



HAL
open science

**Conception et réalisation de microdispositifs
électrochimiques, pour l'analyse de l'activité
bioénergétique de mitochondries isolées, dans le cadre
de la mise au point de traitements innovants des
leucémies aiguës myéloïdes**

Gabriel Lemercier

► **To cite this version:**

Gabriel Lemercier. Conception et réalisation de microdispositifs électrochimiques, pour l'analyse de l'activité bioénergétique de mitochondries isolées, dans le cadre de la mise au point de traitements innovants des leucémies aiguës myéloïdes. Biotechnologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30054 . tel-02059371v1

HAL Id: tel-02059371

<https://theses.hal.science/tel-02059371v1>

Submitted on 6 Mar 2019 (v1), last revised 13 Aug 2018 (v2)

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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue le 23/05/2018 par :

Gabriel Lemercier

Titre :

Conception et réalisation de microdispositifs électrochimiques, pour l'analyse de l'activité bioénergétique de mitochondries isolées, dans le cadre de la mise au point de traitements innovants des leucémies aiguës myéloïdes

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biotechnologies

Unités de recherche :

LAAS-CNRS (UPR-8001) et CRCT-INSERM (UMR-1037)

Directeurs de Thèse :

Jérôme Launay et Jean-Emmanuel Sarry

Jury :

Pascal Mailley
Rodrigue Rossignol
Rosaria Ferrigno
Louis Casteilla
Stéphane Arbault
Pierre Temple Boyer
Michel Rigoulet
Jean-Emmanuel Sarry
Jérôme Launay

Directeur de Recherche
Directeur de Recherche
Professeur des Universités
Directeur de Recherche
Directeur de Recherche
Directeur de Recherche
Professeur Émérite
Chargé de Recherche
Maître de Conférences

CEA, Grenoble
MRGM, Bordeaux
INL, Lyon
STROMALab
ISM, Bordeaux
LAAS, Toulouse
IBGC, Bordeaux
CRCT, Toulouse
LAAS, Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Invité
Directeur de Thèse
Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes parents, Chantal et Philippe, qui m'ont soutenu tant moralement que financièrement tout au long de mes très longues études. L'égalité des chances n'est qu'un vieux concept. Ma chance est d'avoir deux parents qui m'aiment et croient en moi. Mon frère Damien a beaucoup compté lui aussi, ma belle-mère Anne-Marie, mon beau-père Roland, mes quatre grands parents : Germaine, Bernard, Odile et Roger, mon oncle Philippe, ainsi que mes cousins et cousine : Joanie, Morgan-Hugo et Elsa.

Je tiens ensuite à remercier mes quatre directeurs de thèse. Les documents administratifs ne le mentionnent pas et eux-mêmes ne le reconnaissent pas, mais ils sont bien quatre à m'avoir encadré : M. Pierre Temple-Boyer, M. Jérôme Launay, M. Stéphane Arbault et M. Jean-Emmanuel Sarry, auxquels je devrais même ajouter un ou plutôt une cinquième : Mme Fadhila Sekli-Belaïdi. M. Pierre Temple-Boyer est à l'origine de mon recrutement, je ne comprends toujours pas pourquoi il m'a fait confiance. Peut-être qu'il se doutait que je m'apprêtais à m'investir plus que jamais auparavant dans la tâche qu'il avait alors décidé de me confier, ne serait-ce que pour lui exprimer ma gratitude. M. Jérôme Launay m'a poussé à exprimer mon potentiel en me remontant le moral régulièrement et en me faisant profiter de ses précieux conseils concernant la fabrication et la préparation des présentations. M. Stéphane Arbault a partagé son laboratoire et son savoir-faire analytique appliqué à l'analyse de l'activité mitochondriale. M. Jean-Emmanuel Sarry m'a transmis sa passion pour le métabolisme et toute l'équipe RESISTAML leur engagement sans limite pour l'amélioration de l'efficacité des traitements des leucémies. Enfin Mme Fadhila Sekli-Belaïdi est celle qui m'a directement montré comment s'y prendre en salle blanche et en salle de caractérisation électrochimique.

Merci aussi à M. Pascal Mailley et M. Louis Casteilla qui ont formé mon comité de suivi de thèse et ont accepté d'intégrer mon jury de soutenance. Leurs encouragements ont beaucoup compté.

Pour finir, merci à tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ces travaux de thèse. Ils sont nombreux et c'est à eux que l'on doit le niveau d'excellence des structures dans lesquelles j'ai eu la joie d'évoluer.

INTRODUCTION GENERALE	9
ONCOMETABOLISME ET LEUCEMIES AIGUËS MYELOÏDES	11
Introduction	12
I L'hématopoïèse normale	12
I.1 La moelle osseuse : siège de l'hématopoïèse	12
I.2 Les cellules souches hématopoïétiques	13
I.3 Le parcours de différenciation des cellules sanguines	13
II Les leucémies aiguës myéloblastiques	14
II.1 Les différents types de leucémies	14
II.2 Les leucémies en chiffres	16
II.3 La prise en charge des patients atteints de LAM	16
III L'oncométabolisme dans les LAM	18
III.1 Introduction de la notion d'oncométabolisme	18
III.2 Relations entre le métabolisme des blastes leucémiques et la chimiorésistance	20
III.3 Agir sur le métabolisme pour sensibiliser aux traitements	23
IV La mitochondrie	24
IV.1 Son origine	24
IV.2 Ses caractéristiques morphologiques	26
IV.3 La phosphorylation oxydative	29
IV.4 La production d'espèces réactives oxygénées	30
IV.5 Hétérogénéité mitochondriale au sein de la cellule unique	32
Conclusion	33
Bibliographie	35
LES METHODES ACTUELLES D'ANALYSE DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE	41
Introduction	42
I Les outils utilisés en routine dans les laboratoires de biologie : mesure de la consommation d'oxygène	42
I.1 L'électrode de Clark	42
I.2 L'Oroboros	44
I.3 Les Seahorse XF analyzers	45
I.4 Comparaison des différentes solutions	45
II Les outils utilisés en routine dans les laboratoires de biologie : mesure de la production d'espèces réactives oxygénées	46
II.1 Caractéristiques des principaux ROS étudiés	46
II.2 Liste des différentes approches	47
II.3 Description des méthodes de mesures optiques	48
II.4 Conclusion	51
III Etat de l'art des outils tendant vers l'analyse de la cellule unique par des méthodes électrochimiques	54
III.1 Ultramicroélectrodes insérées dans un capillaire en verre	54
III.2 Ultramicroélectrodes planaires	56

III.3 Micropuits instrumentés	57
III.4 Ultramicroélectrodes appliquées à la mesure d'espèces réactives oxygénées	60
Conclusion	61
Bibliographie	63
CONCEPTION DU MICRODISPOSITIF D'ANALYSE ÉLECTROCHIMIQUE	71
Introduction	72
I Les principes de l'électrochimie	72
I.1 La réaction électrochimique	72
I.2 Notions d'électrode et de potentiel d'électrode	73
I.3 Les modes de transport de la matière en solution	74
I.4 Régime stationnaire et régime transitoire	76
II La cellule électrochimique et l'ampérométrie aux ultramicroélectrodes	77
II.1 La cellule électrochimique	77
II.2 La chute ohmique et le montage à trois électrodes	79
II.3 Méthodes analytiques ampérométriques	80
II.4 Courants faradiques et capacitifs	80
II.5 La théorie des ultra-microélectrodes	81
III Théorie appliquée à la structure du micropuits sélectionnée	83
III.1 Choix de la configuration des micropuits instrumentés	83
III.2 Théorie de l'électrochimie appliquée aux UME intégrées dans un micropuits : le micro-disque encastré	83
III.3 Théorie de l'électrochimie appliquée aux UME intégrées dans un micropuits : le nano-anneau encastré	85
IV. Simulation	87
IV.1 Définition et validation du modèle de simulation	87
IV.2 Définition des paramètres géométriques de la structure pour l'optimisation du taux de collecte	89
IV.3 Mode générateur-collecteur	93
IV.4 Performances optimisées d'un réseau de micropuits instrumentés	95
Conclusion	99
Bibliographie	101
FABRICATION DES MICRODISPOSITIFS ÉLECTROCHIMIQUES ET DU SYSTEME ASSOCIE	103
Introduction : le système ElecWell de première génération	104
I Le système ElecWell de seconde génération	108
I.1 Adapter le microsystème à une solution commerciale	108
I.2 Définition de la nouvelle structure du micropuits	109
I.3 Matériaux isolants	109
I.4 Matériaux conducteurs	111
II Techniques de microfabrication associées	114
II.1 La photolithographie	114
II.2 Procédés additifs : dépôts de matériaux	114
II.3 Procédés soustractifs : la gravure et le « lift-off »	115

III Dessins des masques et réalisation technologique	116
III.1 Dépôts d'oxydes et métallisations	117
III.2 Passivation et ouverture des contacts des nanoélectrodes	119
III.3 Ouverture des contacts des microélectrodes et formation des micropuits	120
IV Etapes de fabrication hors salle blanche	126
IV.1 Assemblage	126
IV.2 Modification de la fluidique	126
IV.3 Validation du système complet	127
Conclusion	129
Bibliographie	131
CARACTERISATIONS ÉLECTROCHIMIQUES, MODIFICATIONS DES PROPRIETES DES SURFACES, ET APPLICATION A L'ANALYSE DU METABOLISME DE MITOCHONDRIES ISOLEES	133
Introduction	134
I Caractérisation des performances électrochimiques	134
I.1 Voltamogramme du platine	134
I.2 Détermination des surfaces actives	135
I.3 Influence de la distance centre-à-centre	137
I.4 Mode générateur-collecteur	138
II Modifications des propriétés des surfaces	139
II.1 Fabrication d'une UME de quasi-référence : électropolymérisation du pyrrole	139
II.2 Modification de l'électrode de travail : électrodépôt de noir de platine	140
II.3 Immobilisation d'anticorps	141
II.4 Couche anti-biofouling	144
III Application finale : analyse de l'activité métabolique de mitochondries isolées	146
III.1 Méthodes d'isolation	146
III.2 Remplissage des micropuits	148
III.3 Mesures optiques et électrochimiques	150
Conclusion	155
Bibliographie	157
CONCLUSION GENERALE	161
PERSPECTIVES	163
Bibliographie	167
TABLES DES FIGURES	169
RESUMES	181
Français	181
English	181

Introduction générale

Le monde occidental a connu à partir du XVIII^e siècle une révolution industrielle à l'origine d'un paradigme désormais largement répandu : plus on produit, plus on réduit les coûts de production. Nous vivons actuellement une nouvelle ère, celle de la révolution numérique. Depuis la machine inventée par Alan Turing pour déchiffrer l'Énigme allemande, les machines auxquelles on associe le terme « intelligent » sont de plus en plus sophistiquées et miniaturisées. Citons la loi de Moore selon laquelle le nombre de transistors pour une même surface double chaque année. La miniaturisation n'est en soi pas simplement un gain d'espace ou de puissance de calcul, cela constitue surtout un moyen de produire toujours davantage en gardant un coût de production quasi-constant. Vue d'un autre angle, la loi de Moore dit donc que le coût de production d'un transistor est divisé par deux chaque année. Voilà ce qui explique le déferlement actuel des objets connectés.

Les investissements colossaux consacrés au progrès de la technique nous ont rendu capables de travailler la matière à l'échelle nanométrique. Dans le domaine de la recherche scientifique, on choisit parfois de détourner la technique de son objectif habituel, pour fabriquer de nouveaux moyens d'explorations du monde qui nous entoure, à une dimension tendant vers l'infiniment petit. Parmi les terrains à explorer, il y en a un de particulièrement passionnant : le vivant. Les micro- et nano- technologies nous offrent la possibilité de fabriquer des objets dont les dimensions sont inférieures à celles d'une cellule unique. Elles représentent donc un moyen d'exploration à une échelle inédite.

L'objectif du grand projet collaboratif ONCODEVICE, mis en place entre le centre de recherche en cancérologie de Toulouse (CRCT-INSERM) et le laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes (LAAS-CNRS) par Pierre Cordelier et Anne-Marie Gué, est de favoriser l'émergence de technologies innovantes dans le domaine de l'oncologie. Différentes équipes de recherche ont alors décidé de s'associer pour mettre leurs savoir-faire en commun. Nous concernant, il s'agit des équipes RESISTAML et MICA. La première, dirigée par Jean-Emmanuel Sarry, est spécialisée dans l'étude des leucémies aiguës myéloïdes. La seconde, dirigée par Philippe Menini, est spécialisée dans le développement d'outils de détection d'espèces en phase gazeuse ou liquide. Les chercheurs Pierre Temple-Boyer et Jérôme Launay de l'équipe MICA travaillaient déjà sur le développement d'une nouvelle filière technologique, la filière ElecWell, prenant la forme de micropuits instrumentés de nano-électrodes et visant l'analyse de l'activité bioénergétique de mitochondries isolées, organites responsables du métabolisme cellulaire. Sur la base de la mise en évidence par l'équipe RESISTAML d'un lien direct entre le statut énergétique et métabolique des cellules leucémiques, et leur capacité à résister aux traitements actuels de chimiothérapie, un sujet de thèse a été proposé afin de poursuivre le développement de la filière technologique par la conception d'une nouvelle génération de nano-capteurs.

Ce mémoire a pour but de présenter les avancées obtenues au cours du projet MITAML. Il est organisé selon cinq chapitres.

La leucémie est parfois surnommée « cancer du sang ». Le premier chapitre explique le fonctionnement d'une hématopoïèse normale, avant de décrire la leucémie de manière globale, pour se focaliser sur celle de type aiguë myéloïde. Des données chiffrées concernant son incidence sont présentées tout comme les traitements actuels et les statistiques de survie des patients. On introduit ensuite la notion d'oncométabolisme, traduisant les relations intimes liant le métabolisme et la progression d'un cancer.

On montre qu'agir sur le métabolisme des cellules leucémiques est une approche innovante et prometteuse pour mieux combattre la leucémie. Puis, comme agir sur le métabolisme sous-entend agir sur la mitochondrie, les principales caractéristiques de cet organite sont décrites en détails.

Le second chapitre fait l'état de l'art des technologies associées ou associables à l'analyse de la fonction mitochondriale. On décrit dans un premier temps l'ensemble des solutions disponibles sur le marché et utilisées dans certains laboratoires de biologie, tandis que les solutions rapportées dans la littérature scientifique sont exposées dans un deuxième temps.

Le troisième chapitre traite de la conception du micro-dispositif. Les principes généraux de l'électrochimie analytique et des ultra-microélectrodes sont présentés. Ceux-ci sont ensuite appliqués dans le cadre d'un modèle de simulation développé au cours de la thèse, afin d'optimiser les performances des futurs composants de manière prédictive.

La fabrication des capteurs de nouvelle génération est le thème principal du quatrième chapitre. Il rapporte le choix des matériaux selon leurs caractéristiques, tout comme le choix des techniques associées pour leur mise en forme. S'en suit la description de la fabrication a proprement parlé, incluant le dessin des masques de photolithographie et la stratégie mise en œuvre pour former des cavités de trois micromètres de diamètre dans un empilement de matériaux variés. L'assemblage des composants et leur intégration dans un système complet offrant le couplage à la microscopie et à la fluïdique est aussi rapporté.

Pour finir, le cinquième chapitre expose les expériences menées. D'abord les composants sont caractérisés électrochimiquement afin de vérifier que leurs performances sont en accord avec celles prédites théoriquement. Ensuite, diverses stratégies sont mises en œuvre pour d'une part, rendre le capteur encore plus performant, et d'autre part, modifier les propriétés des surfaces dans le but de mieux maîtriser la manipulation des éléments biologiques. Enfin, on s'attarde à décrire en détails la configuration mise en œuvre lors des expériences impliquant des mitochondries, avant de présenter les résultats obtenus par voie optique et par voie électrochimique, sur une population isolée à partir d'un cœur de rat.

Chapitre 1

Oncométabolisme et Leucémies Aiguës Myéloïdes

Introduction

La leucémie traduit un dysfonctionnement de l'hématopoïèse, qui elle-même traduit le renouvellement permanent des cellules circulant dans le sang. La leucémie prend une forme différente chez chaque patient, c'est la raison pour laquelle on cherche à constituer des groupes selon certains critères, comme la ou les lignée(s) cellulaire(s) concernée(s) par le dysfonctionnement et la rapidité d'évolution de la maladie. Nous allons nous focaliser ici sur les leucémies de type aiguës myéloïdes, et montrer comment on peut améliorer l'efficacité des traitements actuels de chimiothérapie en ciblant le métabolisme des cellules tumorales.

I L'hématopoïèse normale

I.1 La moelle osseuse : siège de l'hématopoïèse

Le terme moelle osseuse désigne l'ensemble des cellules logées à l'intérieur des os et impliquées dans l'hématopoïèse. On distingue deux différentes formes de moelles. La première est la moelle jaune formant un tissu adipeux. La seconde forme est la moelle rouge. Cette dernière est constituée de l'ensemble des cellules engagées dans un processus de différenciation vers des cellules sanguines matures, qui iront renouveler de manière continue le stock de cellules circulant dans le sang. En effet, les cellules sanguines circulantes ont une durée de vie prédéfinie selon leur type cellulaire, ainsi environ 10^{12} cellules sont produites par jour par la moelle osseuse d'un adulte humain pour supplanter les cellules mourant par le mécanisme d'apoptose. C'est l'ensemble des processus biologiques impliqués dans ce mécanisme de régulation qui est englobé sous le terme hématopoïèse. Au cours de la croissance, le nombre total de cellules sanguines augmente et la moelle osseuse occupe l'ensemble du squelette. Une fois la croissance achevée, le nombre de cellules sanguines reste constant et la moelle est relocalisée chez l'homme tel que le décrit la figure 1.

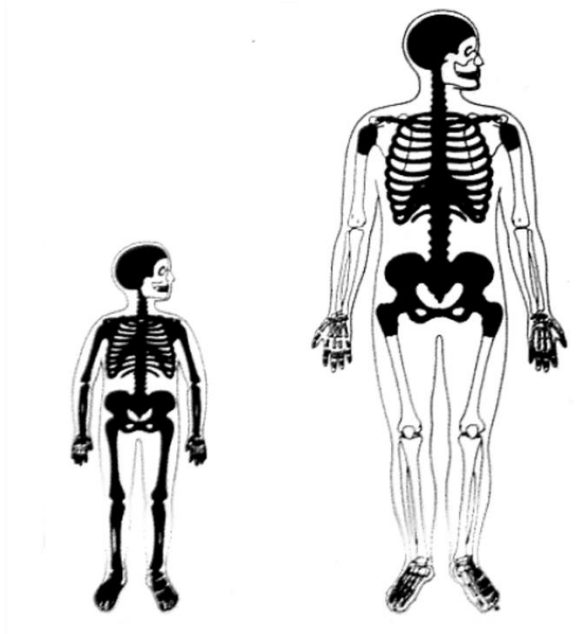


Figure 1 Relocalisation de la moelle osseuse au cours de la croissance chez l'homme.

Les constituants de la moelle osseuse sont classés selon deux groupes : les cellules souches hématopoïétiques, parentes de la totalité des cellules sanguines, et le stroma médullaire constitué de tous les autres occupants (cellulaires ou non), qui en émettant des signaux chimiques, vont guider les cellules engagées dans la différenciation vers tel ou tel type de cellule sanguine.

I.2 Les cellules souches hématopoïétiques

La recherche portant sur les cellules souches hématopoïétiques (HSC) a commencé en 1956 suite à une expérience qui a montré qu'une souris irradiée à une dose létale est capable de survivre si l'irradiation est suivie d'une greffe de moelle osseuse [1]. Cela démontre que la moelle osseuse, contrairement au sang circulant, contient l'ensemble des éléments nécessaires au rétablissement d'une hématopoïèse normale.

Les HSC, contrairement aux cellules souches embryonnaires sont pré-engagées dans un processus de différenciation puisqu'elles seront exclusivement à l'origine de cellules sanguines [2]. Plutôt que d'être totipotentes, les HSC sont alors désignées comme multipotentes. Leur autre caractéristique majeure réside en leur capacité d'auto-renouvellement, c'est-à-dire qu'elles sont susceptibles de donner naissance à un progéniteur qui perdra cette capacité, mais aussi à un clone tout à fait identique. Alors que certaines HSC sont actives, d'autres sont en état de dormance ou quiescence, un état entretenu par le stroma médullaire. On distingue les HSC des cellules souches mésenchymateuses (MSC), qui présentent les mêmes caractéristiques intrinsèques, mais qui vont quant à elles donner naissance à une grande variété de cellules impliquées indirectement dans l'hématopoïèse, telles que les cellules constituant les os, le cartilage, la graisse, les tendons, les muscles, donc ce qui forme les constituants cellulaires du stroma médullaire [3]. Les HSC évoluent en très forte minorité au sein de la moelle osseuse puisqu'elles représentent environ une cellule sur un million. Elles sont généralement identifiées par des techniques d'immunophénotypages consistant à adresser des anticorps à des marqueurs de surface pré-identifiés comme étant propres aux HSC tel que CD34 [4]. Par opposition, des cellules différenciées présentent à leur surface d'autres types de marqueurs tel que CD38 [5]. Ainsi lorsqu'anti-CD34 se fixe à une cellule et qu'anti-CD38 ne s'y fixe pas, on considère la cellule en question comme étant une cellule souche hématopoïétique, ou pour les plus prudents une cellule CD34⁺CD38⁻ mais dans l'usage courant ces termes sont des synonymes. La technique de cytométrie en flux permet finalement, grâce au marquage par des anticorps, d'identifier et d'isoler les HSC à partir d'une population cellulaire hétérogène.

I.3 Le parcours de différenciation des cellules sanguines

Ce sont ainsi les HSC qui donnent naissance à des cellules s'engageant dans le processus de différenciation, pour graduellement passer du stade de progéniteur, à celui de précurseur, puis à celui de cellule différenciée mature telle que décrit dans la figure 2. La cellule souche débute son parcours de différenciation en prenant la forme soit d'un progéniteur myéloïde, soit d'un progéniteur lymphoïde. Le progéniteur myéloïde va, par une cascade de différenciation, pouvoir donner naissance aux cellules matures que sont les globules rouges, les globules blancs, et les plaquettes, tandis que le progéniteur lymphoïde donnera naissance à des lymphocytes B ou T. Les globules rouges ont pour rôle de transporter l'oxygène, les plaquettes sont l'acteur principal du système de coagulation, les globules blancs et les lymphocytes vont quant à eux participer d'une manière ou d'une autre à l'action du système immunitaire. C'est au cours de leur migration depuis la moelle osseuse vers le sang que va se dérouler

l'ensemble du processus de différenciation, autrement dit notre sang contient normalement exclusivement des cellules matures.

L'hématopoïèse représente donc une mécanistique extrêmement complexe, où les processus de divisions cellulaires et de différenciation s'exécutent en parallèle.

