de sérum de veau fœtal et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) stérile et filtré. Les cellules à congeler sont d'abord centrifugées pendant 5 minutes à 1600 tr/min. Le culot est ensuite repris dans 1 mL de milieu de congélation et après numérisation cellulaire, les cellules sont réparties dans les cryotubes de

manière à avoir environ 10^7 cellules/mL dans 1,5 mL de milieu de congélation. Les cryotubes sont ensuite conservés dans de l'azote liquide à -192°C .

Le comptage des cellules en suspension est effectué sur cellules de Mallassez (lame de verre gravée d'un quadrillage de 25 rectangles composés de 20 carrés de plus petites dimensions). Pour estimer la viabilité et la concentration des cellules, la suspension cellulaire est centrifugée, séparée du milieu de culture et re-suspendue dans 1 mL de milieu. 90 μL de bleu trypan sont alors mélangés à 10 μL des cellules en suspensions, puis la solution est homogénéisée. Environ 10 μL de ce mélange est alors déposé sur la cellule de Mallassez, le tout recouvert d'une lamelle. Les cellules vivantes et mortes (colorées en bleu) sont alors comptées au microscope optique (grossissement x40) pour 5 grands carrés.

Annexe 2 : Les films secs photosensibles : DF-1000 series

Ces films secs négatifs à base époxy sont fabriqués par Engineered Materials Systems et vendus en rouleaux (le film sec est contenu entre deux liners). Les épaisseurs disponibles sont comprises entre 5 et 50 μm . La formule du DF-1050 est présentée ci-contre. Par rapport aux produits utilisés en salle blanche, la série des films DF-1000 présente plusieurs avantages, comme un coût relativement bas ainsi qu'une mise en œuvre rapide.



Produits	SU-8 (3050) (50 μm)	TMMF (45 μm)	DF-1050 (50 μm)
Tarif d'une couche (pour un wafer 4")	16 euros	12 euros	1,6 euros
Durée du process pour une double couche	6h30	2h30	2h10

Tableau A2-1 : Comparaison du DF-1050 avec la SU-8 (3050) et le TMMF

➤ Contraintes résiduelles du matériau :

Les contraintes résiduelles dans les films DF sont du même ordre de grandeur que dans la résine SU8.

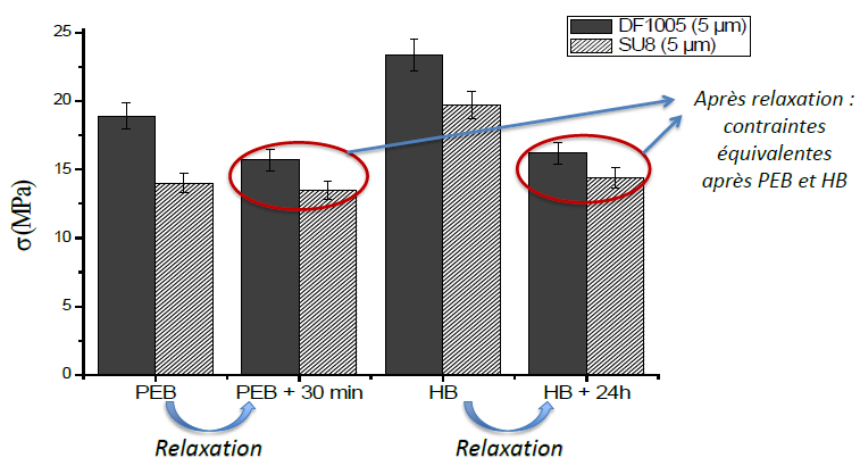
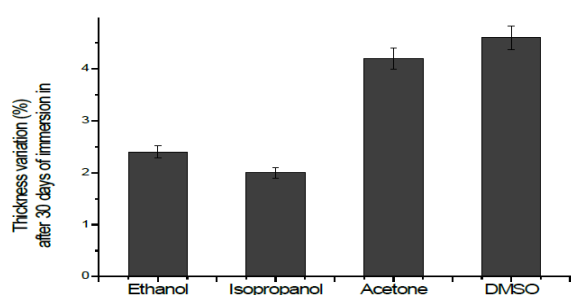


Figure A2-1 : Comparaison des contraintes résiduelles du DF-1005 et de la SU-8

➤ Résistance chimique :

Une couche réticulée et recuite (PEB+HB) de DF-1050 a été immergée pendant 30 jours dans 4 solvants.