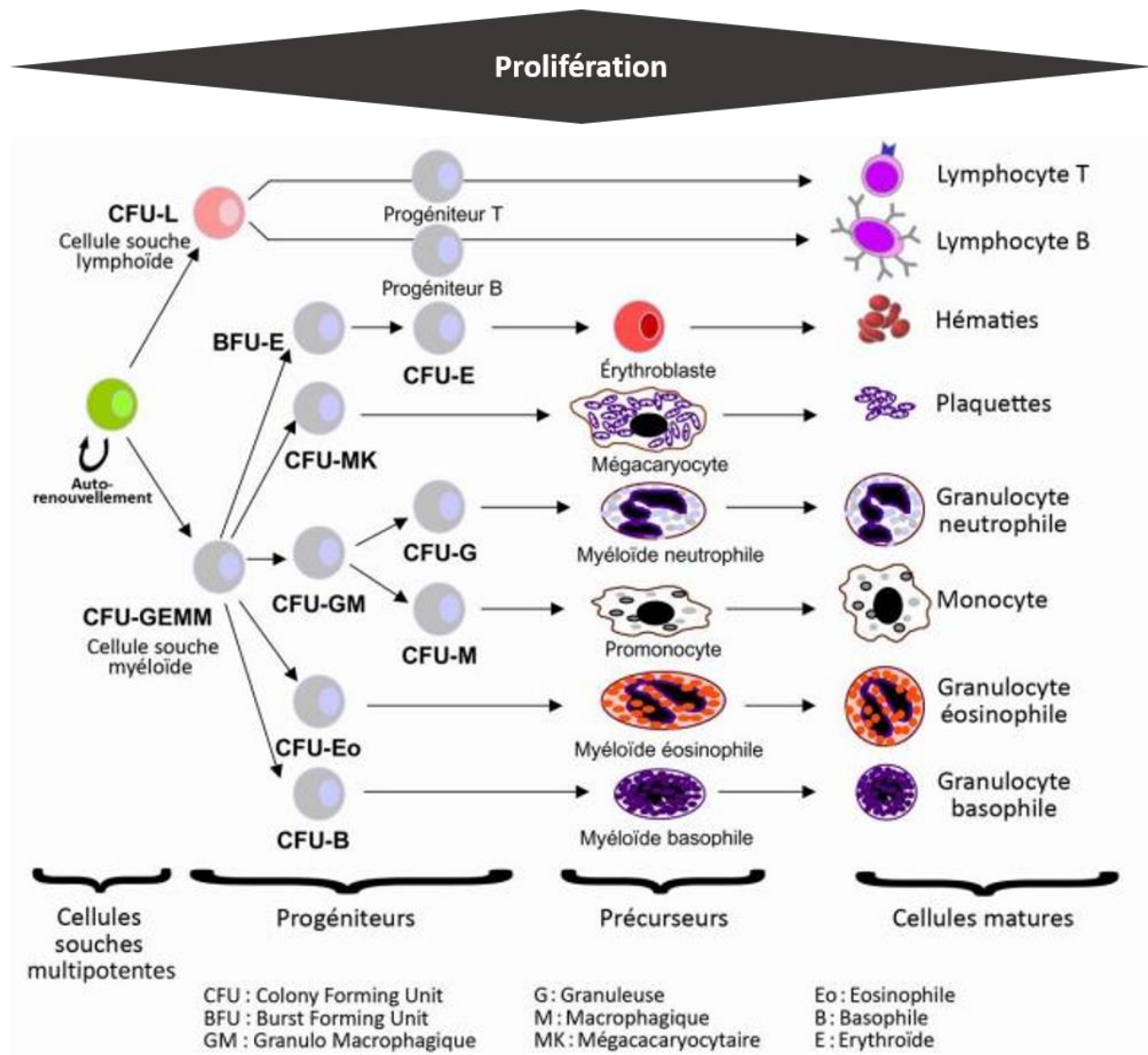


Figure 2 Hématopoïèse : cascade de différenciations de la cellule souche hématopoïétique.

II Les leucémies aiguës myéloblastiques

II.1 Les différents types de leucémies

La leucémie traduit un dysfonctionnement de l'hématopoïèse, elle est classée dans la catégorie des hémopathies malignes, qui sont elles-mêmes englobées sous le terme « cancer du sang ». On distingue

principalement quatre types de leucémies, d'abord en fonction de leur rapidité d'évolution par l'intermédiaire des termes aigu ou chronique, ensuite par le progéniteur commun identifié comme responsable du déficit de différenciation : il peut être myéloïde ou lymphoïde. Cette classification permet donc de définir les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), et les leucémie myéloïdes chroniques (LMC). Nous nous focaliserons par la suite sur les leucémies de type aiguë myéloïde. Celles-ci se traduisent par la prolifération incontrôlée de cellules immatures dans la moelle osseuse mais aussi dans le sang. En plus de ne pas parvenir au stade final de différenciation, ces cellules nommées alors blastes, connaissent un déficit de mort par apoptose. Les symptômes sont alors graves et tellement nombreux qu'il est difficile de tous les lister. Le déficit en globules rouges (anémie) va entraîner un manque d'oxygénation dans tout l'organisme, le déficit en globules blancs (neutropénie) va rendre inefficace le système immunitaire ce qui est à l'origine d'infections graves et répétées, alors que le déficit en plaquettes (thrombopénie) va favoriser l'apparition d'hémorragies et rendre la coagulation presque impossible. Enfin, l'accumulation à tendance exponentielle de cellules immatures dans les os, le sang, voire même dans certains organes, va provoquer des gonflements extrêmement douloureux.

Tous ces symptômes ne sont pas systématiques car la maladie prend une forme différente selon chaque patient. C'est pourquoi dès les années 1970, des chercheurs français, anglais et américains ont mis en place un système de sous-classification, la classification FAB [6], définissant sept sous-classes en fonction du degré d'indifférenciation observé (Tableau 1) et permettant donc, selon des critères morphologiques, d'adapter au mieux le traitement en fonction du patient concerné.

Table 1 Classification franco-américano-britannique (FAB) des LAM.

Groupe FAB	Description morphologique
M0	LAM avec différenciation minimale
M1	LAM sans maturation
M2	LAM avec maturation
M3	Leucémie aiguë promyélocytaire
M4	Leucémie aiguë myélomonocytaire
M5	Leucémie aiguë monocytaire
M6	Leucémie aiguë érythroblastique
M7	Leucémie aiguë mégacaryoblastique

Depuis, ce système de classification n'a de cesse d'évoluer dans le but de toujours adapter au mieux le traitement au patient. L'organisation mondiale de la santé (OMS ou WHO) [7], a mis à jour la classification FAB en prenant en compte en plus des données morphologiques, des données immunologiques, cytogénétiques et cliniques, permettant de redéfinir sept sous-groupes :

- 1 – LAM avec des anomalies génétiques récurrentes,
- 2 – LAM avec dysplasies multilignées,
- 3 – LAM liées à des thérapies,
- 4 – LAM n'entrant pas dans les catégories précédentes,
- 5 – Sarcome myéloïde,
- 6 – Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down (ou trisomie 21),
- 7 – LAM de lignée ambiguë.

II.2 Les leucémies en chiffres

Dans le monde, selon les données du centre international de la recherche sur le cancer (CIRC), le taux d'incidence standardisé sur l'âge et par année de l'ensemble des leucémies est d'environ 5/100 000 et la mortalité globale est d'environ 3,6/100 000. Ce taux d'incidence est plus élevé dans les pays les plus développés (7,3/100 000) que dans les pays les moins développés (4/100 000). L'ensemble des leucémies aiguës représente environ 3000 nouveaux cas par an en France, elles se placent donc au 20^{ème} rang des cancers en terme de diagnostic, mais au 16^{ème} rang en terme de mortalité [8]. Les LAM représentent 70% des leucémies aiguës chez l'adulte contre environ 20% chez l'enfant, l'âge moyen au moment du diagnostic étant de 65 ans. Par ailleurs, celles-ci sont plus fréquentes chez l'homme que chez la femme (4,5/100 000 et 3,5/100 000 respectivement). Entre 1980 et 2005 l'incidence des leucémies aiguës a augmenté avec un taux annuel moyen de +0,9% chez l'homme comme chez la femme.

Table 2 Projection sur l'année 2011 de l'incidence des leucémies aiguës et de la mortalité chez l'homme et la femme, en France d'après l'institut de veille sanitaire (InVS) et l'institut national du cancer (InCA).

Homme				Femme			
Incidence		Mortalité		Incidence		Mortalité	
Nombre de cas	Taux	Nombre de décès	Taux	Nombre de cas	Taux	Nombre de décès	Taux
1 972	4,9	1 735	2,9	1 805	4,1	1 479	1,9

Taux standardisés sur l'âge de la population mondiale pour 100 000 personnes-années

Les facteurs de risques (autres que l'âge) conduisant à l'apparition des leucémies commencent à être identifiés mais certaines études se contredisent, ce qui rend difficile une interprétation définitive. Parmi les facteurs de risques, voici ceux que l'on peut citer avec quasi-certitude :

- les antécédents cliniques de types radiothérapie ou chimiothérapie,
- l'exposition à la radioactivité,
- des anomalies génétiques comme la trisomie 21,
- l'exposition aux pesticides.

L'exposition aux pesticides [9] constitue la piste principale pour expliquer la différence du taux d'incidence moyen de la leucémie entre les pays plus développés et les pays moins développés.

II.3 La prise en charge des patients atteints de LAM

Comme cela a été précédemment évoqué, le traitement d'une leucémie est à adapter au cas par cas. Les classifications FAB et WHO permettent d'identifier des signes pronostiques permettant au médecin d'anticiper la manière dont le patient va réagir aux traitements. Un traitement de chimiothérapie [10]–[12] s'applique à l'ensemble des patients, ce sont essentiellement les doses administrées et la durée du traitement qui diffèrent. Cette chimiothérapie est basée sur l'usage couplé de la cytarabine et d'une anthracycline : l'idarubicine ou la daunorubicine. La cytarabine est un analogue à la pyrimidine que l'on retrouve dans les bases nucléiques constituant l'ADN et l'ARN. La cytarabine va remplacer les nucléosides naturels, ce qui va empêcher la répllication de l'ADN, et par conséquent la division cellulaire des cellules cancéreuses, mais aussi de toutes les cellules à développement rapide. Les anthracyclines

vont quant à elles s'intercaler entre deux bases d'ADN, et provoquer elles aussi l'inhibition des mécanismes de réplication, ce qui va entraîner la mort des cellules. Puisque le traitement agit sans distinction sur les blastes et les cellules normales une aplasie est provoquée. Le patient doit donc rester sous surveillance durant au minimum quinze jours, soit la durée nécessaire à la moelle osseuse pour se régénérer et donner naissance à de nouvelles cellules saines.

Le traitement commence toujours par une phase de chimiothérapie nommée induction, durant une dizaine de jours, lors de laquelle la cytarabine et l'anthracycline sont injectées conjointement avec l'objectif d'entrer en rémission. La rémission complète désigne une phase où les blastes semblent avoir totalement disparu du sang et sont en quantité inférieure à 5% dans la moelle osseuse. Elle est obtenue dans environ 60% des cas. Le patient entre alors dans l'étape de consolidation, qui consiste cette fois à utiliser la cytarabine seule en forte dose, dans le but d'éradiquer les derniers blastes et de limiter au maximum les risques de rechute. Le traitement est généralement arrêté après cette étape. Malheureusement, le phénomène appelé rechute, désignant la réapparition des blastes en grande quantité, est observé dans 40 à 50% des cas cinq ans après le début du traitement. Lorsque la rechute ou ses prémices sont identifiées (quantité de blastes dans la moelle supérieure à 20%), ou que la phase de rémission complète n'est pas obtenue, le patient entre en phase d'intensification. Cette phase repose sur plusieurs cures d'une chimiothérapie proche ou identique à celle de la phase de consolidation, ceci étant couplé à une allogreffe de moelle osseuse. La phase d'intensification est très lourde, elle n'est donc pas proposée aux patients âgés de plus de 70 ans (60 ans auparavant). Leur organisme n'est simplement plus en mesure de supporter les effets indésirables de ce type de traitement. En effet, une greffe de moelle est tout sauf anodine. Des cellules souches hématopoïétiques sont greffées au patient mais aussi d'autres types cellulaires dont ceux qui participent au système immunitaire. Le système immunitaire du greffon peut dans le meilleur des cas cibler uniquement les blastes et laisser les cellules saines de l'hôte en paix, mais il arrive parfois que le système immunitaire du greffon s'attaque à son hôte. Dans ce cas de figure, la greffe peut provoquer le décès du patient [13].

Par ailleurs, il est important de noter que seulement deux nouveaux médicaments : l'azacitidine en 2008 et la décitabine en 2012 ont obtenu l'approbation de l'union européenne pour une mise sur le marché dans le cadre du traitement des LAM. Ces médicaments sont principalement délivrés aux patients trop fragiles vis-à-vis des traitements conventionnels. Aux États-Unis, ces mêmes molécules sont autorisées dans le cadre du traitement de maladies autres que les LAM, mais les hématologues ne se privent pas de les utiliser s'ils estiment que le patient peut en bénéficier. Comparé à d'autres hémopathies malignes (Figure 3A), très peu de traitements innovants ont été introduits sur le marché. Ainsi, la cytarabine demeure le traitement de référence des LAM depuis les années 1970. Une étude [14] évalue le marché des LAM à un demi-milliard de dollars en 2015 et prévoit une croissance de 17% par an pour atteindre une valeur d'un milliard en 2020. Cette croissance serait générée par l'arrivée imminente de nouvelles molécules sur le marché à des prix très élevés (Figure 3B).

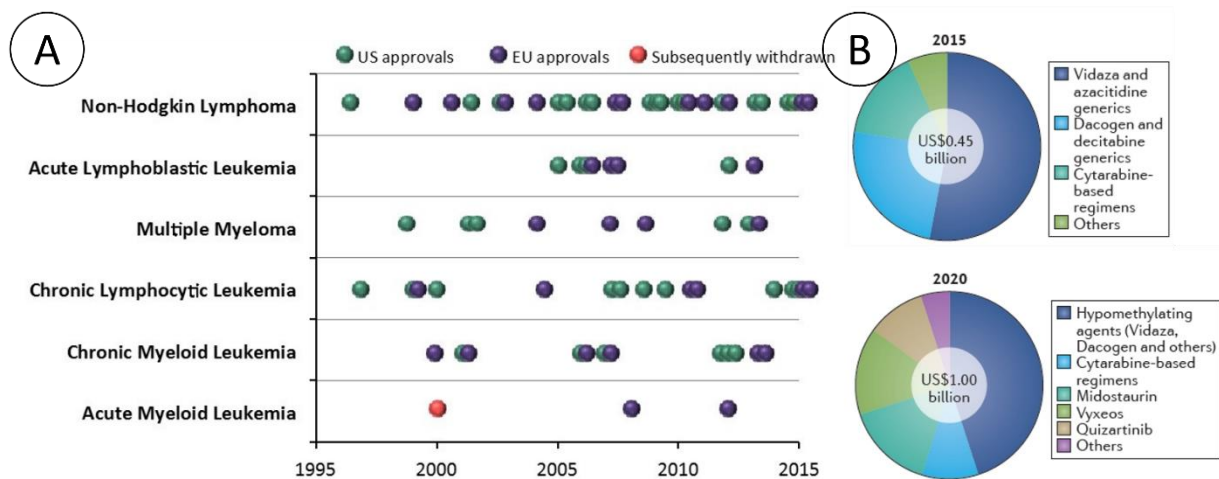


Figure 3 A : Mise sur le marché de nouvelles molécules pour le traitements d'hémopathies malignes. B : Projection du marché des LAM d'ici 2020, d'après [14].

III L'oncométabolisme dans les LAM

III.1 Introduction de la notion d'oncométabolisme

Le métabolisme est un terme qui désigne les réactions chimiques se déroulant au sein d'un être vivant, avec comme objectif d'assurer l'ensemble des fonctions vitales, mais aussi de répondre à des demandes énergétiques particulières en réponse à des *stimuli* de l'environnement. On distingue d'une part l'anabolisme, qui représente l'ensemble des voies de biosynthèse des constituants cellulaires, et d'autre part le catabolisme, qui représente l'ensemble des voies de dégradation des constituants cellulaires. Chez tous les êtres vivants connus, la matière première énergétique est l'adénosine triphosphate (ATP). C'est la décomposition de l'ATP en adénosine diphosphate (ADP) et en phosphate inorganique (Pi) qui libère l'énergie nécessaire à tous les mécanismes du vivant. Alors que l'ATP est majoritairement produite par le chloroplaste capable de photosynthèse chez les végétaux, on considère la mitochondrie comme acteur principal de la production d'ATP chez les animaux. La mitochondrie est un organelle, c'est-à-dire une structure spécialisée contenue dans le cytoplasme et délimitée par une membrane phospholipidique au même titre que le noyau.

La notion d'oncométabolisme [15] a été introduite par la découverte réalisée en 1924 par Otto Heinrich Warburg [16]. Alors que les cellules normales, différenciées, produisent leur ATP très majoritairement par le processus de phosphorylation oxydative permis par la mitochondrie, les cellules cancéreuses privilégient quant à elles la production d'ATP par le processus de glycolyse (Figure 4). Les cellules normales sont aussi capables de générer majoritairement l'ATP par la glycolyse mais elles adoptent ce comportement sous contrainte, c'est à dire lorsqu'elles se trouvent dans un environnement privé d'oxygène, on parle alors d'environnement anaérobie. La glycolyse consiste dans un premier temps à transformer le glucose en pyruvate par oxydation, puis à réduire le pyruvate en lactate par fermentation, l'ensemble se déroulant dans le cytoplasme cellulaire. Contrairement à la phosphorylation oxydative, ce processus ne fait pas intervenir la mitochondrie. De plus, la glycolyse permet de produire seulement 2 moles d'ATP par mole de glucose consommée, alors que la phosphorylation oxydative permet d'en produire jusqu'à 36. Enfin, le produit de la glycolyse est le lactate, ce qui entraîne une acidification des milieux intra- et extra- cellulaires, tandis que les produits de la phosphorylation oxydative sont l'eau et

le dioxyde de carbone. On nomme ainsi « effet Warburg » le fait qu'une cellule cancéreuse pratique la glycolyse en présence d'oxygène, autrement dit la glycolyse aérobie [17].

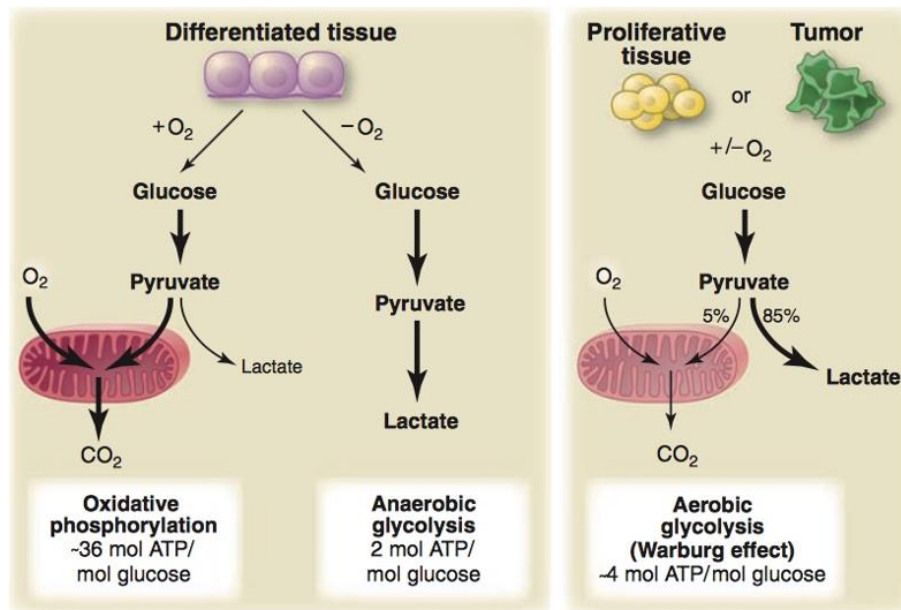


Figure 4 Définition de l'effet Warburg, d'après [17].

Otto Heinrich Warburg pensait à cette époque que la perte définitive de la capacité de respiration mitochondriale constitue l'élément déclencheur du développement d'un cancer. Depuis l'avènement de la génétique et la découverte des oncogènes, personne n'est capable d'affirmer si la reprogrammation métabolique est la cause ou la conséquence des mutations génétiques observées chez les cellules cancéreuses. De plus, il est désormais admis que les cellules saines, dont l'objectif premier est la prolifération plutôt que le fait d'assurer une fonction particulière, comme par exemple lors de l'activation des lymphocytes T dans le cadre d'une réponse immunitaire [18], ont tendance à pratiquer la glycolyse aérobie tout comme les cellules cancéreuses. Pour conclure, on peut considérer que l'effet Warburg, plutôt que de définir une caractéristique propre aux cellules cancéreuses, met en évidence les liens étroits établis entre le statut métabolique d'une cellule et sa fonction. Les cellules cancéreuses n'ont donc pas perdu de manière définitive la capacité de respiration, mais des *stimuli* leur ont d'une manière ou d'une autre ordonné de proliférer, et par conséquent de désactiver la fonction mitochondriale.

De plus, il ne faut pas considérer la phosphorylation oxydative et la glycolyse comme deux moyens de production d'ATP concurrents, puisqu'ils sont complémentaires et coordonnés (Figure 5). En effet, pour que le glucose puisse intégrer le cycle de Krebs (ou TCA cycle) se déroulant au sein de la mitochondrie, celui-ci doit préalablement subir une cascade de réactions dans le cytoplasme afin d'être transformé en pyruvate. Autrement dit, il n'y a pas de phosphorylation oxydative sans glycolyse ou alors ce n'est pas le glucose qui est utilisé mais un autre substrat énergétique. Les acides gras peuvent être dégradés au sein même de la mitochondrie par le mécanisme de β -oxydation pour former l'acetyl-CoA et intégrer le cycle de Krebs. La dernière des trois principales voies métaboliques connues faisant intervenir la chaîne de transport d'électrons (ETC) mitochondriale se nomme la glutaminolyse. Là encore une cascade de réactions enzymatiques permet de convertir la glutamine, un acide aminé, en α -ketoglutarate pour intégrer le cycle de Krebs et finalement produire de l'ATP *via* l'ETC [19].

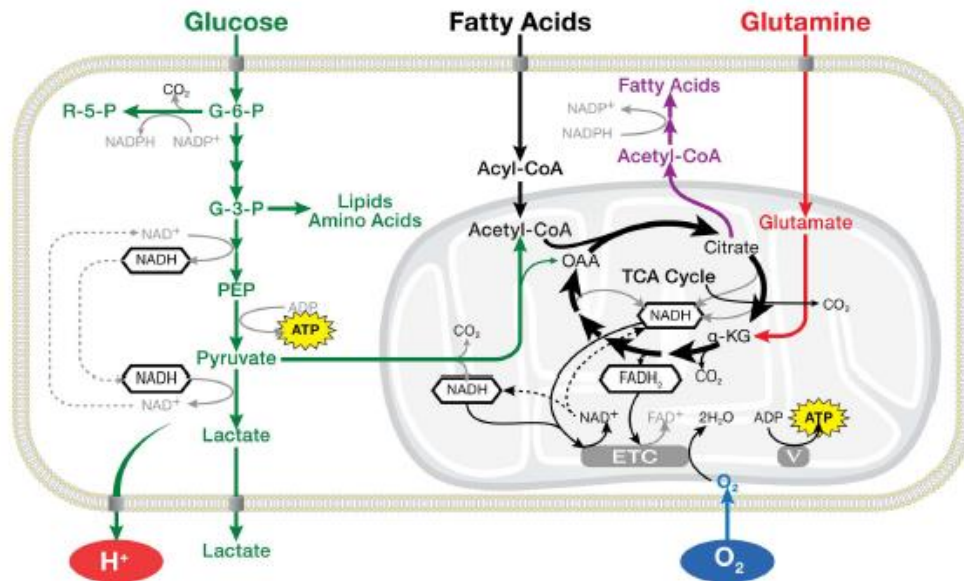


Figure 5 Les trois principales voies métaboliques pour la production d'ATP, d'après [19].

De manière générale, le métabolisme cellulaire est intimement lié au milieu environnant. La levure permet d'illustrer parfaitement ce concept. En effet, on caractérise les levures comme des organismes à « aérobic facultative ». Elles pratiquent généralement la glycolyse, mais sont capables de passer d'une voie métabolique à l'autre lorsqu'elles se trouvent dans un milieu à forte concentration en oxygène, pour pratiquer la phosphorylation oxydative. On nomme ce phénomène l'effet Pasteur [20]. A l'inverse, lorsqu'une cellule pratiquant généralement la phosphorylation oxydative se retrouve dans un environnement où la concentration en glucose est très élevée, cette même cellule va alors se mettre spontanément à pratiquer la glycolyse pour délaissier la phosphorylation oxydative [21]. On nomme ce phénomène l'effet Crabtree. Ceci démontre la plasticité du métabolisme cellulaire. Il y a deux manières d'interpréter ces faits : soit la cellule privilégie naturellement le substrat énergétique présent en plus grande quantité, soit la cellule tente de rétablir les conditions physiologiques dans lesquelles elle se sent le mieux en consommant les substrats présents en excès.

III.2 Relations entre le métabolisme des blastes leucémiques et la chimiorésistance

Dans le but d'étudier les mécanismes de résistance à la chimiothérapie [22], des souris fortement immunodéficientes sont utilisées pour mimer la maladie humaine (Figure 6). Des cellules de patients atteints de LAM sont injectées dans ces souris [23]. Lorsque la xénogreffe est avérée, un traitement de chimiothérapie basé sur l'usage de la cytarabine (araC) est appliqué à la souris comme il l'est chez un patient humain. A la fin du traitement, la souris est sacrifiée dans le but de prélever les cellules résiduelles viables contenues dans sa moelle osseuse. Ces cellules subissent ensuite une batterie de tests pour être caractérisées au mieux. Leurs caractéristiques sont enfin comparées à celles des cellules primaires avant implantation. Cette approche permet ainsi d'établir le phénotype de la cellule leucémique résistante (RLC).

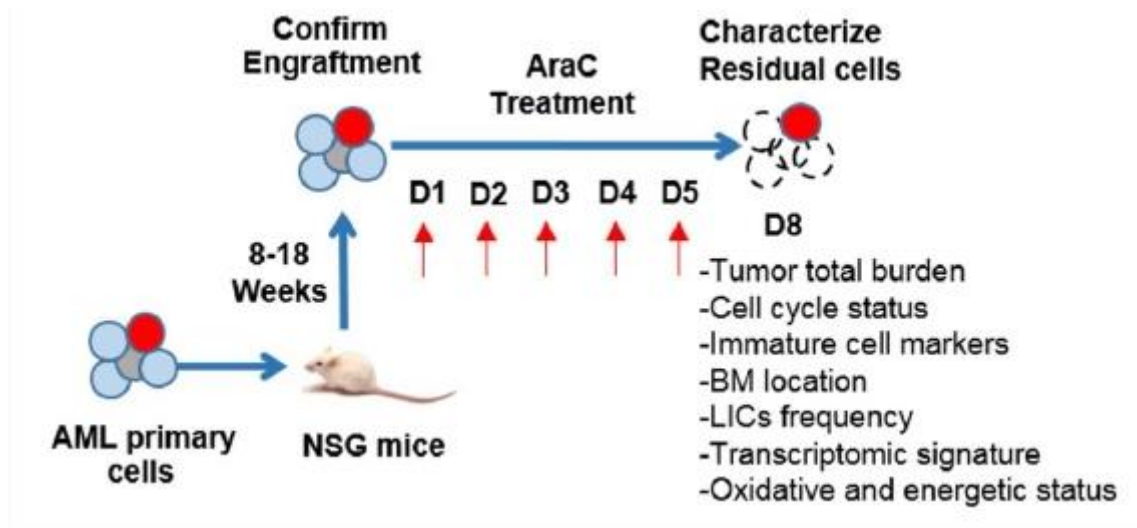


Figure 6 Modèle de xénogreffe appliqué pour l'étude de la chimiorésistance.

De nombreuses études tendent à montrer que les cellules résistantes ou résiduelles présentent un phénotype de cellules souches, c'est-à-dire qu'elles sont quiescentes (en phase G0 du cycle cellulaire) et reconnaissables par leurs marqueurs de surface $CD34^+CD38^-$. Ce serait alors le caractère quiescent des cellules qui expliquerait leur résistance à la chimiothérapie mais aussi leur capacité à déclencher la réapparition de la maladie. On parle alors de cellules souches leucémiques (LSC) [24]–[26]. Les résultats des études menées par l'équipe RESISTAML revisitent ce dogme, puisqu'ils montrent que la proportion de cellules souches, au sens $CD34^+CD38^-$ ou G0, n'augmente pas significativement suite à la chimiothérapie. En revanche, ils mettent en évidence trois principales caractéristiques énergétiques et métaboliques des cellules résiduelles : premièrement elles sont particulièrement gourmandes en oxygène ($OXPHOS^{hi}$), deuxièmement elles produisent une forte quantité d'espèces réactives oxygénées (ROS^{hi}), troisièmement elles métabolisent davantage les acides gras (FAO^{hi}). Les résultats de cette étude menée *in vivo* permettent donc de montrer que les principales caractéristiques des RLC ne sont pas leur phénotype cellule souche, mais plutôt un phénotype énergétique et métabolique particulier, qui leur confère la résistance aux traitements.

A partir de ces observations, six lignées de cellules leucémiques commercialisées ont été triées selon leur statut énergétique pour former deux groupes distincts : le groupe $OXPHOS^{hi}$, constitué des lignées MOLM14, HL60 et MV4-11, et le groupe $OXPHOS^{low}$, constitué des lignées U937 et KG1a. Par la suite, chaque lignée a été greffée chez un groupe de souris, ces souris ont subi un traitement de chimiothérapie à la cytarabine ou non, et enfin leur temps de survie post-transplantation a été comparé. Les résultats concordent alors avec les précédentes observations et mettent en évidence le fait que les cellules présentant un statut $OXPHOS^{hi}$, donc une forte activité mitochondriale, résistent à la cytarabine alors que les cellules présentant un statut $OXPHOS^{low}$ y répondent favorablement (Figure 7).

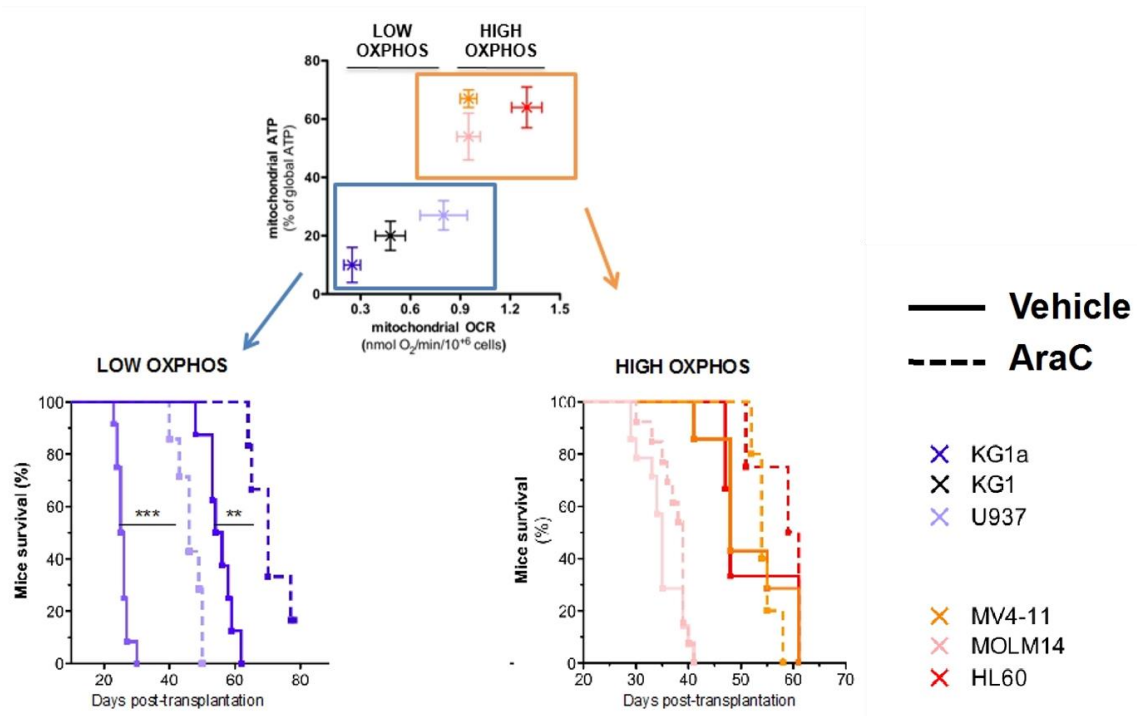


Figure 7 Sensibilité à la cytarabine de différentes lignées de cellules leucémiques en fonction de leur statut OXPHOS in vivo.

Un niveau de respiration basal particulièrement élevé est susceptible de traduire une capacité respiratoire particulièrement élevée elle aussi et donc, une flexibilité métabolique particulièrement performante. Comme un individu fournissant un effort physique augmente sa fréquence ventilatoire, les cellules sont capables de moduler leurs apports en oxygène en réponse à différents *stimuli*, pour par exemple mettre en place des systèmes de défense ou de réparation en réponse à l'activité d'agents chimiothérapeutiques, certaines plus que d'autres. Ce serait alors cette marge de sécurité, couplée à leur aptitude à utiliser une grande variété de substrats énergétiques, qui leur permettrait de résister aux traitements actuels et à provoquer des rechutes.

L'analyse du statut énergétique et de la signature génique correspondante des cellules d'un patient souffrant de LAM peut donc, en plus des caractéristiques morphologiques et cytogénétiques, constituer dès à présent un moyen innovant de pronostic comme l'illustre la figure 8.

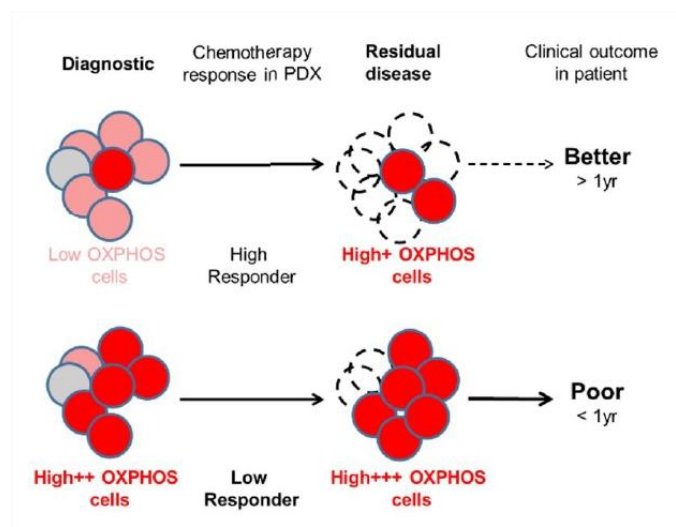


Figure 8 Schéma illustrant la prédiction de la réponse à la chimiothérapie en fonction du statut énergétique des cellules identifiées au moment du diagnostic de la LAM.

Une question se pose alors immédiatement : est-il possible de sensibiliser les RLC à la cytarabine en agissant préalablement sur la mitochondrie et le métabolisme cellulaire ?

III.3 Agir sur le métabolisme pour sensibiliser aux traitements

La mitochondrie étant responsable de la phosphorylation oxydative, il semblerait qu'elle soit aussi directement impliquée dans les mécanismes de chimiorésistance des cellules leucémiques. La mitochondrie devient alors une cible de choix pour mettre au point des traitements innovant [27]–[30]. En effet, si l'on parvient à cibler préférentiellement les cellules leucémiques avec un traitement permettant d'inhiber l'activité mitochondriale, alors celles-ci passeront du statut OXPHOS^{hi} à celui d'OXPHOS^{low} et devront en toute logique être sensibilisées à la cytarabine.

Pour vérifier cette hypothèse, un traitement à la cytarabine combiné à la tigecycline a été mis en œuvre *in vivo* et *in vitro* sur les cellules MOLM14 dont le phénotype est OXPHOS^{hi}. La tigecycline rend impossible la phosphorylation oxydative en inhibant la synthèse de protéines mitochondriales. Les cellules résiduelles post-araC ont été caractérisées *in vitro*. On constate que les MOLM14 consomment davantage de pyruvate, de glucose, d'acides gras et d'oxygène en réponse à l'araC, et que la tigecycline est efficace pour inhiber le mécanisme de phosphorylation oxydative (Figure 9).

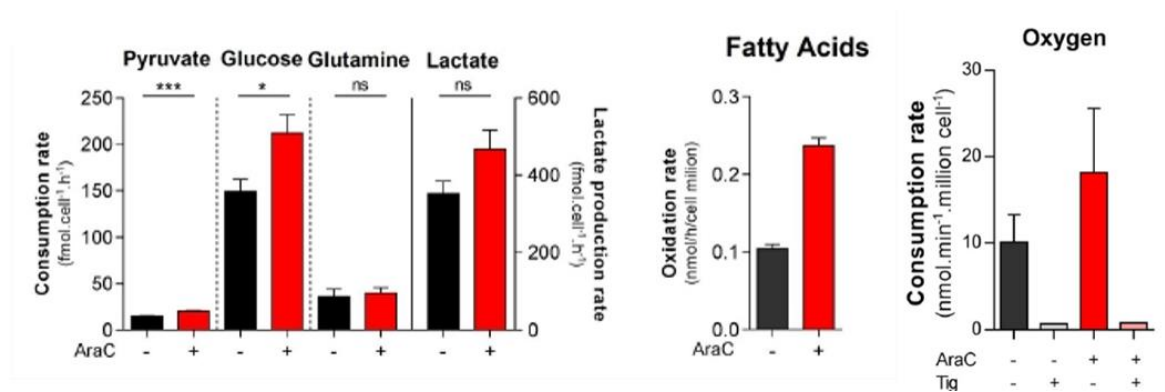


Figure 9 Utilisation des différents substrats énergétiques par des cellules MOLM14 en présence ou en absence d'araC et inhibition de la phosphorylation oxydative par la tigecycline.

La viabilité des MOLM14 a ensuite été évaluée en présence d'araC seule, de tigecycline seule, et avec les deux produits en combinaison (Figure 10). On constate que la tigecycline ou l'araC seules permettent de provoquer l'apoptose de 3% à 12% des cellules résiduelles respectivement, alors que l'usage couplé des deux molécules permet d'attendre environ 30% de cellules en phase apoptotique *in vitro* et *in vivo*. Cette approche de sensibilisation aux chimiothérapies a également été testée avec d'autres inhibiteurs mitochondriaux comme la metformine, la roténone, l'antimycine A, l'oligomycine, le dinitrophenol, le venetoclax ou l'etomoxir.

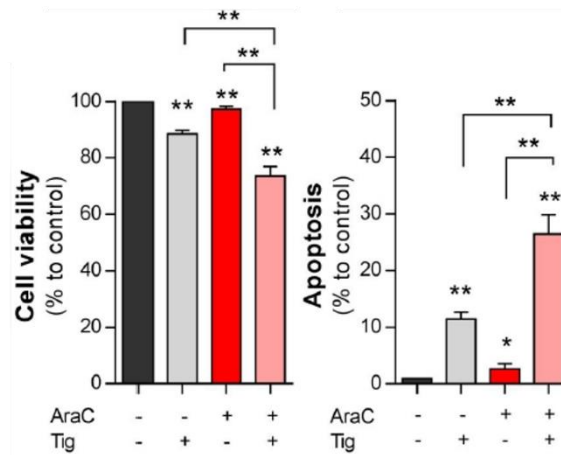


Figure 10 Viabilité cellulaire et proportion de cellules en phase apoptotique sous l'effet de l'utilisation de l'araC seule et en combinaison avec la tigecycline.

Ces résultats permettent de démontrer que la mitochondrie constitue une cible de premier choix dans le cadre d'une stratégie thérapeutique innovante pour traiter les LAM.

IV La mitochondrie

IV.1 Son origine

Il y a un consensus scientifique sur le fait que la mitochondrie est issue de l'évolution symbiotique d'une cellule hôte et d'une bactérie, pour donner forme à la cellule eucaryote telle qu'on la connaît aujourd'hui [31]. La nature exacte de la symbiose initiale reste en revanche un débat permanent. Deux principales hypothèses s'opposent, s'agit-il de l'endocytose d'une bactérie libre par un organisme unicellulaire, ou s'agit-il plutôt de l'infection de la cellule par une bactérie pathogène ? Puisque les cellules disposent d'un système immunitaire qui s'attaque théoriquement à tout élément étranger, l'origine pathogène de la mitochondrie expliquerait sa capacité à contrecarrer les actions du système immunitaire, et à se maintenir à l'intérieur d'un hôte hostile jusqu'à devenir tolérée.

Pour expliquer le pourquoi de cette symbiose, ou « syntrophie », il y a là encore plusieurs hypothèses. La première consiste à penser que l'ancêtre de la mitochondrie protégeait son hôte de la toxicité de l'oxygène en le métabolisant. Son hôte, une cellule fermentative, lui fournissait alors en retour des nutriments comme le pyruvate. La seconde hypothèse suppose que l'ancêtre mitochondrial fut intégré à son hôte dans le but de dégrader les produits acides issus de la fermentation comme le pyruvate ou le glutamate pour permettre le maintien du pH intracellulaire à un niveau constant. D'autres hypothèses basées sur une syntrophie du soufre ou du méthane sont aussi envisagées.

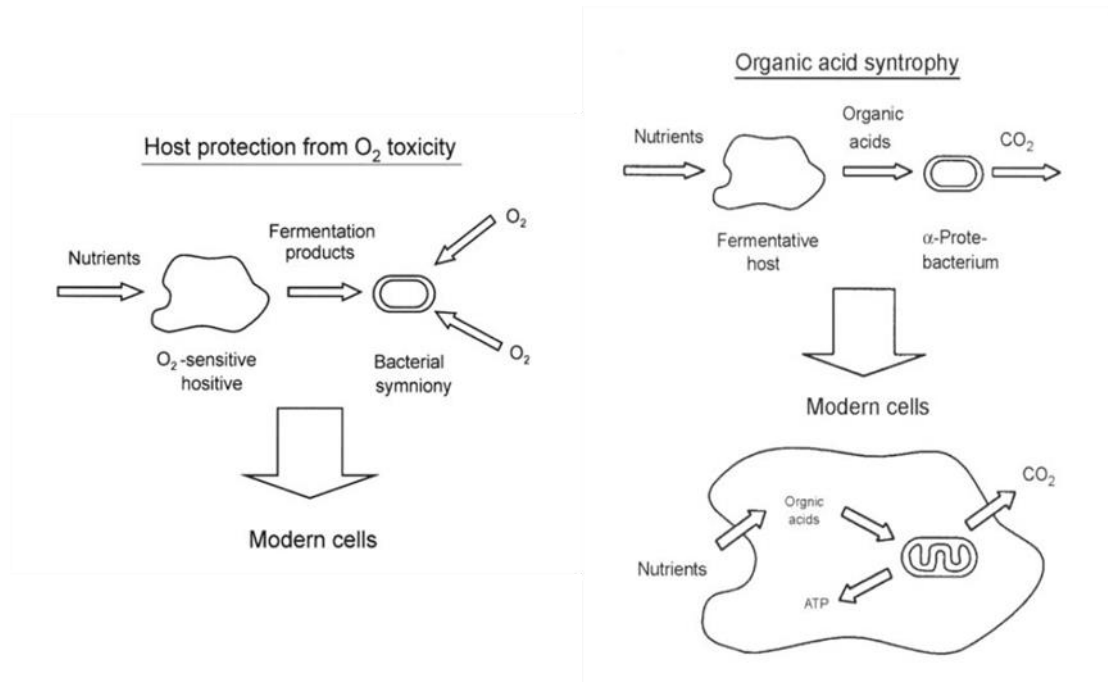


Figure 11 Deux hypothèses sur l'origine de la mitochondrie et de la cellule eucaryote, d'après [31].

L'hypothèse basée sur la protection de l'hôte par son symbiote vis-à-vis de l'oxygène est généralement privilégiée car des études montrent que la capacité respiratoire des cellules eucaryotes s'est sophistiquée au même rythme que la concentration en oxygène a augmenté dans l'atmosphère terrestre [32]. Par ailleurs, il a été montré que des gènes mitochondriaux ont migré vers le noyau de son hôte et inversement. On peut alors supposer que la migration des gènes nucléaires vers l'ancêtre mitochondrial a eu pour but de relocaliser la synthèse de certaines protéines au sein de la mitochondrie plutôt qu'au sein du cytoplasme, ceci avec l'objectif de consommer l'oxygène plus rapidement, et par conséquent, d'augmenter la production d'ATP. Finalement, cette capacité de produire de l'énergie avec un rendement particulièrement exceptionnel pourrait être à l'origine de l'apparition d'êtres multicellulaires de plus en plus complexes tel que l'homme.

L'ancêtre de la mitochondrie serait donc une bactérie autonome, proche de la bactérie *rickettsie* [33], devenue parasite d'une cellule procaryote anaérobie, pour au fil de l'évolution donner forme à la cellule eucaryote aérobie, et passer ainsi du statut de parasite à celui d'organe (Figure 12).

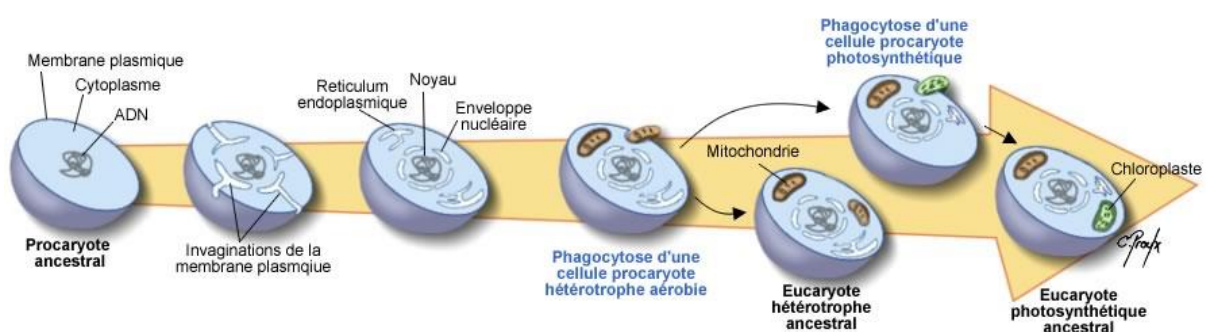


Figure 12 Evolution conjointe de la mitochondrie et de la cellule eucaryote.

IV.2 Ses caractéristiques morphologiques

La mitochondrie est un organe présent dans la très grande majorité des cellules eucaryotes et en grand nombre, c'est-à-dire de quelques dizaines à plusieurs milliers par cellule [34], [35]. La mitochondrie présente la particularité de posséder deux membranes définissant deux espaces : l'espace intermembranaire et la matrice. On a longtemps considéré la mitochondrie (Figure 13) comme une fève de haricot dont le diamètre mesure environ un micromètre. Il s'avère que ce n'est pas si simple.

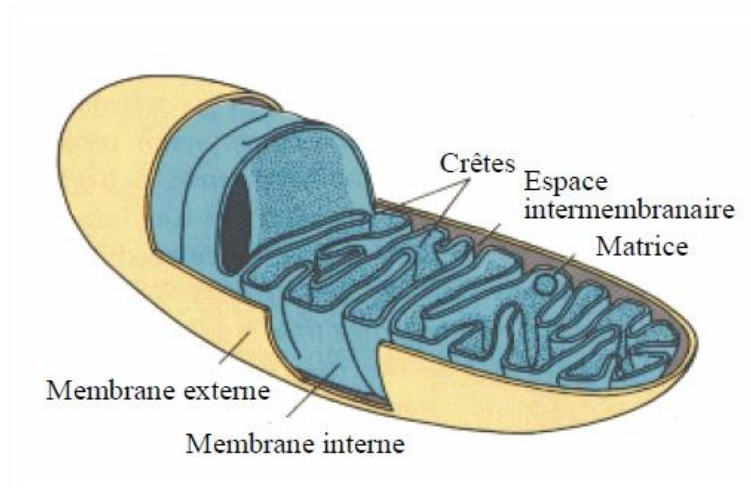


Figure 13 Représentation usuelle d'une mitochondrie.

En effet, le concept même de mitochondrie unique est déjà ambigu, puisque la ou les mitochondries sont susceptibles de s'organiser en réseaux, comme le montre les images de microscopie ci-après (Figures 14, 15, 16). Elles sont capables de fusionner ou de se fissionner [36]–[38], et l'état du réseau donne des indications sur « l'état de santé » des mitochondries.

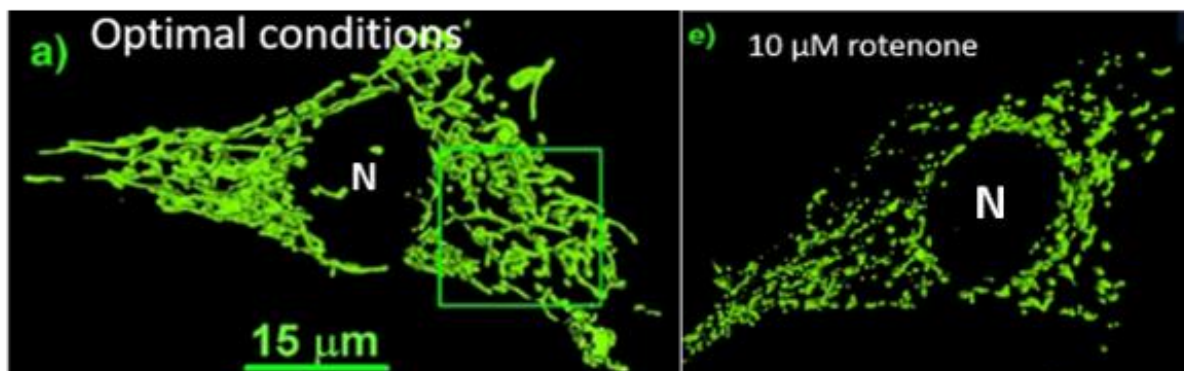


Figure 14 Microscopie 4pi : visualisation du réseau mitochondrial d'une cellule unique, d'après [37]. Mise en évidence du dynamisme du réseau par l'ajout d'inhibiteurs de la fonction mitochondriale. N indique le noyau.