- Résistance de microcanaux 2D à la pression de liquides (alcool acétone) : **aucune délamination** visible jusqu'à 3,5 bars (limitation due aux connecteurs fluidiques).

- **5% de variation d'épaisseur** et pas de fissures visibles au microscope.

Figure A2-2 : Tests de résistance chimique du DF-1050 dans 4 solvants différents

➤ Propriétés optiques :

Ces films secs sont sensibles à 365 nm et légèrement coloré après insolation et recuit.

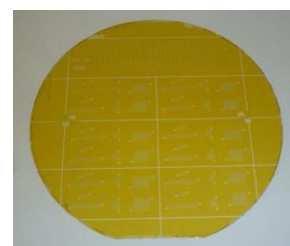
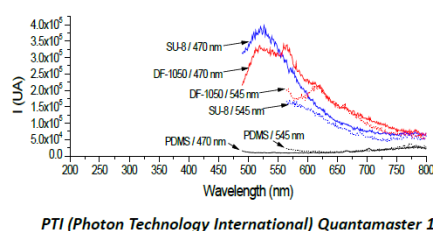
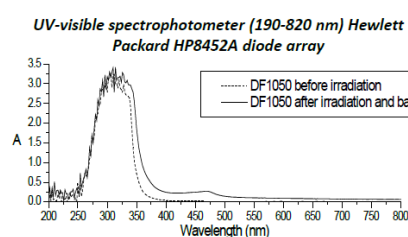


Figure A2-3 Spectres d'absorption et d'émissions en fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}}$: à 470 et 545 nm, $\lambda_{\text{émission}}$: à partir de 475 et 550 nm) des films DF-1000

➤ Biocompatibilité :

Ces films secs conviennent aussi à des applications biologiques (> 70% : pas d'effet toxique). Des études de cytotoxicité ont été réalisées sur DF-1050 selon le protocole ISO 10993-5 :

- Cellules L-929 de souris (fibroblaste)
- Un film de polyuréthane (0.1% zinc diethyldithiocarbamate) comme contrôle positif et un polyéthylène haute densité ont été utilisés comme contrôle négatif
- Étude MTS pour quantifier le taux de cellules viables après exposition aux trois matériaux

Matériaux	% de cellules vivantes après exposition
Contrôle positif	3,9 %
Contrôle négatif	97,1 %
DF-1050	93 %

Tableau A2-2 : Comparaison du DF-1050 avec un film de polyuréthane et de polyéthylène

➤ **Exemple de réalisation : micromélangeur 3D**

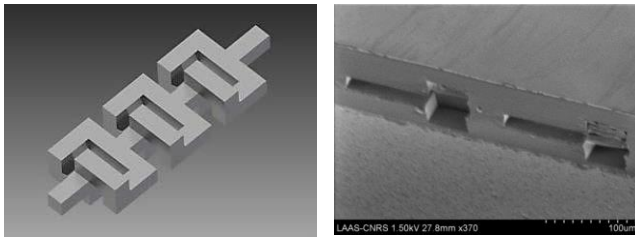


Figure A2- 4 : Schéma d'un micromélangeur et image MEB en coupe

5 couches nécessaires :

- Un premier niveau non structuré
- 3 niveaux pour le réseau 3D de microcanaux
- Un dernier niveau avec les ouvertures fluidiques

➤ **Conclusions :**

Ces films secs présentent de hauts rapports de forme: 7:1 pour des “lignes” et 5:1 pour des “ouvertures” ainsi qu’une très bonne stabilité chimique. De plus, leurs faibles autofluorescences les rendent compatibles avec la plupart des expérimentations utilisant la détection par fluorescence. Ces matériaux biocompatibles conviennent parfaitement aux applications biologiques ainsi qu’à la fabrication de dispositifs microfluidiques 3D.

Title: Microfluidic device for quantification of subpopulations of cells.