Il n'est donc pas rare de rencontrer dans la littérature scientifique les termes « mitochondrial network » ou « mitochondrial reticulum » ou encore « giant mitochondrion ». Un autre terme qu'il arrive de rencontrer est le « Nebenkern ». Ce terme désigne un réseau mitochondrial particulier (Figure 15A, 15B) que l'on observe chez certains types de spermatozoïdes. Le Nebenkern forme une sphère d'environ 7 µm de diamètre qui va pouvoir s'allonger autour de l'axonème, soit sur plusieurs dizaines de

micromètres, lorsque le spermatozoïde va devoir débiter sa course vers l'ovule [39]–[41]. Le volume occupé par les mitochondries reste du même ordre de grandeur selon les deux configurations mais c'est la surface totale mitochondriale qui est maximisée. Ce gain de surface représente un gain d'activité mitochondriale, car c'est dans cette configuration qu'elles vont permettre la génération d'une très grande quantité d'énergie nécessaire au mouvement du flagelle, et par conséquent la locomotion du spermatozoïde. Ce cas de figure permet d'illustrer le lien direct entre l'organisation du réseau mitochondrial et la fonction que doit accomplir la cellule. Cette relation est toujours vérifiée et de plus en plus d'études s'intéressent à cet aspect, surtout concernant les organes que sont le cœur [42], où les mitochondries adoptent une conformation spécifique (Figure 15C), et le cerveau [43]–[45], où les mitochondries se déplacent le long des axones pour assurer différentes fonctions.

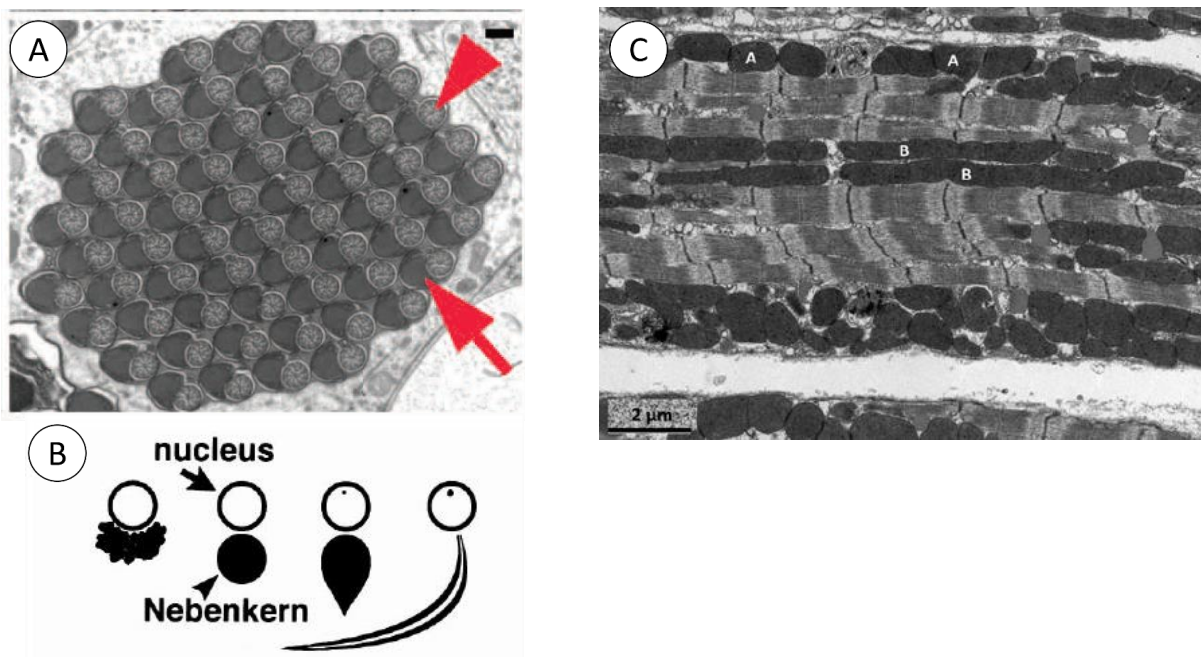


Figure 15 A : Image de microscopie électronique montrant l'association d'un Nebenkern (flèche entière) et de son axonème (flèche coupée), d'après [40]. La barre d'échelle représente 200 nm. B : évolution conjointe du noyau et du Nebenkern d'un spermatozoïde de drosophile. Le Nebenkern se divise en deux puis s'allonge de part et d'autre de l'axonème lors de sa formation, d'après [41]. C : Image de microscopie électronique d'une coupe d'un cœur d'une souris adulte, d'après [42].

Enfin, les mitochondries présentent des interactions physiques avec d'autres constituants cellulaires tels que le réticulum endoplasmique [46]–[49] et le cytosquelette [50]–[52].

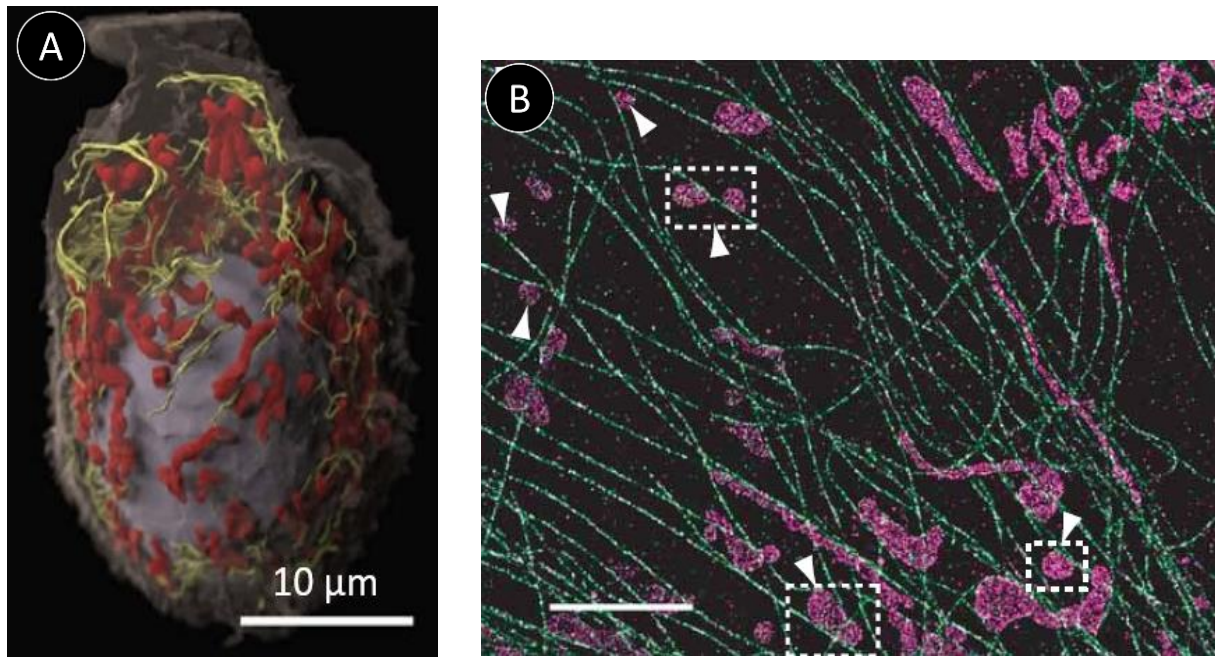


Figure 16 A : image d'une cellule entière générée par IA-SEM (pour « ion-abrasion scanning electron microscopy »). Les mitochondries sont représentées en rouge, le réticulum endoplasmique en vert, d'après [49]. B : image de microscopie confocale 3D STORM, les mitochondries sont représentées en rose et les microtubules en vert, d'après [51]. La barre d'échelle représente 3 μm .

Les relations entre réticulum endoplasmique et mitochondries impliquent principalement la répartition du stockage de l'ion calcium Ca^{2+} . Le calcium est considéré comme un messager intra- et extracellulaire puisqu'il est admis qu'il joue un rôle important dans la contraction des muscles et dans la libération des neurotransmetteurs (exocytose). Concernant le cytosquelette, on considère cette fois que les mitochondries s'attachent aux microtubules pour permettre leur mouvement au sein de la cellule [50].

Pour conclure, les mitochondries ont été considérées à tort pendant plusieurs dizaines d'années comme des particules sphériques ou cylindriques dont le diamètre est légèrement inférieur au micromètre. Cette erreur trouve son origine dans les méthodes analytiques utilisées à l'époque comme la microscopie électronique à transmission et des outils tels que des compteurs de particules résistifs (nommés aussi Coulter counter) qui ne pouvaient être appliqués qu'à l'analyse de préparations de mitochondries isolées. Le développement conjoint des outils de microscopie et de marquage par fluorescence permet désormais d'inspecter en temps réel et en trois dimensions le contenu d'une cellule unique. Ces outils innovants ont permis de mettre l'ensemble de la communauté scientifique d'accord sur le fait que les mitochondries peuvent prendre la forme de particules élémentaires ou bien adopter une structure allongée, tubulaire, formant un réseau dynamique et interconnecté. C'est donc la méthode d'isolation des mitochondries, basée sur des étapes de centrifugations successives, qui provoque le démantèlement du réseau mitochondrial en particules individualisées dont le diamètre moyen est légèrement inférieur au micromètre [53], [54] tel que le montre la figure 17.

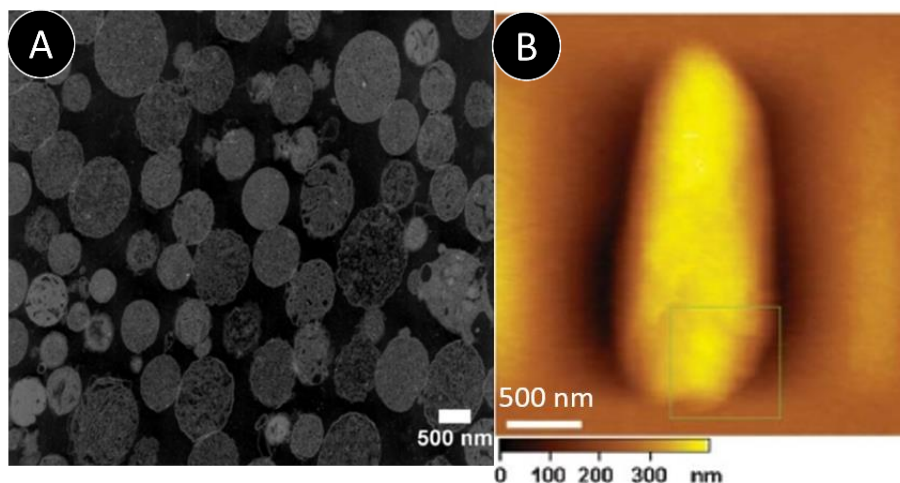


Figure 17 A : observation au microscope électronique de mitochondries isolées par centrifugations différentielles, d'après [53]. B : observation d'une mitochondrie par microscopie à force atomique, d'après [54].

L'une des particularités morphologiques de la mitochondrie est donc de présenter une membrane interne. Nous verrons par la suite que cette membrane joue un rôle central, puisqu'elle permet à la mitochondrie d'assurer sa fonction principale, à savoir la production d'énergie par le mécanisme de phosphorylation oxydative.

IV.3 La phosphorylation oxydative

La principale caractéristique mitochondriale est la production d'ATP impliquant la consommation de l'oxygène. En effet, la mitochondrie est généralement responsable de plus de quatre-vingt-dix pour cent de l'oxygène consommé par la cellule et de l'ATP produit, c'est pourquoi on la considère comme l'acteur final du processus de respiration. Les mécanismes mis en œuvre par la mitochondrie pour produire l'ATP sont le cycle de l'acide citrique, dont la découverte fut récompensée en 1953 par un demi prix Nobel remis à Hans Adolf Krebs [55], un disciple d'Otto Heinrich Warburg, et la phosphorylation oxydative permise par l'action des cinq complexes (Figure 18) constituant la chaîne de transport d'électron (ETC). La découverte du mécanisme de phosphorylation oxydative est quant à elle attribuée à Peter Mitchell, récompensé lui aussi par un prix Nobel en 1978 [56]. L'ETC se situe sur la membrane interne alors qu'un gradient de protons de part et d'autre de cette membrane forme un potentiel membranaire, symbolisé $\Delta\Psi_m$ et valant environ 180 mV. Les principaux substrats énergétiques cellulaires sont le glucose, la glutamine, et les acides gras. Ces différents substrats vont indirectement s'inscrire dans le cycle de Krebs pour être transformés en substrats énergétiques utilisables par l'ETC, c'est à dire en donneurs d'électrons tels que le NADH et le FADH_2 . Deux portes permettent aux électrons d'entrer dans la chaîne, la première est le complexe I (ou NADH déshydrogénase), où l'électron est fourni par l'oxydoréduction du NADH et de l'ubiquinone en NAD^+ et ubiquinol, la seconde est le complexe II (ou succinate déshydrogénase), où l'électron est fourni par l'oxydoréduction du succinate et du FADH_2 en fumarate et FAD^+ . Dans tous les cas, deux électrons sont ensuite transmis à une première navette électronique : la coenzyme Q_{10} . Cette coenzyme va alors transporter les électrons jusqu'au complexe III (ou coenzyme Q cytochrome c reductase), où ils vont devoir emprunter une nouvelle navette, cette fois un par un, le cytochrome c. Le cytochrome c va conduire les électrons jusqu'au complexe IV (ou cytochrome c oxydase), où l'oxygène intervient comme

accepteur final d'électrons de l'ETC, sa réduction produit deux molécules d'eau. Chaque passage d'électrons à travers un complexe, à l'exception du complexe II, induit le pompage de protons depuis la matrice vers l'espace inter-membranaire. C'est ensuite le complexe V (ou ATP synthase) qui va utiliser l'énergie induite par la différence de potentiel pour phosphoryler l'ADP en ATP, tout en rétablissant l'équilibre $\Delta\Psi_m$ par le passage de protons dans le sens inverse, c'est-à-dire de l'espace intermembranaire vers la matrice. On distingue parfois le complexe V du reste de l'ETC (Figure 5), on dit alors que l'ATP synthase est couplée à l'ETC.

Pour conclure sur les liens entre forme et fonction, la présence d'une membrane interne permet la mise en place et le maintien d'un gradient de protons, alors que la présence d'invaginations permet de maximiser la surface d'échange tout en gardant un volume constant.

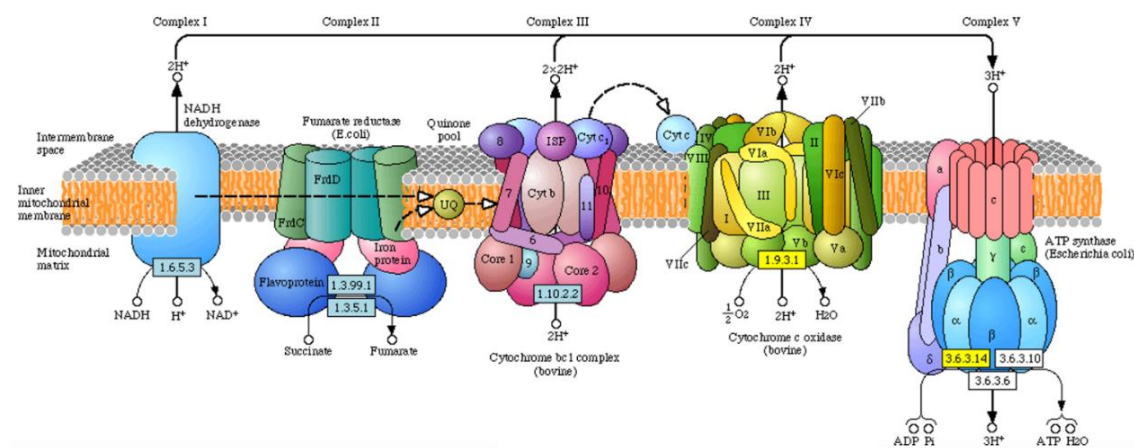


Figure 18 La chaîne de transport d'électrons mitochondriale et ses cinq complexes.

A vrai dire, l'eau n'est pas l'unique produit résultant de l'activité de l'ETC. En effet, d'autres espèces considérées nocives pour l'ensemble des composants cellulaires sont produites par l'ETC lors de son fonctionnement normal, on les appelle les espèces réactives oxygénées ou ROS.

IV.4 La production d'espèces réactives oxygénées

Le terme « espèces réactives oxygénées » définit une famille d'espèces dérivées de l'oxygène moléculaire dont la relative instabilité électronique leur confère un caractère pro-oxydant. Au sein de cette famille, on distingue principalement l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\cdot). La concentration en ROS est régulée par un système antioxydant composé d'enzymes endogènes, comme la superoxyde dismutase (SOD) ainsi que la catalase, et d'éléments exogènes comme des vitamines. Lorsque la balance entre les systèmes pro- et anti- oxydants penche en faveur des ROS, autrement dit lorsque le système antioxydant est dépassé par la forte production de ROS, l'individu concerné est considéré en situation de stress oxydant. L'ETC est reconnue comme étant la source majeure de la production de ROS. C'est la réduction monoélectronique du dioxygène, principalement au niveau des complexes I et III de l'ETC (Figure 19A), qui provoque la formation de l'anion superoxyde [57]–[59]. L'anion superoxyde, très instable, présente une courte durée de vie et diffuse peu. Cependant, sa transformation par l'action de la SOD ou par dismutation donne naissance à un autre ROS : le peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène présente une durée de vie bien

supérieure à celle de l'anion superoxyde et peut diffuser à travers les milieux aqueux et lipidiques sur une grande distance. De plus, il est susceptible de se transformer en radical hydroxyle selon la réaction de Fenton lorsqu'il est en présence de métaux de transition, ou selon la réaction d'Haber Weiss en présence de l'anion superoxyde. Tous les ROS ont par nature une action oxydante mais c'est le radical hydroxyle qui est considéré comme l'espèce la plus agressive car elle oxyde presque toutes les macromolécules voisines telles que les acides nucléiques, les protéines, les acides gras et les glucides (Figure 19B).

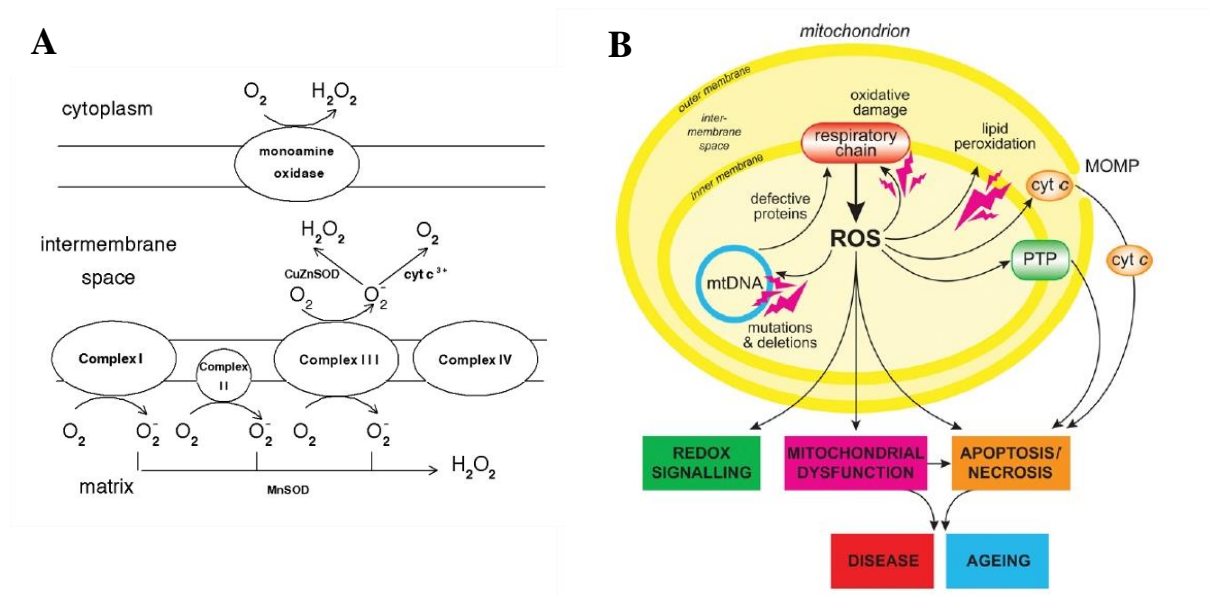


Figure 19 A : Sites de production de l'anion superoxyde au niveau de l'ETC d'après [58]. B : Les conséquences de la production de ROS d'origine mitochondriale, d'après [57].

Les ROS sont produits de manière continue et naturelle chez tous les individus et on associe de plus en plus leur action oxydante au phénomène de vieillissement [60]–[63]. Chez un individu sain de 65 ans, environ la moitié du matériel génétique mitochondrial est endommagé [62], avec une perte équivalente de la capacité respiratoire [63]. Par comparaison, un individu en situation chronique de stress oxydant risque au cours du temps d'accumuler des dommages qui entraîneront l'apparition de mutations génétiques, tant au niveau de l'ADN nucléaire que de l'ADN mitochondrial (mtDNA), ceci de manière précoce. On parle alors d'une situation de vieillissement accéléré, dont la conséquence est l'apparition de maladies comme les cancers ou les maladies neurodégénératives. Une étude plus récente [64], montre que l'accumulation de mutations du mtDNA provoque un vieillissement accéléré mais ne provoque pas l'augmentation de la production de ROS. Ceci tend à prouver que les ROS sont la cause principale des mutations observées dans le mtDNA et que ce ne sont pas les mutations qui entraînent une élévation de la production de ROS.

L'autre caractéristique majeure des ROS, en particulier du peroxyde d'hydrogène, est leur implication dans les mécanismes de signalisation cellulaire [65]. Tout comme le calcium évoqué précédemment, l' H_2O_2 est considéré en tant que messager secondaire, c'est-à-dire que sa concentration intra- et extracellulaire constitue un signal d'activation ou d'inhibition de processus cellulaires, comme par exemple la prolifération ou le déclenchement de l'apoptose (Figure 20). En effet, lorsque la concentration en H_2O_2 intracellulaire dépasse un certain seuil, la mitochondrie va expulser le cytochrome c (la navette

électronique de l'ETC) depuis l'espace intermembranaire vers le cytoplasme, ce qui constitue l'élément déclencheur du processus apoptotique [66]–[68].

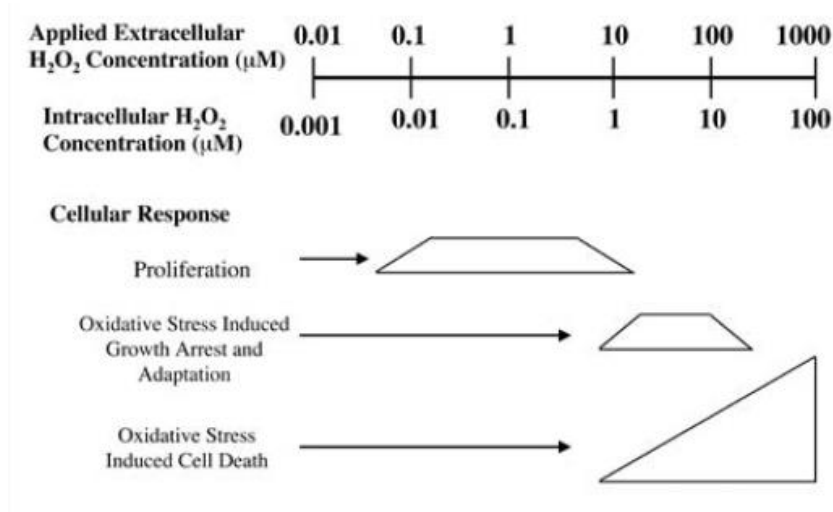


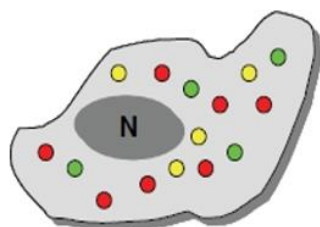
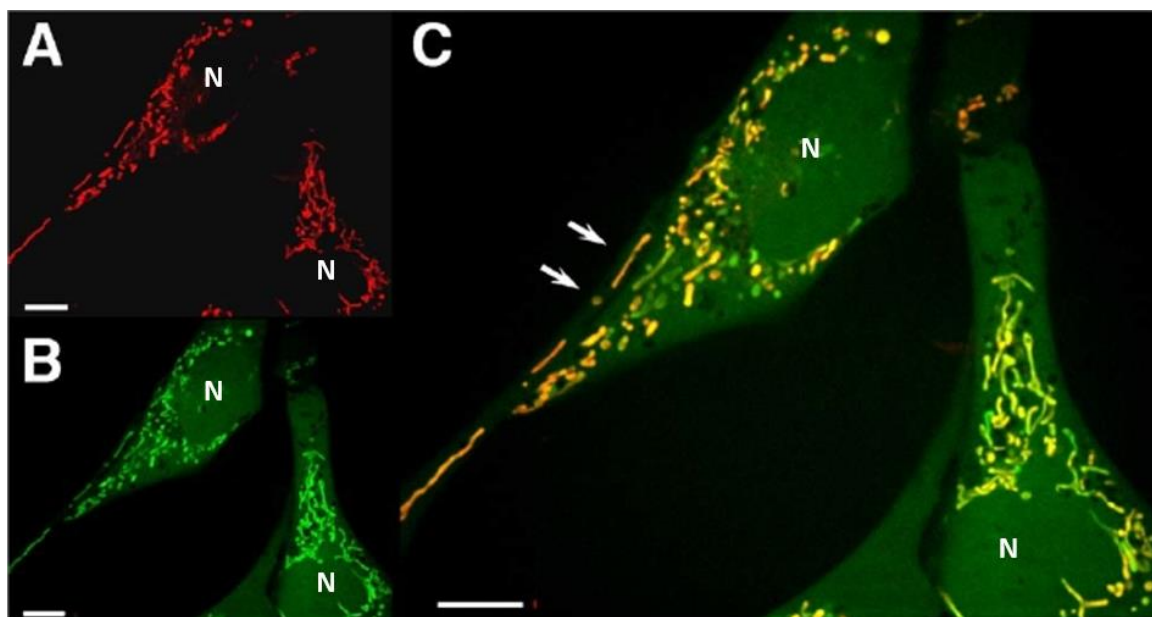
Figure 20 Signalisation cellulaire en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène, d'après [65].

Comme les bactéries, les mitochondries se divisent par scissiparité. Par conséquent, les mutations génétiques induites par l'exposition aux ROS s'accumulent au cours du temps. Les mitochondries, en fonction de leur localisation dans la cellule, seront exposées à des concentrations variables. Le nombre de mutations mais aussi le type de mutations peut donc varier d'une mitochondrie à l'autre au sein d'une même cellule. Ceci introduit la notion d'hétéroplasmie [69], terme traduisant la présence de plusieurs versions de génomes d'organites présentes dans une même cellule ou un même individu.

IV.5 Hétérogénéité mitochondriale au sein de la cellule unique

Les mécanismes de fusion, de fission et de locomotion, traduisent un dynamisme de la fonction mitochondriale au sein de la cellule unique. La fragmentation d'un réseau mitochondrial se produit d'une part pour faciliter le mouvement des mitochondries et réorganiser le réseau au sein de la cellule, et d'autre part pour permettre aux mitochondries non-liées d'exécuter des tâches différentes [70]–[72]. Les outils de microscopie de plus en plus perfectionnés permettent de mener des études de plus en plus poussées et de constater que le contenu mitochondrial d'une cellule unique est hétérogène. En effet, la forme et la localisation de la mitochondrie dans la cellule sont des premières informations relatives à la fonction qu'elle assure. L'utilisation de sondes fluorescentes permet en plus d'évaluer localement le potentiel membranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$ ou la production de ROS. L'ensemble de ces techniques ont permis de mettre en évidence la présence de sous-populations mitochondriales au sein d'une cellule unique (Figure 21). Certaines mitochondries sont dépolarisées ($\Delta\Psi_m = 0$) ce qui traduit une inactivité de l'ETC alors que d'autres sont actives. De plus, on constate que les mitochondries dépolarisées émettent une quantité de ROS particulièrement élevée, ce qui peut être interprété comme une fin de vie, ou alors comme la mise en évidence d'une signalisation intra-cellulaire et du rôle de messenger de la mitochondrie. D'autres sous-populations présentent un niveau normal d'émission de ROS ou encore un niveau très bas. Quant à l'organisation spatiale, on suppose que les mitochondries situées à la périphérie, proche de la membrane plasmique, ont pour rôle de protéger les autres composants cellulaires de la forte

concentration en oxygène extracellulaire, formant ainsi une barrière protectrice régulant la concentration en oxygène intracellulaire. Les mitochondries situées plus au centre ont comme rôle principal de fournir l'ATP aux autres organites et de participer à la signalisation pour coordonner l'ensemble des processus cellulaires. On peut aussi discriminer différentes sous-populations sur la base de leur réponse à l'addition de substrats énergétiques ou d'inhibiteurs de l'ETC. En effet, certaines mitochondries vont privilégier tel ou tel substrat énergétique, par exemple en consommant des acides gras plutôt que du glucose. Enfin, des mitochondries sont très sensibles à l'ajout d'inhibiteurs, alors que d'autres ont la capacité de mettre en œuvre des mécanismes pour contrecarrer son action, et demandent donc des doses plus élevées pour être sensibilisées.



- Mitochondries polarisées produisant des ROS
 - Mitochondries polarisées ne produisant pas ou peu de ROS
 - Mitochondries dépolarisées produisant des ROS
- N : indique le noyau**

Figure 21 Observation par microscopie confocale de l'hétérogénéité mitochondriale. A : fluorescence fonction du potentiel membranaire. B : fluorescence fonction de la production de ROS. C : images superposées. Adapté d'après [71] et [72].

Conclusion

Le dérèglement métabolique constitue une des caractéristiques majeures du cancer. L'élévation de la production de ROS ainsi que la production d'oncométabolites [73], contraignent les cellules cancéreuses à toujours proliférer tout en ignorant le processus de mort par apoptose. Dans les LAM, on sait désormais que le statut métabolique des cellules tumorales joue aussi un rôle central dans les mécanismes conduisant à la chimiorésistance et à la rechute des patients suite aux traitements administrés actuellement, ce qui a aussi été montré dans de nombreux cancers solides [74]. De plus, cette nouvelle

donnée permet de renforcer l'idée selon laquelle les traitements actuels aboutissent à la sélection par un mécanisme darwinien des cellules présentant le phénotype particulier de la RLC. Selon la théorie de l'évolution clonale [75], le traitement actuel, quand il n'est pas efficace à la première tentative, va *in fine* provoquer l'adaptation du patient au traitement, et ainsi réduire fortement ses chances de survie.

Le traitement innovant imaginé par l'équipe RESISTAML consisterait à rendre la population leucémique hétérogène homogène, d'un point de vue énergétique et métabolique, pour assurer l'efficacité des traitements dès la phase d'induction, et faire tendre les probabilités de rechutes vers zéro.

La mise au point d'un tel traitement nécessite une compréhension totale des mécanismes liant métabolisme et chimiorésistance, ce qui sous-entend l'usage d'outils d'analyses de la fonction mitochondriale à plusieurs échelles : population cellulaire, cellule unique, population de mitochondries isolées, et mitochondrie unique. Le prochain chapitre fait l'état de l'art des outils disponibles sur le marché, mais aussi de ceux qui sont en cours de développement, ou juste au stade de preuve de concept.

Bibliographie

- [1] Barnes, Corp, Loutit, and Neal, "Treatment of murine leukaemia with x rays and homologous bone marrow," *Br. Med. J.*, pp. 626–627, 1956.
- [2] G. J. Spangrude, S. Heimfeld, and I. L. Weissman, "Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells," *Science*, vol. 241, no. 4861, pp. 58–62, 1988.
- [3] M. F. Pittenger *et al.*, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, 1999.
- [4] R. J. Berenson *et al.*, "Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons.," *J. Clin. Invest.*, vol. 81, no. 3, pp. 951–955, 1988.
- [5] M. Bhatia, J. C. Wang, U. Kapp, D. Bonnet, and J. E. Dick, "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 10, pp. 5320–5325, 1997.
- [6] J. M. Bennett *et al.*, "Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group," *Br. J. Haematol.*, vol. 33, no. 4, pp. 451–458, 1976.
- [7] D. A. Arber *et al.*, "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia," *Blood*, vol. 127, no. 20, pp. 2391–2405, May 2016.
- [8] A. Belot *et al.*, *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005*. Institut de veille sanitaire Saint-Maurice (France), 2008.
- [9] G. Van Maele-Fabry, S. Duhayon, and D. Lison, "A systematic review of myeloid leukemias and occupational pesticide exposure," *Cancer Causes Control*, vol. 18, no. 5, pp. 457–478, Jun. 2007.
- [10] M. S. Tallman, "Drug therapy for acute myeloid leukemia," *Blood*, vol. 106, no. 4, pp. 1154–1163, Aug. 2005.
- [11] H. Döhner, D. J. Weisdorf, and C. D. Bloomfield, "Acute Myeloid Leukemia," *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 12, pp. 1136–1152, Sep. 2015.
- [12] E. Estey and H. Döhner, "Acute myeloid leukaemia," *The Lancet*, vol. 368, no. 9550, pp. 1894–1907, 2006.
- [13] H.-J. Kolb, "Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapy: KOLB," *HLA*, vol. 89, no. 5, pp. 267–277, May 2017.
- [14] S. Cassidy and B. A. Syed, *Acute myeloid leukaemia drugs market*. Nature Publishing Group, 2016.
- [15] R. J. DeBerardinis and N. S. Chandel, "Fundamentals of cancer metabolism," *Sci. Adv.*, vol. 2, no. 5, pp. e1600200–e1600200, May 2016.
- [16] O. Warburg, "On the origin of cancer cells," *Science*, vol. 123, no. 3191, pp. 309–314, 1956.
- [17] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation," *Science*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–1033, May 2009.

- [18] E. L. Pearce, M. C. Poffenberger, C.-H. Chang, and R. G. Jones, “Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function,” *Science*, vol. 342, no. 6155, pp. 1242454–1242454, Oct. 2013.
- [19] L. S. P. Winer and M. Wu, “Rapid analysis of glycolytic and oxidative substrate flux of cancer cells in a microplate,” *PloS One*, vol. 9, no. 10, p. e109916, 2014.
- [20] E. Racker, “History of the Pasteur effect and its pathobiology,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 5, no. 1–2, pp. 17–23, 1974.
- [21] R. H. De Deken, “The Crabtree effect: a regulatory system in yeast,” *Microbiology*, vol. 44, no. 2, pp. 149–156, 1966.
- [22] T. Farge *et al.*, “Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism,” *Cancer Discov.*, vol. 7, no. 7, pp. 716–735, Jul. 2017.
- [23] E. Saland *et al.*, “A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia,” *Blood Cancer J.*, vol. 5, no. 3, p. e297, Mar. 2015.
- [24] M. Dean, T. Fojo, and S. Bates, “Tumour stem cells and drug resistance,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 4, pp. 275–284, Apr. 2005.
- [25] S. J. Horton and J. P. Huntly, “Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology,” *Haematologica*, vol. 97, no. 7, pp. 966–974, 2012.
- [26] S. W. Lane, D. T. Scadden, and D. G. Gilliland, “The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities,” *Blood*, vol. 114, no. 6, pp. 1150–1157, Aug. 2009.
- [27] E. M. Kuntz *et al.*, “Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells,” *Nat. Med.*, vol. 23, no. 10, pp. 1234–1240, Sep. 2017.
- [28] M. Škrtić *et al.*, “Inhibition of Mitochondrial Translation as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia,” *Cancer Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 674–688, Nov. 2011.
- [29] S. E. Weinberg and N. S. Chandel, “Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 9–15, Jan. 2015.
- [30] Y. Zhao, E. B. Butler, and M. Tan, “Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics,” *Cell Death Dis.*, vol. 4, no. 3, pp. e532–e532, Mar. 2013.
- [31] D. G. Searcy, “Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria,” *Cell Res.*, vol. 13, no. 4, p. 229, 2003.
- [32] G. E. Andersson, O. Karlberg, B. Canbäck, and C. G. Kurland, “On the origin of mitochondria: a genomics perspective,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 358, no. 1429, pp. 165–179, 2003.
- [33] S. G. Andersson *et al.*, “The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria,” *Nature*, vol. 396, no. 6707, p. 133, 1998.
- [34] R. W. Estabrook and A. Holowinsky, “Studies on the content and organization of the respiratory enzymes of mitochondria,” *J. Cell Biol.*, vol. 9, no. 1, pp. 19–28, 1961.

- [35] E. D. Robin and R. Wong, "Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells," *J. Cell. Physiol.*, vol. 136, no. 3, pp. 507–513, 1988.
- [36] J. Bereiter-Hahn and M. Vöth, "Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 27, no. 3, pp. 198–219, 1994.
- [37] L. Plecítá-Hlavatá, M. Lessard, J. Šantorová, J. Bewersdorf, and P. Ježek, "Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1777, no. 7–8, pp. 834–846, Jul. 2008.
- [38] G. Szabadkai, A. M. Simoni, M. Chami, M. R. Wieckowski, R. J. Youle, and R. Rizzuto, "Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca²⁺ Waves and Protects against Ca²⁺-Mediated Apoptosis," *Mol. Cell*, vol. 16, pp. 59–68, 2004.
- [39] K. T. Tokuyasu, "Dynamics of Spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*," *J. Ultrastruct. Res.*, vol. 53, pp. 93–112, 1975.
- [40] L. Fabian and J. A. Brill, "Drosophila spermiogenesis: Big things come from little packages," *Spermatogenesis*, vol. 2, no. 3, pp. 197–212, Jul. 2012.
- [41] K. G. Hales and M. T. Fuller, "Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase," *Cell*, vol. 90, no. 1, pp. 121–129, 1997.
- [42] S.-B. Ong, A. R. Hall, and D. J. Hausenloy, "Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Health and Disease," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 19, no. 4, pp. 400–414, Aug. 2013.
- [43] A. F. MacAskill and J. T. Kittler, "Control of mitochondrial transport and localization in neurons," *Trends Cell Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 102–112, Feb. 2010.
- [44] K. Richetin *et al.*, "Amplifying mitochondrial function rescues adult neurogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease," *Neurobiol. Dis.*, vol. 102, pp. 113–124, Jun. 2017.
- [45] E. I. Rugarli and T. Langer, "Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons," *EMBO J.*, vol. 31, no. 6, pp. 1336–1349, 2012.
- [46] G. Csordás *et al.*, "Imaging Interorganellar Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface," *Mol. Cell*, vol. 39, no. 1, pp. 121–132, Jul. 2010.
- [47] C. Giorgi, D. De Stefani, A. Bononi, R. Rizzuto, and P. Pinton, "Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 10, pp. 1817–1827, Oct. 2009.
- [48] R. Rizzuto, "Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses," *Science*, vol. 280, no. 5370, pp. 1763–1766, Jun. 1998.
- [49] J. A. W. Heymann, D. Shi, S. Kim, D. Bliss, J. L. S. Milne, and S. Subramaniam, "3D Imaging of mammalian cells with ion-abrasion scanning electron microscopy," *J. Struct. Biol.*, vol. 166, no. 1, pp. 1–7, Apr. 2009.

- [50] I. R. Boldogh and L. A. Pon, "Mitochondria on the move," *Trends Cell Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 502–510, Oct. 2007.
- [51] B. Huang, S. A. Jones, B. Brandenburg, and X. Zhuang, "Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution," *Nat. Methods*, vol. 5, no. 12, pp. 1047–1052, Dec. 2008.
- [52] K. Magalon *et al.*, "Olesoxime favors oligodendrocyte differentiation through a functional interplay between mitochondria and microtubules," *Neuropharmacology*, vol. 111, pp. 293–303, Dec. 2016.
- [53] S. Kumar, G. G. Wolken, N. J. Wittenberg, E. A. Arriaga, and S.-H. Oh, "Nanohole Array-Directed Trapping of Mammalian Mitochondria Enabling Single Organelle Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 24, pp. 11973–11977, Dec. 2015.
- [54] Y. Tian *et al.*, "High resolution imaging of mitochondrial membranes by in situ atomic force microscopy," *RSC Adv*, vol. 3, no. 3, pp. 708–712, 2013.
- [55] H. A. Krebs and W. A. Johnson, "Metabolism of ketonic acids in animal tissues," *Biochem. J.*, vol. 31, no. 4, p. 645, 1937.
- [56] P. Mitchell and J. Moyle, "Chemiosmotic Hypothesis of Oxidative Phosphorylation," *Nature*, pp. 137–139, 1967.
- [57] M. P. Murphy, "How mitochondria produce reactive oxygen species," *Biochem. J.*, vol. 417, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2009.
- [58] J. F. Turrens, "Mitochondrial formation of reactive oxygen species," *J. Physiol.*, vol. 552, no. 2, pp. 335–344, Oct. 2003.
- [59] J. F. Turrens, "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain," *Biosci. Rep.*, vol. 17, no. 1, pp. 3–8, 1997.
- [60] D. Harman, "Free radical theory of aging," *Mutat. Res.*, vol. 275, no. 3–6, pp. 257–266, 1992.
- [61] C. Richter, "Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria," *Mutat. Res.*, vol. 275, no. 3–6, pp. 249–255, 1992.
- [62] Y. Michikawa, F. Mazzucchelli, N. Bresolin, G. Scarlato, and G. Attardi, "Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication," *Science*, vol. 286, pp. 777–779, 1999.
- [63] T.-C. Yen, Y.-S. Chen, K.-L. King, S.-H. Yeh, and Y.-H. Wei, "Liver mitochondrial respiratory functions decline with age," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 165, no. 3, pp. 994–1003, 1989.
- [64] G. C. Kujoth *et al.*, "Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging," *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 476–481, Jul. 2005.
- [65] J. R. Stone and S. Yang, "Hydrogen peroxide: a signaling messenger," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, no. 3–4, pp. 243–270, 2006.

- [66] V. Gogvadze, S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, "Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1757, no. 5–6, pp. 639–647, May 2006.
- [67] D. R. Green and J. C. Reed, "Mitochondria and apoptosis," *science*, pp. 1309–1312, 1998.
- [68] J. Cai, J. Yang, and D. P. Jones, "Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1366, pp. 139–149, 1998.
- [69] K. Ye, J. Lu, F. Ma, A. Keinan, and Z. Gu, "Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 29, pp. 10654–10659, Jul. 2014.
- [70] H. Chen, A. Chomyn, and D. C. Chan, "Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 28, pp. 26185–26192, Jul. 2005.
- [71] A. V. Kuznetsov and R. Margreiter, "Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 4, pp. 1911–1929, Apr. 2009.
- [72] A. V. Kuznetsov, J. Troppmair, R. Sucher, M. Hermann, V. Saks, and R. Margreiter, "Mitochondrial subpopulations and heterogeneity revealed by confocal imaging: Possible physiological role?," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1757, no. 5–6, pp. 686–691, May 2006.
- [73] L. B. Sullivan, D. Y. Gui, and M. G. V. Heiden, "Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, no. 11, pp. 680–693, Nov. 2016.
- [74] C. Bosc, M. A. Selak, and J.-E. Sarry, "Resistance Is Futile: Targeting Mitochondrial Energetics and Metabolism to Overcome Drug Resistance in Cancer Treatment," *Cell Metab.*, vol. 26, no. 5, pp. 705–707, 2017.
- [75] L. Ding *et al.*, "Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing," *Nature*, vol. 481, no. 7382, pp. 506–510, Jan. 2012.

Chapitre 2

Les Méthodes Actuelles d'Analyse de la Fonction Mitochondriale

Introduction

Un capteur transforme une grandeur physique (température, pression...), ou chimique (concentrations d'espèces en phase gazeuse ou liquide), en une grandeur aisément interprétable telle que le niveau de mercure dans un thermomètre, ou plus souvent un signal électrique (courant, tension...). Un capteur est presque systématiquement associé à un instrument de mesure servant à le placer dans des conditions analytiques idéales, et éventuellement à mettre en forme le signal avant de le délivrer à l'utilisateur. Voici les principaux critères utilisés pour les caractériser et comparer leurs performances :

- **L'étendue ou la gamme de mesure** : intervalle de grandeurs dans lequel le capteur est apte à mesurer. **La limite de détection** (LOD) correspond à la borne inférieure de l'intervalle.
- **La sensibilité** : aptitude à réagir plus ou moins vivement à une variation de la grandeur d'intérêt. Elle reflète la capacité du capteur à percevoir de petites variations.
- **Le temps de réponse** : temps nécessaire au capteur pour délivrer une réponse exacte à partir de la détection d'une variation du signal d'entrée.
- **La stabilité** : qualifie la capacité du capteur à conserver les mêmes caractéristiques au cours du temps.
- **La sélectivité** : qualifie la capacité du capteur à être uniquement sensible à l'élément d'intérêt. **Les interférents** sont des éléments détectés de manière involontaire par le capteur.

C'est toujours le contexte d'application, et les exigences associées, qui permettent de classer ces critères par ordre d'importance lors de la phase de conception d'un capteur. Nous nous en servons dans un premier temps pour comparer les méthodes actuelles d'analyse de la fonction mitochondriale.

I Les outils utilisés en routine dans les laboratoires de biologie : mesure de la consommation d'oxygène

I.1 L'électrode de Clark

Incontestablement, l'outil le plus répandu pour la mesure de la concentration en oxygène dissout en solution est l'électrode de Clark (Figure 1). Leland Clark, professeur de chimie aux États-Unis d'Amérique, donna son nom à son invention au début des années 1950. Il s'agissait alors d'un système permettant de mesurer en temps réel la concentration d'oxygène dans le sang [1]. Deux électrodes, une en platine et une en argent, sont encapsulées dans un capillaire en verre contenant un électrolyte, le tout séparé de la solution à analyser par une membrane perméable à l'oxygène. L'application d'une différence de potentiel entre les deux électrodes à l'aide d'une source externe, provoque la réduction de l'oxygène à la surface de l'électrode de platine [2], selon l'une des équations :

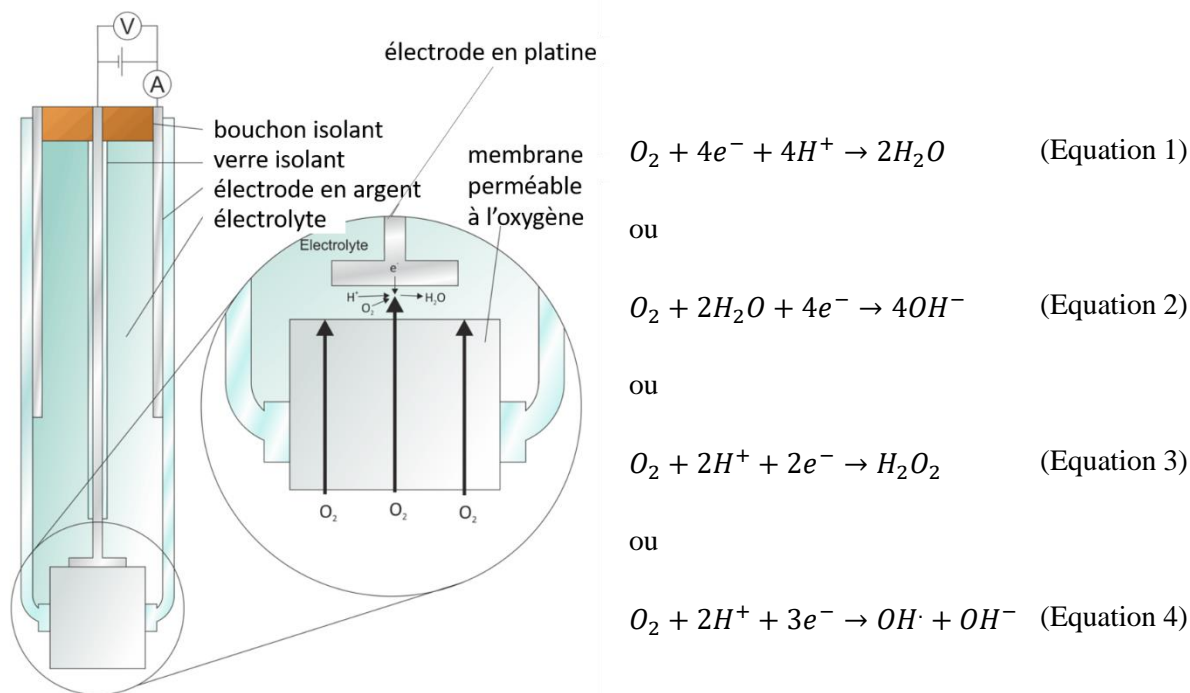


Figure 1 Schéma descriptif de l'électrode de Clark et les réactions associées à la réduction de l'oxygène sur une électrode en platine, source : Wikipédia (https://en.wikipedia.org/wiki/Clark_electrode).