Abstract

The quantitative detection of specific cells is usually carried out by flow cytometry due to its high sensitivity and reliability, however, this technique is not suited for routine screening and point-of-care diagnostics. Electrochemical methods, as electrochemical impedance spectroscopy have gained interest mainly due to a label-free detection and their miniaturization capability required for integration on chip. Furthermore, recent advances in microfabrication based technologies have allowed to develop micron-sized electrodes whose main advantages over conventional electrodes are higher impedances due to smaller currents and the possibility of being integrated inside microfluidic channels. The aim of the present work was the realization and the optimization of microfluidic devices with improved sensitivity targeting the immuno-trapping and counting of pro-inflammatory monocytes as infection markers. Taking into account the influence of the surface coverage on the sensitivity, different geometries were tested. The best sensitivities and reproducibility were recorded in the case of interdigitated micro-electrodes with weak inter-electrodes gap (50 μm). Moreover, experiments carried out with different surfaces demonstrated that there was a threshold beyond which a surface is exploitable for a given slice of concentration. Such microfluidic devices allowed to reach a detection limit around 10 cells/mL.

Furthermore, due to the high sensitivity recorded, the devices were also tested to detect ligand binding by cell receptors. These studies have allowed to demonstrate the interaction of CHO-A2a with c-di-AMP for low cell concentrations.

Keywords: Electrochemical Impedance Spectroscopie, immunosensor, diagnostic, microfluidic, interdigitated microelectrodes, cell sorting.

Auteur : Rémi Manczak

Titre : Dispositif microfluidique pour la quantification de sous-populations de cellules.

Directeurs de thèse : Docteur Karine Reybier – Docteur Anne-Marie Gué

Lieu et date de soutenance : Faculté de Pharmacie, Salle du Conseil, Université Toulouse III Paul Sabatier, le mercredi 27 janvier 2016.

Résumé :

La détection quantitative de cellule est généralement réalisée par cytométrie en flux en raison de sa haute sensibilité, cependant cette technique est difficile à mettre en œuvre pour des analyses de routine ou des analyses au chevet du patient. Les méthodes électrochimiques et en particulier la spectroscopie d'impédance électrochimique ont gagné en popularité en raison de la possibilité de réaliser des analyses sans marquage et de miniaturiser les systèmes d'analyse pour une intégration sur puce. De plus, les avancées récentes dans le domaine des technologies de microfabrication ont permis de développer des électrodes micrométriques ayant de nombreux avantages tels que des hautes impédances dues à des courants très faibles ainsi que la possibilité de les intégrer dans des systèmes microfluidiques. L'objectif de ce travail de thèse se concentre sur la réalisation et l'optimisation de dispositifs microfluidiques contenant les systèmes d'électrodes pour le piégeage immunologique et le comptage impédimétrique de monocytes pro-inflammatoires, marqueurs d'une infection. Compte tenu de l'influence du taux de recouvrement de la surface sur la sensibilité, plusieurs géométries d'électrodes ont été testées. Les meilleures sensibilités et reproductibilités ont été obtenues dans le cas de microélectrodes interdigitées ayant de faibles espaces inter-électrodes (50 μm). D'autre part les études ont également permis de montrer dans ce cas, que la gamme de concentration cellulaire pour laquelle la sensibilité était maximale dépendait de la surface de l'électrode. Les électrodes de plus petites surfaces ont permis d'atteindre une limite de détection inférieure à 10 cellules/mL. De plus, compte tenu de la grande sensibilité des dispositifs ainsi réalisés, ces systèmes ont également été testés pour la caractérisation d'interaction récepteurs-ligands à partir de cellules entières. Ces études ont permis de mettre en évidence l'interaction de cellules CHO exprimant le récepteur A2a à des ligands c-di-AMP pour de très faibles concentrations cellulaires.

Mots-clés : Spectroscopie d'Impédance Electrochimique, immunocapteur, diagnostic, microfluidique, microélectrodes interdigitées, sensibilité.

Laboratoire de Pharmacochimie et de Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV), UMR 152, IRD, Université Paul Sabatier, 35 chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse.

Laboratoire d'Analyse et d'architecture des systèmes (LAAS-CNRS), 7 Avenue du Colonel Roche, 31400 Toulouse.