C'est le matériau constituant l'électrode, à savoir le platine, qui libère les électrons nécessaires à la réduction de l'oxygène, tandis qu'une contre réaction (fournisseuse d'électrons) se produit à la surface de la seconde électrode. Cela va permettre de constituer un circuit fermé, dans lequel les charges vont circuler, sous forme d'électrons dans les métaux ou d'ions dans l'électrolyte. Il suffit alors de venir placer un ampèremètre dans le circuit, pour mesurer un courant dont la valeur est directement proportionnelle à la quantité d'espèces réagissant à la surface de l'électrode de platine, c'est-à-dire à la concentration d'oxygène présent en solution. L'une des innovations majeures apportée par l'électrode de Clark réside en la présence d'un électrolyte séparé de la solution d'intérêt par une membrane semi-perméable. Cette configuration permet d'une part, de mieux contrôler le potentiel appliqué, et d'autre part, d'effectuer des mesures en milieux complexes tel que le sang. En effet, la présence en grande quantité de cellules au sein d'un liquide comme le sang entraîne un phénomène désigné dans la littérature sous le terme « Biofouling ». Ce terme décrit la sédimentation d'espèces biologiques sur une surface d'intérêt, qui est dans notre cas la surface de l'électrode en platine. Si l'électrode était directement mise en contact avec le sang, alors un biofilm se formerait progressivement à la sa surface. La présence d'une membrane renouvelée à chaque utilisation [3], permet d'aboutir à un capteur dont les performances perdurent dans le temps.

Actuellement, les sociétés Strathkelvin et Hansatech sont leaders du marché et proposent des systèmes adaptés à l'analyse de matériel biologique dans des volumes réduits, de l'ordre de la centaine de microlitres. Ces systèmes, nommés oxygraphes ou chambres d'oxygraphie (Figure 2), sont plus ou moins sophistiqués mais le principe de mesure reste celui inventé par le Professeur Leland Clark.

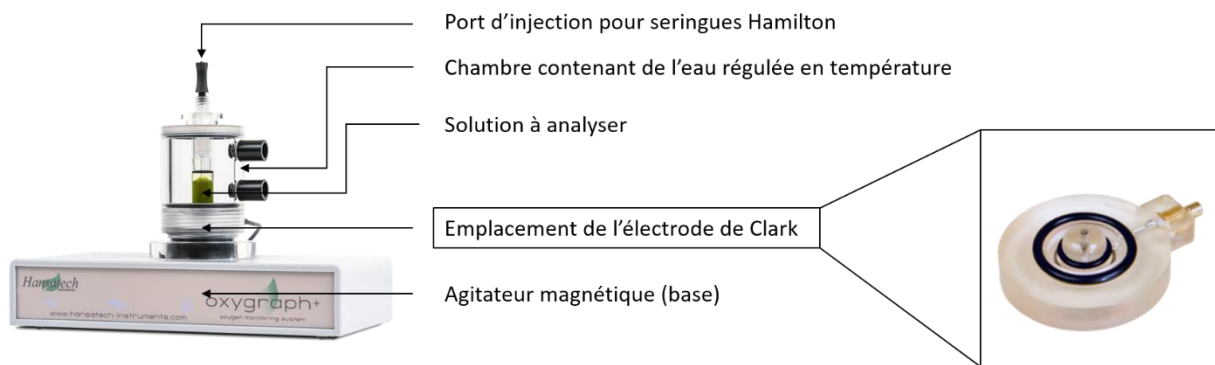


Figure 2 Description de la chambre d'oxygraphie proposées par la société Hansatech, source : <http://www.hansatech-instruments.com>.

I.2 L'Oroboros

Un autre outil, toujours basé sur le même principe de mesure en ce qui concerne l'oxygène, est assez largement répandu dans les laboratoires de biologie malgré son coût élevé (environ 45K€) : l'Oroboros. Cette technologie présente l'avantage de proposer la mesure simultanée d'autres biomarqueurs ou métabolites que l'oxygène, tels que l'ATP, le peroxyde d'hydrogène [4], le potentiel membranaire mitochondrial, et le calcium. Pour ce faire, un capteur de fluorescence (module vendu séparément) est utilisé conjointement à des fluorochromes spécifiques. Une électrode permettant la mesure du pH est aussi proposée séparément. L'appareil est constitué de deux chambres indépendantes dont le volume peut être ajusté entre 1,5 ml et 3,2 ml. Ce volume, relativement conséquent comparé aux solutions précédemment évoquées, requiert donc une grande quantité d'éléments biologiques à analyser (en considérant des cellules ou mitochondries isolées à une concentration constante) ce qui peut être problématique lorsque les échantillons sont en quantité limitée, comme des cellules primaires de patients, ou des cellules « en sortie de souris ».

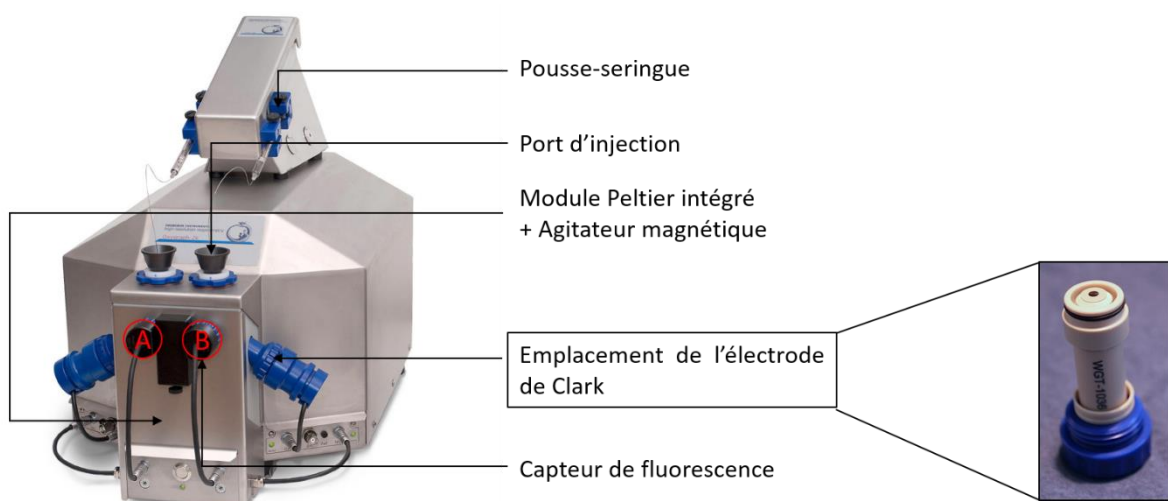


Figure 3 Description de l'Oroboros, source : <http://www.orooboros.at>

I.3 Les Seahorse XF analyzers

La technologie Seahorse développée par la société Agilent est basée sur l'usage de fluorochromes solides. On dispose des cellules ou mitochondries isolées dans des plaques de 8, 24 ou 96 puits selon le modèle (XFp, XFe24, XFe96 respectivement) de telle sorte qu'elles forment une monocouche. Cette contrainte ne pose pas de problème avec des cellules naturellement adhérentes, en revanche cela complique le protocole expérimental lorsque les cellules concernées sont en suspension, ou lorsque l'on souhaite travailler avec des mitochondries isolées. Chaque puits représente un volume de 500 μ l, le nombre de cellules à disposer par puits varie entre 10 000 et 100 000 selon le type cellulaire. Lors de l'expérience, des fibres optiques vont descendre dans chacun des puits de façon à les fermer hermétiquement (Figure 4). Deux fluorochromes solides sont immobilisés à la surface de chaque fibre, quand ils sont excités aux longueurs d'ondes adéquates, l'un va émettre une lumière dont l'intensité sera fonction de la concentration en ions H^+ , tandis que l'autre émettra une lumière dont l'intensité est fonction de la concentration en oxygène. Le Seahorse permet ainsi de suivre en temps réel et de manière simultanée la consommation d'oxygène, qui est à l'image de l'activité mitochondriale (phosphorylation oxydative), et l'acidification du milieu extracellulaire qui, quant à elle, est principalement causée par le processus de glycolyse (production d'acide lactique qui se décompose en lactate et protons). Par ailleurs, des cartouches comprenant quatre substrats énergétiques, ou inhibiteurs de l'ETC, ou d'autres substances agissant sur le métabolisme cellulaire, peuvent être achetées séparément. Ces cartouches permettent de délivrer de manière prédéfinie dans le temps des volumes contrôlés. Ceci permet alors la définition de scénarios rendant automatique la procédure. Les kits proposés et les plaques sont à usage limité (une plaque par expérience). Ces consommables rendent chaque expérience coûteuse, coût qu'il faut ajouter au prix d'achat extrêmement élevé de l'appareil de mesure (70K€ pour le modèle d'entrée de gamme XFp, 150K€ pour le XFe24 et 190K€ pour le XFe96).

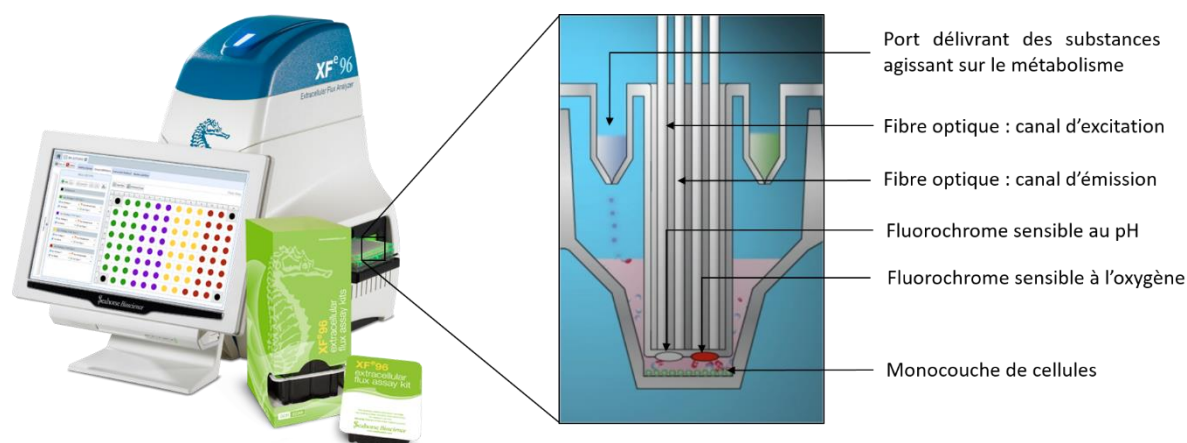


Figure 4 Description du principe de la technologie SeaHorse commercialisée par Agilent. On y voit un puits et ses fibres optiques associées. Source : vidéo promotionnelle (<https://www.youtube.com/watch?v=5ETH3VBaX3Q>)

I.4 Comparaison des différentes solutions

Pour conclure sur ces différentes solutions commerciales, le tableau 1, extrait d'une publication de Zhang et al. dans Nature Protocols [5], résume très bien les avantages et inconvénients de chacune.

Table 1 Comparaison des différentes solutions disponibles sur le marché pour la mesure de la consommation d'oxygène associée au métabolisme cellulaire, d'après [5].

Method	Principle	Advantages/disadvantages
<i>Extracellular flux (O_2 consumption, lactate excretion) analysis methods</i>		
Traditional Clark-type oxygen electrode (e.g., Hansatech Instruments)	Oxygen dissolved in liquid or gas phase in the sample chamber is detected by polarography using a Clark-type oxygen electrode ^{47,48}	Advantages: flexibility in measuring mitochondrial functions (see Table 2). Isolated mitochondria, permeabilized cells or intact cells can be used, and large numbers of substrates, inhibitors or uncouplers can be easily added Disadvantages: oxygen continuously leaks from the apparatus, time-consuming system assembly, some drugs are not easily removed and intensive chamber washing may be required, frequent calibration required, oxygen-sensing electrode typically has a short lifetime, and large sample sizes required
Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instruments)	Oxygen dissolved in liquid or gas phase in the sample chamber is detected by polarography using a Clark-type oxygen electrode with high-resolution respirometry ^{4,49}	This is an advanced polarimeter that has two chambers for parallel measurements Advantages: instrument setup and calibration need to be done every few months, oxygen leak from instrument is reduced, increased detection sensitivity and small samples can be used Disadvantages: instrument cost
XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience)	Detection of OCR with oxygen-sensing fluorophores and ECAR with pH sensor simultaneously in the same population of intact cells ⁵⁰	Advantages: small sample sizes (e.g., $\sim 10^4$ intact cells), OCR and ECAR in parallel 24-well or 96-well plate measurements, allowing for replicates and multiple conditions, sensors in close proximity to cells increasing accuracy, plates/cartridges are disposable Disadvantages: instrument and consumable plate costs, limited number and type of delivered modifiers

Finale­ment, la différence majeure entre le SeaHorse et les autres solutions est le temps de mise en œuvre. En effet, les cartouches contenant les puits doivent être préparées la veille de l'expérience. On estime le temps total nécessaire pour mener une expérience avec le SeaHorse à 22 heures contre 3 heures en moyenne pour l'ensemble des autres solutions. Ces données sont à relativiser, puisque seul le SeaHorse permet de paralléliser les analyses (22h / 96 puits = 0,23h). On peut aussi relever que les systèmes proposés par les sociétés Hansatech et Strathkelvin ne permettent pas la mesure simultanée d'autres biomarqueurs du métabolisme cellulaire que la consommation de l'oxygène, contrairement au SeaHorse qui permet la mesure du pH, et à l'Oroboros qui offre une grande flexibilité.

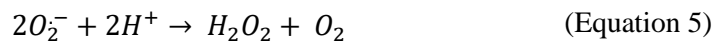
II Les outils utilisés en routine dans les laboratoires de biologie : mesure de la production d'espèces réactives oxygénées

II.1 Caractéristiques des principaux ROS étudiés

Comme évoqué précédemment, on distingue parmi la famille des ROS principalement trois espèces : l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, dont nous allons rappeler les principales caractéristiques.

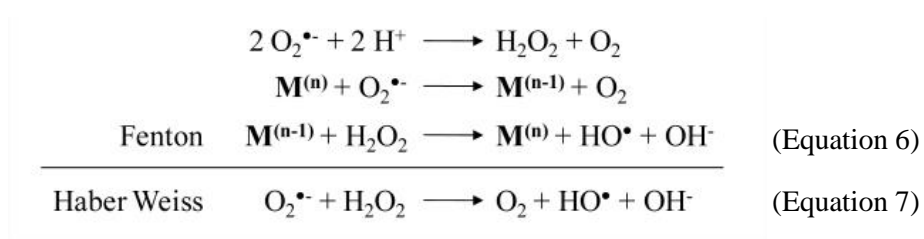
L'anion superoxyde

L'anion superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire par l'ajout d'un électron. Il n'est pas capable de franchir les membranes lipidiques et se retrouve par conséquent séquestré dans le compartiment où il a été produit, soit aux abords de la membrane interne mitochondriale. Sa durée de vie est courte puisqu'il se transforme rapidement en oxygène et peroxyde d'hydrogène par dismutation ($k = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 25°C, pH 7,4), ou par l'action de l'enzyme superoxyde dismutase ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 25°C, pH 7,4) [6] selon l'équation suivante (Equation 5) :



Le peroxyde d'hydrogène

H_2O_2 n'est pas un radical libre mais il est important de le considérer, car contrairement à O_2^- il est capable de franchir les barrières lipidiques. Dans une situation de stress oxydant, où le système enzymatique (catalase et peroxydases) est dépassé, le peroxyde d'hydrogène joue finalement le rôle d'intermédiaire. Il se déplace dans toutes les directions et se transforme en radical hydroxyle, suite à une rencontre fortuite avec un ion métallique (souvent ferreux) selon la réaction de Fenton (Equation 6), ou au contact de l'anion superoxyde selon l'équation d'Haber-Weiss (Equation 7) tel que :



M désigne un ion métallique.

Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est très réactif, son temps de demi-vie étant estimé inférieur à 70 ns dans l'eau [7], il diffuse donc peu et agit directement sur son site de production. Il est particulièrement nocif puisqu'il peut potentiellement endommager tous les types de macromolécules en domaine biologique : les glucides, les acides nucléiques, les lipides et les acides aminés. De plus, il n'existe pas de système enzymatique dédié à sa détoxification, contrairement à O_2^- et H_2O_2 . Les vitesses de réaction entre les radicaux $\cdot\text{OH}$ et les composés organiques sont très rapides, de l'ordre de 10^6 à $10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ [8].

II.2 Liste des différentes approches

De par leur caractère hautement réactif, les ROS sont dans l'ensemble difficilement détectables. Deux approches se font alors concurrence (Figure 5). La première consiste à mesurer directement les espèces réactives oxygénées, alors que la seconde consiste à mesurer des biomarqueurs du stress oxydant, constituant ainsi une approche indirecte [9]. Les méthodes indirectes se divisent elles-mêmes en deux

catégories. La première repose sur la quantification des dommages cellulaires (peroxydation lipidiques, dégâts subit par le matériel génétique, les protéines...), alors que la seconde repose principalement sur la quantification des espèces impliquées dans la détoxification, c'est-à-dire sur la mesure de l'activité du système enzymatique.

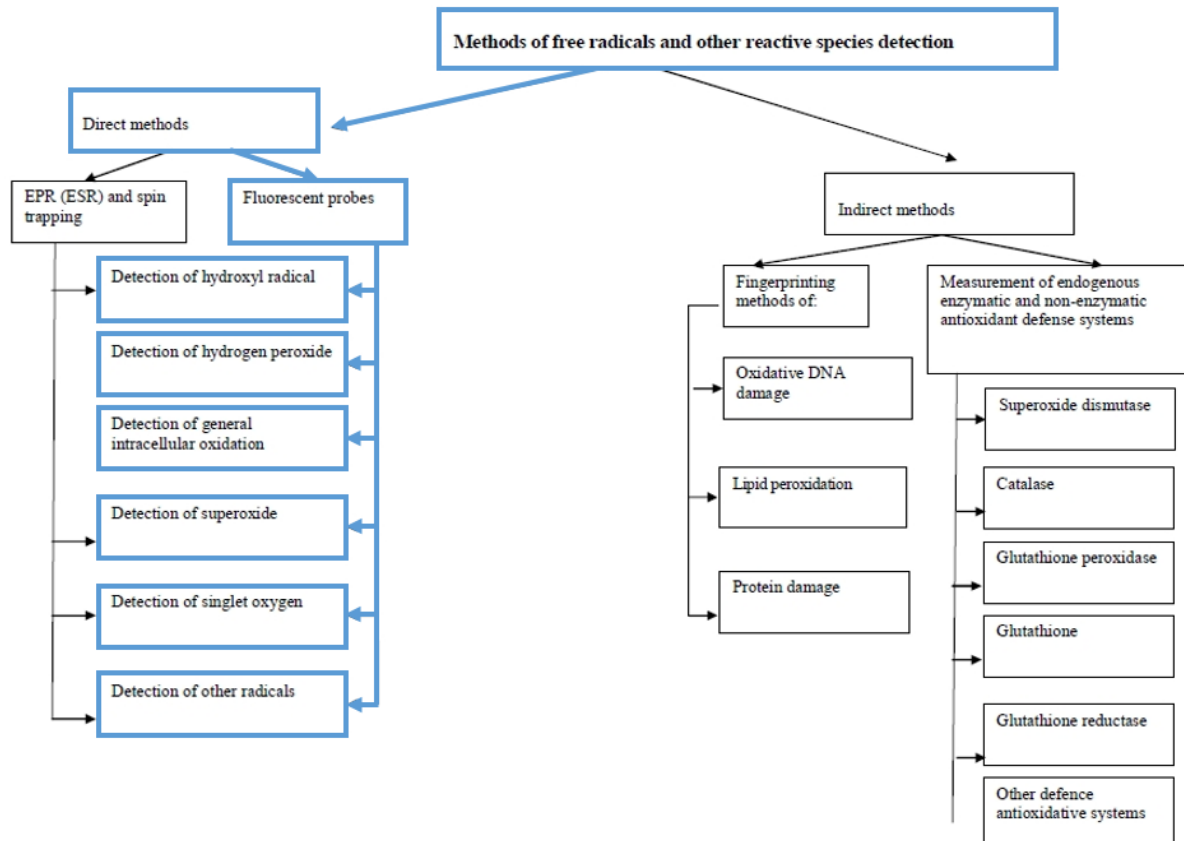


Figure 5 Diagramme présentant les méthodes actuelles de détection des ROS, d'après [9].

La figure 5 présente parmi les méthodes directes la résonance électronique de spin (ESR) comme une solution possible pour quantifier les ROS. Bien qu'étant particulièrement sélective, cette méthode basée sur la mesure de la transition d'état de spin d'espèces paramagnétiques (les électrons non-appariés se comportant comme de petits aimants) soumises à un champ magnétique, est peu sensible car elle permet de détecter des espèces radicalaires dont la concentration est constante (du radical directement ou d'un radical stabilisé nommé « spin adduct »), et de l'ordre de la micromole par litre [10]. Etant difficile à mettre en œuvre (matériel cher, encombrant, et mesures effectuées à basse température), cette méthode n'entre pas dans la catégorie des outils utilisés en routine. Par ailleurs, les méthodes indirectes présentent intrinsèquement des risques d'erreurs d'interprétation, c'est la raison pour laquelle nous nous intéresserons par la suite exclusivement aux méthodes de détection directes : les méthodes optiques.

II.3 Description des méthodes de mesures optiques

Avant de décrire les méthodes utilisées, il est important de définir les exigences pour de telles sondes, Winterbound [11] en définit cinq par ordre croissant de difficulté :

1. La mise en évidence de troubles du statut redox cellulaire
2. La détection d'un oxydant spécifique
3. La mise en évidence d'un déficit dans la formation ou la destruction d'un oxydant spécifique
4. L'identification précise du site de production
5. La quantification de la production d'un oxydant spécifique

Fluorescence

Il est possible de classer l'ensemble des sondes fluorescentes selon deux groupes : les sondes « oxidant-sensible », et les sondes « non-redox ». Le premier groupe comporte des composés aromatiques qui, lorsqu'ils sont oxydés, vont produire un élément fluorescent. Le second groupe consiste en un fluorochrome masqué, qui perdra son masque suite à l'oxydation, devenant ainsi fluorescent. Pour générer et mesurer le signal fluorescent émis par la sonde, il est nécessaire de l'exciter à une longueur d'onde donnée. On note $\lambda_{excitation}$ la longueur d'onde permettant d'induire le signal de fluorescence, et $\lambda_{emission}$ la longueur d'onde utilisée pour mesurer le signal de fluorescence émis.

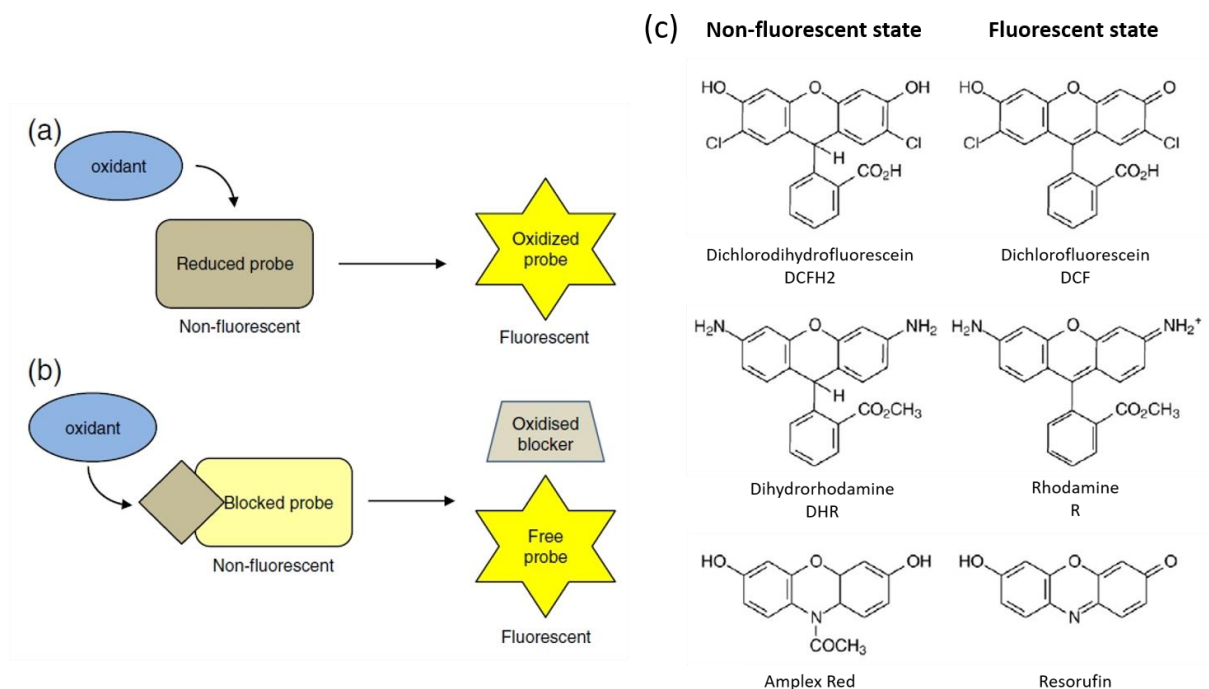


Figure 6 Schémas de principe des sondes fluorescentes de types "oxidant-sensible" (a) et "non-redox" (b). Structures chimiques des sondes "oxidant-sensible" les plus communément utilisées selon leur état de fluorescence (c), d'après [11].

La figure 6c présente exclusivement des sondes « oxidant-sensible » (Figure 6a) qui sont aujourd'hui largement répandues mais souffrent toutes de défauts plus ou moins importants. Une des caractéristiques majeures de ces sondes est qu'elles sont toutes oxydées par un électron selon un mécanisme de radicaux libres, ce qui produit un intermédiaire radicalaire de la sonde, qui sera lui-même oxydé une seconde fois pour donner le produit fluorescent. Peter Wardman [12] a schématisé les réactions susceptibles de participer à la production de la dichlorofluoresceine (DCF) fluorescente. Ce schéma (Figure 7) illustre la complexité du fonctionnement de la sonde, et montre que le signal de fluorescence peut être provoqué

par des voies très variées, voire par la sonde elle-même. Des schémas d'une complexité équivalente peuvent s'appliquer à l'ensemble des sondes « oxidant-sensible ».

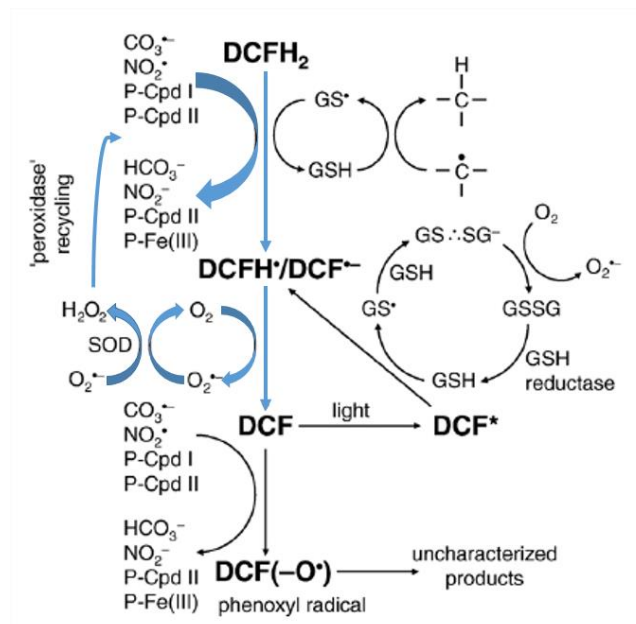


Figure 7 Principales voies de réaction de la sonde fluorescente réduite dichlorodihydrofluorescéine pour la détection de ROS intracellulaires, d'après [12]. La voie de production de ROS liée à la présence de la sonde est notée en bleu.

Les sondes « non-redox » (Figure 6b) sont moins répandues mais connaissent actuellement un essor important dans le but de surpasser les limitations liées au principe même de fonctionnement des sondes « oxidant-sensible ». Ici le fluorochrome est bloqué par un masque, constitué généralement de molécules faisant partie de la famille des acides boroniques [13]. Cette fois le masque va subir l'oxydation et libérer le fluorochrome dont l'état d'oxydation reste quant à lui inchangé. Cette méthode permet d'éviter la génération de radicaux libres intermédiaires, et ainsi de s'affranchir des complications associées. La principale limite de cette technique réside en sa cinétique. En effet, la réaction du peroxyde d'hydrogène avec la sonde est dix millions de fois plus lente qu'avec les enzymes présentes in vivo, comme la glutathion peroxydase. Ce type de sonde est donc plus adapté à la mesure de concentration de ROS à l'état d'équilibre plutôt que des variations rapides de flux [11], [14]. D'autres sondes « non-redox » ont été développées à base des masques différents, voire même avec la mise en place d'un double masquage, montrant une bonne sélectivité vis-à-vis de l'anion superoxyde [15]. Pour conclure, les sondes « non-redox » semblent s'affranchir des limitations associées aux sondes « oxidant-sensible », néanmoins il demeure nécessaire d'étudier en profondeur leurs mécanismes d'action pour statuer définitivement sur leur caractère sélectif.

Chimiluminescence

La luminescence désigne le phénomène par lequel une molécule portée à un état excité, retrouve son état fondamental en restituant de l'énergie par l'émission de lumière, autrement dit de photons. On parle de chimiluminescence si l'énergie permettant à la molécule d'entrer dans un état excité provient d'une réaction chimique. Le Luminol est la sonde qui a été la plus étudiée, elle constitue donc un bon exemple pour illustrer ce mécanisme. Le Luminol réagit en présence d'espèces oxydantes, pour aboutir à une molécule excitée en passant par deux états intermédiaires, dont un est susceptible de provoquer la

production de l'anion superoxyde [11]. Autrement dit, ici aussi la sonde est susceptible d'être elle-même à l'origine du signal lumineux.

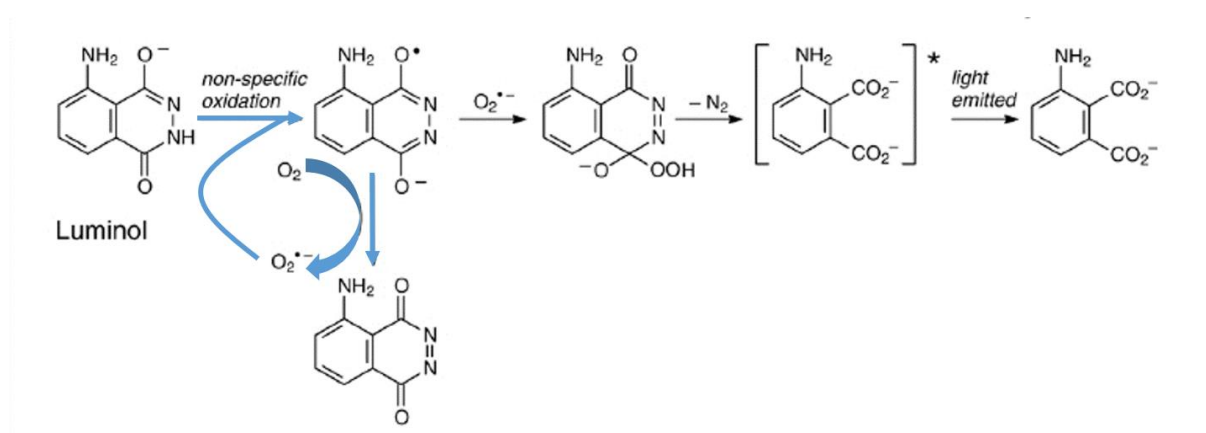


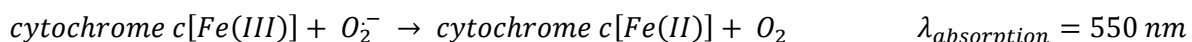
Figure 8 Principales voies de réaction de la sonde chimiluminescente Luminol, d'après [12]. La voie de production de ROS liée à la présence de la sonde est notée en bleu.

Il existe d'autres types de sondes, comme par exemple la Lucigenin, mais toutes semblent souffrir des mêmes limitations. Ainsi la méthode de chimiluminescence, comme celle de fluorescence, présente une bonne sensibilité mais une sélectivité insuffisante.

Colorimétrie

Les techniques colorimétriques sont les premières à avoir été mises en œuvre et elles continuent d'être utilisées actuellement compte tenu de la simplicité de la procédure. La sélectivité de ce type de sondes a été vérifiée, cependant les performances en terme de sensibilité sont moindres qu'en utilisant des sondes fluorescentes ou chimiluminescentes. Cette technique consiste à faire circuler un rayon lumineux à travers une solution d'intérêt, alors qu'un photodétecteur, placé de l'autre côté, permet de tracer un spectre d'absorbance. Si une espèce présente en solution voit son absorbance modifiée en fonction de la quantité de ROS à une certaine longueur d'onde ($\lambda_{absorption}$), alors il est possible de suivre la quantité de ROS produite en temps réel.

Il est par exemple possible de détecter la formation de l'anion superoxyde via la réduction du ferricytochrome c, puisqu'elle se traduit par l'augmentation de l'absorbance à une longueur d'onde de 550 nm [16], [17].



II.4 Conclusion

Les solutions sont nombreuses pour évaluer la concentration en ROS, néanmoins aucune n'est parfaite. Les méthodes indirectes présentent intrinsèquement des risques d'erreurs, tandis que les méthodes directes, largement dominées par les techniques optiques, souffrent de limitations rendant quasiment impossible l'obtention de données quantitatives fiables. Bien qu'il soit difficile de lister de manière

exhaustive les avantages et inconvénients de l'ensemble des sondes disponibles, Marisa Freitas et al. [17] proposent un tableau (tableau 3, page suivante) résumant leurs principales caractéristiques.

Pour recueillir les signaux lumineux émis par les sondes fluorescentes ou chimiluminescentes, deux techniques sont principalement mises en œuvre : la microscopie de fluorescence (ou confocale) et la cytométrie en flux [18]. Ces techniques permettent d'obtenir des informations à l'échelle de la cellule unique, voire même de l'organelle unique [19], mais limitent le potentiel d'applications *in vivo*. Pour conclure, bien qu'elles soient particulièrement sensibles, les méthodes optiques souffrent dans l'ensemble d'un manque de spécificité. De plus, il ressort que ces méthodes sont davantage adaptées à l'évaluation de la quantité d'espèces dont la concentration est constante. Une évaluation qui risque d'ailleurs d'être surestimée puisque les sondes, ou les additifs parfois nécessaires à la réaction, sont susceptibles d'être eux-mêmes à l'origine de la production de ROS. Finalement, l'intérêt principal de ces méthodes réside en la localisation précise des sites de production de ROS.

A l'image du fonctionnement de l'électrode Clark basé sur la réduction de l'oxygène à la surface d'une électrode de platine, il est possible de faire réagir sélectivement des espèces réactives oxygénées électroactives [6], [20]. L'approche électrochimique permet de mesurer précisément leurs concentrations, tout en apportant des données cinétiques, et sans ajout(s) de réactif(s), offrant ainsi un large panel d'applications, tant *in vitro* qu'*in vivo* [21], [22]. De plus, les méthodes électrochimiques répondent favorablement à l'ensemble des critères définissant un bon capteur (gamme de mesure, sensibilité, temps de réponse, stabilité et sélectivité), la limitation ici est l'application de ces principes à l'analyse parallèle d'entités biologiques individuelles (cellules ou organites). C'est ce dont il sera question dans la troisième partie de ce chapitre.

Table 2 Spécificité, localisation cellulaire, longueurs d'ondes associées, avantages et limitations, des principales sondes utilisées pour la détection de la production cellulaire de ROS, d'après [17].

Probe	Reactive species detected	Intra or extracellular localization	$\lambda_{excitation/emission}$ (nm)	Advantages	Limitations
Fluorimetric:					
HE	$O_2^{\bullet-}$	Intracellular	520/560	Specific for $O_2^{\bullet-}$. Small artifactual formation of $O_2^{\bullet-}$ due to redox cycling.	HE enhances the rate of $O_2^{\bullet-}$ dismutation to H_2O_2 and may underestimate the real production of $O_2^{\bullet-}$.
Scopoletin	H_2O_2	Extracellular, intracellular	350/460	Stoichiometric decrease of fluorescence in relation to H_2O_2 concentration.	Kinetics more difficult to follow. Dependent on HRP. Low stability. Auto fluorescence and background fluorescence can occur. Low extinction coefficient.
Amplex red	H_2O_2	Extracellular	563/587	Specific for H_2O_2 . Amplex red: H_2O_2 , 1:1. Is not susceptible to interferences from auto fluorescence. The oxidized amplex red is very stable and has high fluorescence.	Dependent on HRP. To avoid a second oxidation, the molar ratio of oxidized amplex red to H_2O_2 should be above 5.
DHR	H_2O_2 , HOCl	Intracellular	505/529	High sensitivity for H_2O_2 .	The ability of H_2O_2 to diffuse away from its site of generation restricts the conclusions that can be drawn for the experiments.
DCFH	H_2O_2 , HO^{\bullet} , $\bullet NO$, $ONOO^-$	Extracellular	498/522	Detects more than one reactive species.	Dependent on HRP activity. Many different oxidants can change the fluorescence of this substrate, making difficult to use the technique quantitatively.
DCFH-DA		Intracellular			
APF/HPF	HO^{\bullet} , $ONOO^-$, HOCl (only APF)	Intracellular	500/520	It is possible to detect HOCl selectively. HPF and APF are not auto oxidized by light irradiation.	
SNAPF	HOCl	Intracellular	614/676	Selectivity for detection of HOCl.	
DAF-2/DAF-FM	$\bullet NO$	Extracellular	495/515	High sensitivity, and simplicity for the direct and real-time detection of $\bullet NO$. DAF-FM is more sensitive for $\bullet NO$ than DAF-2.	Photobleaching. Interference of $ONOO^-$.
DAF-2 DA/DAF-FM DA		Intracellular			
GPF	HOCl, $ONOOH$, $\bullet NO_2$	Intracellular	465-497/516-558	High sensitivity for HOCl.	The loss of GFP fluorescence does not allow the distinction between HOCl and RNHCl.
Probe	Reactive species detected	Intra or extracellular localization		Advantages	Limitations
Chemiluminescent:					
Lucigenin	$O_2^{\bullet-}$	Extracellular		Redox cycling of lucigenin is negligible, in particular, in cellular systems that produce significant amounts of $O_2^{\bullet-}$. High specificity.	
Luminol	$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} , HOCl, $\bullet NO$, $ONOO^-$	Intracellular, extracellular		Highly sensitive.	Luminol can act as a source of $O_2^{\bullet-}$.
Isoluminol	$O_2^{\bullet-}$	Extracellular		May be used as a complement of luminol.	Dependent on extracellular peroxidase.
MCLA	$O_2^{\bullet-}$, 1O_2	Extracellular		Selective detection of 1O_2 in the presence of SOD.	The reaction of MCLA is pH dependent. Auto oxidation. Artifactual formation of $O_2^{\bullet-}$.
L-012	$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HOCl, HO^{\bullet} , 1O_2	Intracellular, extracellular		May be used in neutrophils but also whole blood samples. The enhanced chemiluminescence of L-012 is about 10 and 100 times stronger than that of MCLA and luminol.	
Pholasin	$O_2^{\bullet-}$, 1O_2 , HO^{\bullet} , HOCl, $ONOO^-$	Extracellular		It is 50- to 100-fold more sensitive than luminol in detecting $O_2^{\bullet-}$.	Chemiluminescence provided by this probe is dependent on the overall concentrations of oxidants and pholasin, the nature of the oxidant, the buffer, the medium components, and the pH.
Probe	Reactive species detected	Intra or extracellular localization	$\lambda_{absorption}$ (nm)	Advantages	Limitations
Colorimetric:					
Cytochrome c	$O_2^{\bullet-}$	Extracellular	550	Easy to use.	H_2O_2 may interfere with the assay. Low sensitivity.
NBT	$O_2^{\bullet-}$	Intracellular	560		The water-insolubility of the formazan resultant from the reduction of NBT and MTT. Reduction of WST-1 is dependent of the use of an intermediate electron acceptor.
MTT		Intracellular/extracellular	560 and 630		Grossly underestimates the true chlorinating activity of MPO.
WST-1		Extracellular	450		May react with MPO and interfere with its chlorination activity.
MCD	HOCl	-	290		
TMB	HOCl	-	655	It is considered the least toxic and thus safest among the sensitive peroxidase substrates	
Taurine	HOCl	Extracellular	255	Measures specifically HOCl.	Does not interfere with MPO activity.
DPA	1O_2	Intracellular	355	Highly sensitive.	1O_2 detection may be underestimated.
MbO ₂ /HbO ₂	$\bullet NO$	Extracellular	401 and 411 or 581 and 592.	Reflects the absolute amount of $\bullet NO$.	$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , and $ONOO^-$ may interfere with the assay.

III Etat de l'art des outils tendant vers l'analyse de la cellule unique par des méthodes électrochimiques

Il est maintenant communément admis qu'une population cellulaire, de même type ou de même lignée, présente des caractéristiques hétérogènes [23], [24] et que c'est aussi le cas pour les organites présents au sein d'une seule et même cellule (cf mitochondrie Chap 1, IV.5). C'est avec l'objectif de déchiffrer cette hétérogénéité que le développement de méthodes permettant l'analyse à l'échelle de l'entité biologique unique est nécessaire. La figure suivante (Figure 9) permet d'illustrer ces propos : l'analyse d'une population cellulaire débouche sur une information moyennée. L'interprétation des résultats risque donc d'être erronée, d'un point de vue quantitatif (Figure 9A) et cinétique (Figure 9B), ou plus grave, d'un point de vue qualitatif.

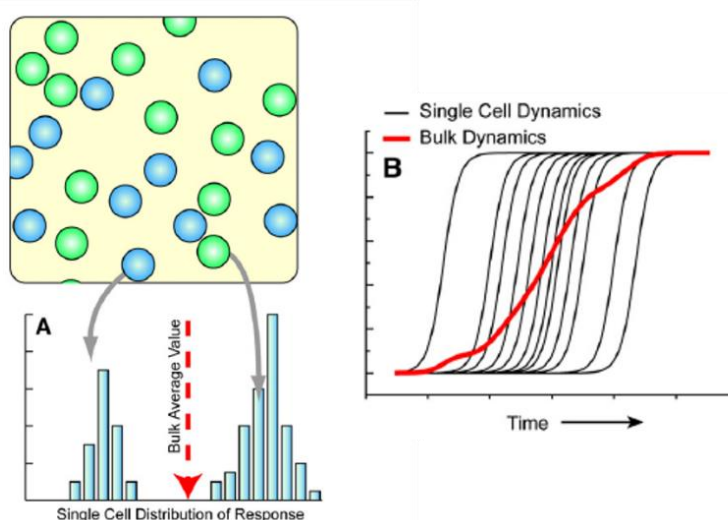


Figure 9 Justification de l'intérêt de l'analyse à l'échelle d'une cellule unique, d'après [23].

Nous nous intéressons dans la partie suivante, aux différentes stratégies mises en œuvre par les chercheurs en électrochimie et en microélectronique, dans le but d'analyser l'activité métabolique d'entités biologiques à l'échelle individuelle par des techniques électrochimiques, quel que soit le métabolite d'intérêt. Pour finir, un état de l'art succinct des stratégies implémentées pour la détection sélective des ROS est présenté.

III.1 Ultramicroélectrodes insérées dans un capillaire en verre

La première solution (appelée « artificial synapse »), consiste à venir approcher une ultramicroélectrode¹ (UME) à proximité de l'élément biologique d'intérêt à l'aide d'un micromanipulateur. Celle-ci est généralement construite à partir d'un fil sectionné, dont le diamètre est inférieur à la centaine de micromètres. Le fil est inséré dans un capillaire en verre afin de définir uniquement la section comme

¹ Le terme ultramicroélectrode désigne des électrodes dont le rayon équivalent de la surface utile est inférieur ou égal à 25 μm . La réduction des dimensions aboutit à des performances améliorées par rapport aux microélectrodes dont les dimensions sont ordinairement millimétriques. Ces notions seront explicitées en détails dans le chapitre 3.

surface active de l'électrode. L'équipe du Professeur Amatore a longtemps appliqué cette approche avec des électrodes en fibre de carbone platinisées [25]–[28].

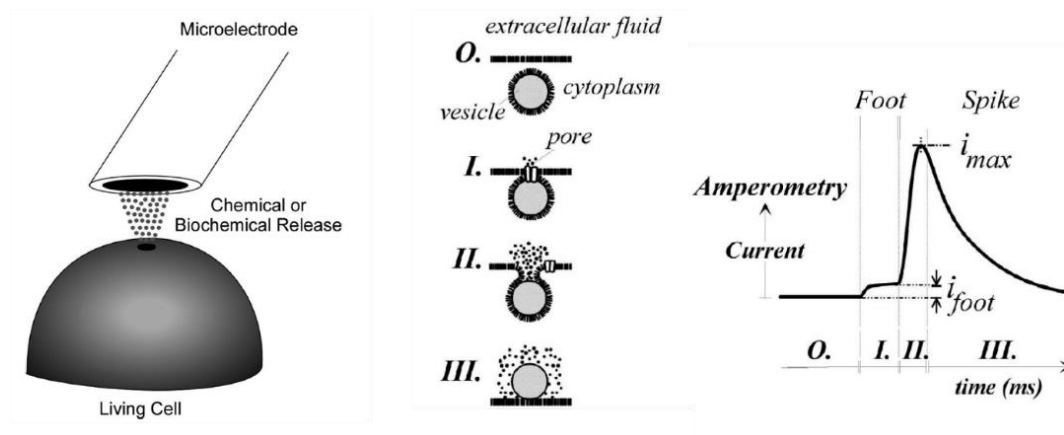


Figure 10 Principe de mesure par la méthode "artificial synapse", d'après [6].

Si le diamètre de l'électrode est suffisamment faible, alors il devient possible de l'insérer à l'intérieur de la cellule sans causer de dommages particuliers [29]–[31]. Une telle configuration permet de suivre en temps réel et de manière continue les changements de composition des milieux intra- et extra-cellulaires [31].

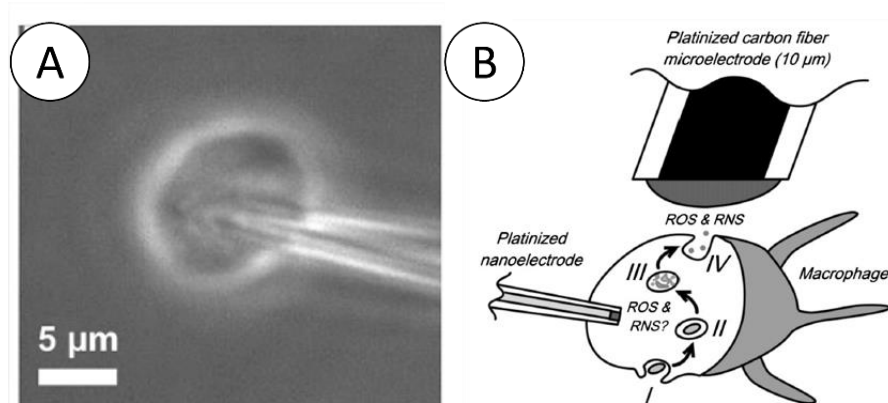


Figure 11 A : exemple d'électrode miniaturisée pour la détection de métabolites intracellulaire. B : détection électrochimique intra- et extra- cellulaire en simultané, d'après [31].

Il est aisé de constater que cette méthode, bien que performante, est difficilement applicable à l'analyse parallélisée d'une population cellulaire. Sachant qu'en conditions physiologiques on trouve environ 500 000 cellules par millilitre de sang, il est absolument nécessaire de mener des expériences sur un grand nombre de cellules pour obtenir des résultats significatifs biologiquement. Les techniques de miniaturisations développées depuis les années 1970, dans le cadre de la fabrication de composants de microélectronique, présentent le potentiel requis pour surmonter ces différentes limitations. Une cellule électrochimique (montage à deux ou trois électrodes) micro-fabriquée [32], rend envisageable la détection d'un ensemble de métabolites électroactifs, ceci à l'échelle d'un élément biologique unique et de manière parallélisée. La recherche s'est donc naturellement orientée dans cette voie, d'abord par la réalisation de structures planaires, puis s'orientant progressivement vers des structures tridimensionnelles.

III.2 Ultramicroélectrodes planaires

Les techniques de fabrications issues du monde de la microélectronique sont aujourd'hui matures. En effet, il est maintenant possible de travailler une large gamme de matériaux à l'échelle du micro- voire du nanomètre, avec une très grande reproductibilité. La fabrication en parallèle d'un grand nombre de composants à partir d'un seul et même substrat, ainsi que les dépôts de matériaux en couches minces, permettent de réduire considérablement les coûts par rapport aux précédentes méthodes de fabrication.

Travailler avec des éléments biologiques insinue l'usage de fluides. Le domaine de la microfluidique répond à ce besoin par la possibilité d'intégrer à des dimensions micrométriques des canaux, chambres, mélangeurs, pompes péristaltiques, valves, etc. La microfluidique est donc systématiquement utilisée afin de manipuler les éléments biologiques et donner forme à un microsystème complet, désigné dans la littérature par les termes « lab on a chip » (LOC) ou « total analysis system » (μ TAS). D'autres stratégies de manipulation d'éléments biologiques peuvent elles aussi être mises en œuvre en complément de la microfluidique [33] : les pièges mécaniques [34], la modification des propriétés de surfaces [35], les pinces-optiques [36], [37], l'application d'un champ électrique [38]–[40] ou magnétique [41], ou encore la microfluidique de goutte [42], [43]. Ces solutions ont permis de fabriquer de véritables micro-laboratoires portant l'analyse comportementale de cellules à l'échelle d'une faible population [44]–[52] ou à l'échelle d'une cellule unique [53], [54].

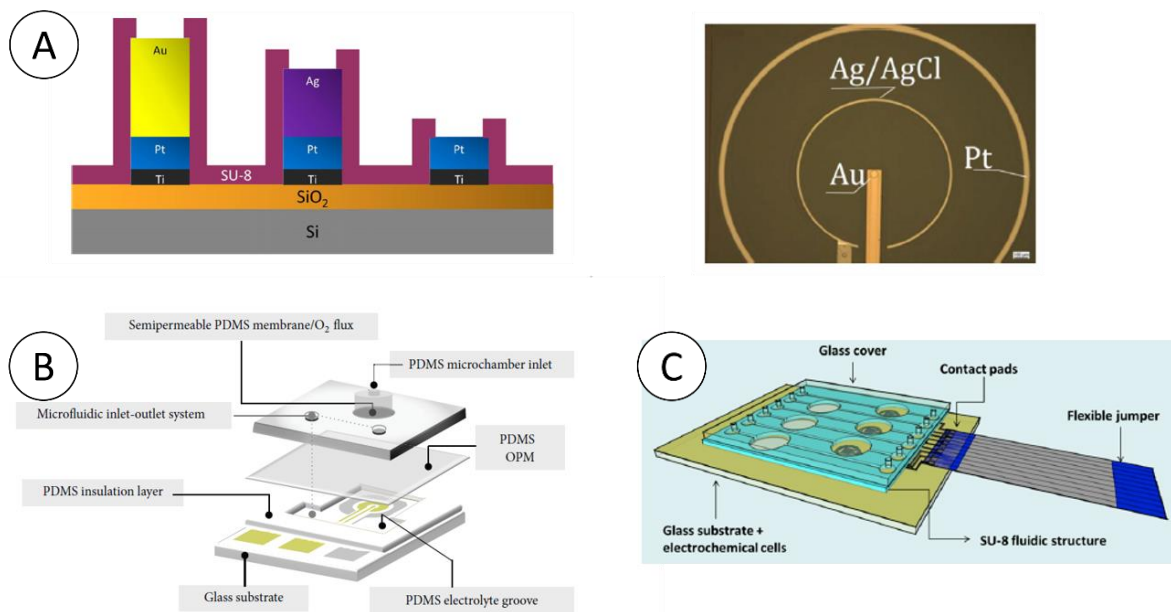


Figure 12 A : Exemple d'une micro-cellule électrochimique planaire à trois électrodes, d'après [32]. B : "micro-oxygraph", chambre d'oxygraphie miniaturisée, d'après [48]. C : Lab on Chip pour la détection de polluants dans les eaux de rivières par l'analyse de l'activité photosynthétique d'algues, d'après [47].

Travailler à l'échelle micrométrique permet de réduire considérablement le nombre de cellules soumises à l'analyse. Cependant, le nombre d'applications à l'échelle de la cellule unique reste limité. Etant donné que le principe de mesure repose sur la détection d'espèces dissoutes en solution, il est absolument nécessaire d'isoler spatialement les cellules. La microfluidique le permet, mais il paraît difficilement envisageable d'intégrer des cellules électrochimiques à l'intérieur de chambres microfluidiques dimensionnées selon la taille d'une cellule unique (environ 15 μ m de diamètre), ceci à grande échelle

pour que les résultats soient significatifs biologiquement parlant. Une autre solution consiste à former des microchambres au sein même de la cellule électrochimique, il s'agit des micropuits instrumentés. Cette configuration permet, en plus d'isoler spatialement les cellules les unes des autres, de confiner à l'intérieur des puits les espèces produites par l'élément biologique, entraînant la maximisation du taux de collecte, une notion qui sera introduite prochainement (Chapitre 3).

III.3 Micropuits instrumentés

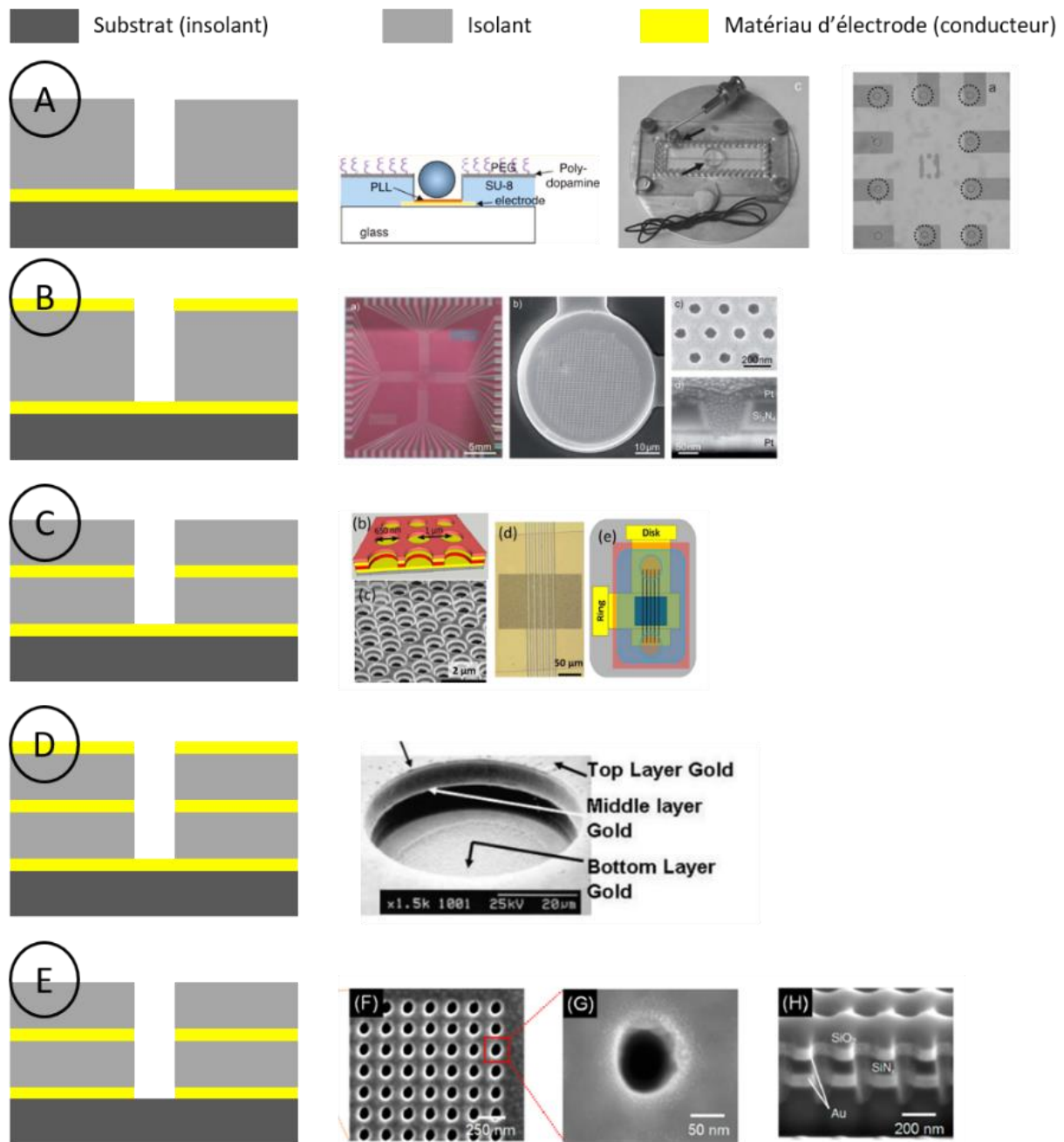


Figure 13 : A : micropuits avec disque intégré, d'après [62]. B : micropuits avec disque intégré et électrode surfacique, d'après [72]. (C) : micropuits avec disque et anneau intégrés, d'après [71]. D : micropuits avec disque et anneau intégrés, et électrode surfacique, d'après [58]. E : micropuits avec deux anneaux encastrés, d'après [74].

L'approche consiste cette fois à intégrer des électrodes à l'intérieur de puits formés dans divers matériaux électriquement isolants. La figure précédente (Figure 13) décrit les différentes configurations exposées dans la littérature. La plus simple (A), consiste à intégrer un disque au fond du puits, ce qui est presque toujours le cas. Des structures plus sophistiquées présentent une électrode surfacique (B), un anneau intégré (C), voire le tout à la fois (D). Enfin le dernier type de structure identifié présente deux anneaux intégrés par micropuits (E). Le tableau page suivante (Tableau 3) présente en détails les caractéristiques des structures identifiées dans la littérature et leurs applications.

Les micropuits instrumentés trouvent des applications diverses et variées, le nombre de puits, leur forme, leurs dimensions, et les matériaux utilisés, en sont directement fonction. Ces applications peuvent être divisées en trois catégories : les capteurs chimiques dédiés à l'analyse de la composition de liquides (biologiques ou non), les biocapteurs faisant intervenir des éléments biologiques dans le principe de détection [55], et enfin des outils dont le but est l'investigation des phénomènes électrochimiques à des dimensions de plus en plus réduites, c'est-à-dire nanométriques. Les puits instrumentés dont l'application vise l'analyse de la cellule unique sont généralement fabriqués à base de polymères, comme la SU-8 ou le polyimide, car ils permettent d'obtenir de grands rapports de forme. Les capteurs chimiques, dont les dimensions sont inférieures, sont quant à eux plus souvent fabriqués à base de nitrure ou dioxyde de silicium, matériaux isolants largement répandus dans le domaine de la microélectronique. Les électrodes sont généralement à base d'or (Au) ou de platine (Pt) en raison de leurs caractéristiques électrochimiques propres, alors que l'oxyde d'indium étain (ITO) est parfois utilisé car il présente l'avantage d'être un matériau transparent. L'usage de l'ITO est particulièrement adapté pour former des électrodes planaires (formant le fond du puits) sur substrat verre, car cela offre la possibilité de coupler des analyses électrochimiques à des analyses optiques. Enfin, le nombre de puits fabriqués peut être très variable. Ino et al. [56] détiennent le record de puits adressables individuellement : 1024. Un tel nombre permet d'obtenir des informations pertinentes statistiquement, tant d'un point de vue population cellulaire que d'un point de vue cellule unique.

Table 3 Etat de l'art des micropuits instrumentés

Référence	Forme			Nombre		Volume (pL)	Isolant			Substrat		Electrodes de travail (Ew)			E _c	E _{ref}	Fonctionnalisation**		Fluidique fermée	Application				
	cube	cône	cylindre	adressable	réseau		SiO ₂ /SiNx	SU8	Polyimide	Verre	SiO ₂	planaire	encastrée	surfactive			anti	pro		Capteur	Bio-capteur	Electrochimie		
Aguilar et al. [57] Aguilar [58]			x	4		15				x		Au	Au	Au				x				x		
Orozco et al. [59]			x	600*		0,012 et 0,047	x				x	Au			x			x					x	
Menshykau et al. [60]			x	130		0,126	x				x	Au		Au ⁴	x	x							x	
Chang et al. [61]			x	10		18		x			x	Pt							x			x		
Liu et al. [62] Kisler et al. [63] Gillis et al. [64]			x	40		5		x			x	ITO, Au						x		x			x	
Ino et al. [56] Ino et al. [65] Sen et al. [66]				1024		7						Pt ¹											x	
	x			256		25		x			x												x	
												Pt ²											x	
Zhu et al. [67] Oleinick et al. [68] Zhu et al. [69]			x	1024		0,05			x		x	Au		Au									x	
																							x	
																							x	
Ma et al. [70] Ma et al. [71]			x	2000		9,00E-07		x			x	Au		Au									x	
				2500		3,00E-04													x			x		
Hüske et al. [72]			x	209200*		5,00E-07	x				x	Pt		Pt										x
Wang et al. [73]			x	36*		64		x			x	Pt ³											x	
Han et al. [74]			x	1600*		3,00E-06	x				x			Au (x2)										x

* : nombre maximal parmi les configurations présentées

** : modification des propriétés de surface des matériaux en vue de l'immobilisation d'éléments biologiques (pro) ou comme couche anti-biofouling (anti)

1 : électrodes interdigitées 2 : anneau et disque plans 3 : plusieurs disques adressés au sein d'un même micropuits

III.4 Ultramicroélectrodes appliquées à la mesure d'espèces réactives oxygénées

Compte tenu de son caractère hautement réactif et de sa très faible durée de vie, le radical hydroxyle n'a jamais été détecté par voie électrochimique (la distance à parcourir depuis son site de production jusqu'à la surface de l'électrode étant systématiquement trop importante). En revanche, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont eux détectables.

Détection de l'anion superoxyde

Il est possible de détecter directement l'anion superoxyde à la surface d'une électrode de carbone [75]. Cependant, pour améliorer les performances du capteur en terme de sensibilité et de sélectivité, différentes stratégies sont mises en œuvre [76]. Elles consistent le plus souvent à immobiliser des éléments biologiques à la surface de l'électrode de mesure : la protéine ferricytochrome c (ou Fe(III)-cyt c), ou l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). Ces éléments peuvent être immobilisés dans un gel déposé à la surface de l'électrode ou dans une matrice polymère, par électropolymérisation de polymères conducteurs. Dans le premier cas de figure, O_2^- réduit le Fe(III)-cyt c en Fe(II)-cyt c, qui est directement reconvertit en Fe(III)-cyt c par oxydation à la surface de l'électrode (Figure 14A). Si la SOD est immobilisée, alors elle va convertir O_2^- en H_2O_2 , qui sera ensuite oxydé à la surface de l'électrode (figure 14B).

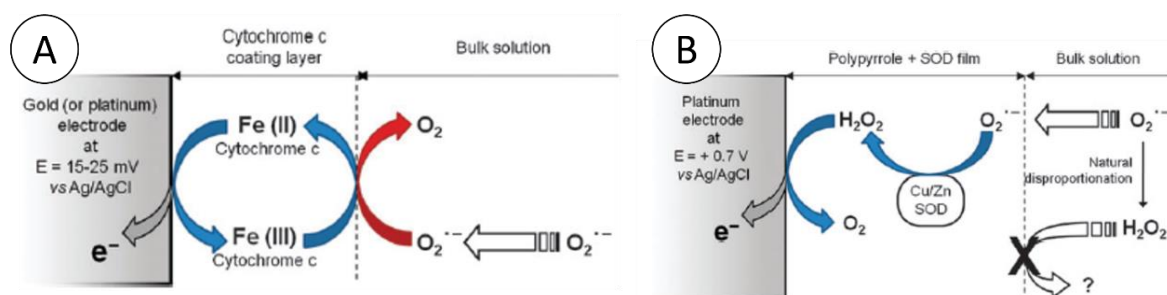


Figure 14 Deux exemples de biocapteurs pour la détection de l'anion superoxyde, d'après [76]. A : immobilisation du cytochrome c à la surface de l'électrode. B : immobilisation de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) à la surface de l'électrode.

Dans les deux cas, ces techniques ne permettent pas d'assurer une parfaite sélectivité envers l'anion superoxyde. D'une part, le ferricytochrome c peut être réduit par d'autres espèces qu' O_2^- en milieux biologiques. D'autre part, la SOD, bien que spécifique, produit du peroxyde d'hydrogène. Il devient alors impossible de discriminer l' H_2O_2 provenant de la réaction enzymatique, de celui issu de la dismutation, ou issu de toute autre source. Pour s'affranchir de ces limitations, certains choisissent de placer une membrane en Téflon sur la couche enzymatique, car celle-ci est considérée imperméable à H_2O_2 , contrairement à O_2^- . D'autres choisissent d'utiliser un système à deux électrodes de mesure. L'une est couverte d'un film contenant la SOD, elle est donc sensible à O_2^- et H_2O_2 . Tandis que l'autre est couverte d'un film ne contenant pas la SOD, elle est donc uniquement sensible à H_2O_2 . De cette manière, il est possible d'effectuer une mesure différentielle spécifique de l'anion superoxyde [77]. Enfin, même dans le cas où la détection serait parfaitement sélective, on ne peut pas assurer son caractère quantitatif puisque, compte tenu des cinétiques de dismutation et de diffusion, seule une partie du superoxyde produit atteint la surface de l'électrode. La mesure d' O_2^- se trouve ainsi systématiquement sous-estimée. Finalement, sachant que le peroxyde d'hydrogène est un produit de la dismutation (Eq. 5), et qu'il est le

ROS le plus stable en solution, il constitue le biomarqueur le plus révélateur de la production globale d'espèces réactives oxygénées.

Détection du peroxyde d'hydrogène

H₂O₂ peut réagir électrochimiquement sur des matériaux d'électrodes bruts tels que le carbone ou le platine. Toutefois, le transfert électronique de la réaction est lent ce qui induit l'application d'un fort surtension et une perte de sélectivité. Des modifications des matériaux d'électrodes sont alors effectuées afin de favoriser l'électrocatalyse du peroxyde d'hydrogène [78]. Pour accélérer le transfert électronique, des enzymes comme les peroxydases ou la catalase peuvent être immobilisées à la surface de l'électrode. Il est aussi possible d'immobiliser des nanoparticules, comme des nanotubes de carbone, ou des nanoparticules métalliques. Les nanoparticules, simplement de par leurs dimensions, exacerbent les propriétés électrocatalytiques intrinsèques des différents matériaux. L'électrodépôt de noir de platine constitue l'une des méthodes de modifications de surfaces des plus répandues dans le cadre de la mesure de la production d'H₂O₂ en milieux biologiques [79]–[81].

Conclusion

Il existe des méthodes diverses et variées pour analyser la fonction mitochondriale, mais deux d'entre-elles sortent du lot. La mesure de la consommation d'oxygène est dominée par l'approche électrochimique depuis l'invention de l'électrode de Clark, alors que l'évaluation de la production d'espèces réactives oxygénées repose principalement sur des techniques optiques. Ces dernières, utilisées conjointement avec la cytométrie en flux ou la microscopie, délivrent des informations à l'échelle de la cellule unique, alors que la mesure de la consommation d'oxygène à l'échelle de la cellule unique n'est pas encore accessible en routine dans les laboratoires de biologie. Le tableau 5 compile les principaux avantages et inconvénients des deux approches.

Table 4 Avantages et inconvénients des méthodes optiques et électrochimiques dans le cadre de l'étude de la fonction mitochondriale.

Méthodes optiques	Méthodes électrochimiques
+ localisation intra- ou extra- cellulaire	+ données quantitatives
+ analyse à l'échelle de la cellule unique	+ données cinétiques
+ sensibilité	+ sélectivité
+ variété des sondes disponibles et des espèces détectées	- nombre d'espèces détectables limité
- potentiel d'application in vivo (injection de la sonde)	- difficilement applicable à l'analyse de la cellule unique
- données quantitatives	- mesure intensive
- sélectivité	

Les inconvénients majeurs des méthodes optiques sont le manque de sélectivité et l'impossibilité d'obtenir des données quantitatives fiables. L'électrochimie répond à ces besoins mais la variété d'espèces détectables est limitée. La solution idéale consisterait donc à coupler les deux techniques pour

tirer le meilleur de chacune d'entre elles. Les structures de capteurs électrochimiques présentant le plus fort potentiel pour l'analyse d'un élément biologique à l'échelle unique sont actuellement les micropuits instrumentés. Ces structures sont d'ailleurs aussi très bien adaptées à des analyses optiques [82]–[84], puisqu'elles permettent de localiser les éléments biologiques à des endroits précis, limitant ainsi le bruit de fond, et offrant la possibilité d'automatiser l'analyse par des algorithmes informatiques rudimentaires. L'équipe de Gillis [62]–[64] est la seule identifiée dans la littérature à avoir déjà utilisé des micropuits instrumentés pour des mesures couplées électrochimie/optique sur cellules uniques via l'usage d'une électrode transparente (ITO ou couche nanométrique d'or) formant le fond du puits. Leur dispositif est appliqué à l'étude de la libération par exocytose de neurotransmetteurs produits par des cellules de type chromaffine. Notre objectif est de développer une technologie similaire pour l'analyse de mitochondries isolées à partir de cellules leucémiques. Travailler avec des mitochondries isolées implique la perte des interactions avec les autres composants intracellulaires, mais offre un contrôle total à l'expérimentateur, étant donné l'absence de la membrane plasmique cellulaire [85]. La consommation d'oxygène sera déterminée par voie électrochimique, ainsi que la production de peroxyde d'hydrogène, tandis que l'optique (microscopie de fluorescence) permettra soit d'évaluer la concentration des ROS totaux, soit d'évaluer d'autres paramètres mitochondriaux comme le potentiel membranaire, ou la concentration en ion calcium.

Le chapitre suivant décrit l'étape de conception par la simulation multiphysique, de ce futur microdispositif innovant, dédié à l'analyse *in vitro* du statut métabolique de mitochondries isolées. La théorie de l'électrochimie et des ultramicroélectrodes y est aussi présentée.

Bibliographie

- [1] L. C. Clark, R. Wolf, D. Granger, and Z. Taylor, "Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography," *J. Appl. Physiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 189–193, 1953.
- [2] J.-M. Noël, A. Latus, C. Lagrost, E. Volanschi, and P. Hapiot, "Evidence for OH Radical Production during Electrocatalysis of Oxygen Reduction on Pt Surfaces: Consequences and Application," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 5, pp. 2835–2841, Feb. 2012.
- [3] J. Kanwisher, "Polarographic oxygen electrode," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 4, no. 2, pp. 210–217, 1959.
- [4] M. Makrecka-Kuka, G. Krumschnabel, and E. Gnaiger, "High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria," *Biomolecules*, vol. 5, no. 3, pp. 1319–1338, Jun. 2015.
- [5] J. Zhang *et al.*, "Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells," *Nat. Protoc.*, vol. 7, no. 6, pp. 1068–1085, May 2012.
- [6] C. Amatore, S. Arbault, M. Guille, and F. Lemaître, "Electrochemical Monitoring of Single Cell Secretion: Vesicular Exocytosis and Oxidative Stress," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 7, pp. 2585–2621, Jul. 2008.
- [7] E. J. Land and M. Ebert, "Pulse radiolysis studies of aqueous phenol. Water elimination from dihydroxycyclohexadienyl radicals to form phenoxy," *Trans. Faraday Soc.*, vol. 63, pp. 1181–1190, 1967.
- [8] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, and A. B. Ross, "Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}$ in aqueous solution)," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 17, no. 2, pp. 513–886, 1988.
- [9] D. Kozyrev and V. Slutsky, Eds., *Handbook of free radicals: formation, types and effects*. New York: Nova Science Publishers, 2010.
- [10] M. Kohno, "Applications of Electron Spin Resonance Spectrometry for Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species Research," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [11] C. C. Winterbourn, "The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 2, pp. 730–738, Feb. 2014.
- [12] P. Wardman, "Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 7, pp. 995–1022, Oct. 2007.
- [13] B. C. Dickinson, D. Srikun, and C. J. Chang, "Mitochondrial-targeted fluorescent probes for reactive oxygen species," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 50–56, Feb. 2010.

- [14] A. Logan *et al.*, “Using exomarkers to assess mitochondrial reactive species in vivo,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 2, pp. 923–930, Feb. 2014.
- [15] H. Maeda *et al.*, “A Design of Fluorescent Probes for Superoxide Based on a Nonredox Mechanism,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 1, pp. 68–69, Jan. 2005.
- [16] G. Bartosz, “Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 368, no. 1–2, pp. 53–76, Jun. 2006.
- [17] M. Freitas, J. L. F. C. Lima, and E. Fernandes, “Optical probes for detection and quantification of neutrophils? oxidative burst. A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 649, no. 1, pp. 8–23, Sep. 2009.
- [18] C. Cottet-Rousselle, X. Ronot, X. Leverve, and J.-F. Mayol, “Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes,” *Cytometry A*, vol. 79A, no. 6, pp. 405–425, Jun. 2011.
- [19] A. Cossarizza, D. Ceccarelli, and A. Masini, “Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level,” *Exp. Cell Res.*, vol. 222, no. 1, pp. 84–94, 1996.
- [20] K. L. Adams, M. Puchades, and A. G. Ewing, “In Vitro Electrochemistry of Biological Systems,” *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 329–355, Jul. 2008.
- [21] N. V. Kulagina and A. C. Michael, “Monitoring Hydrogen Peroxide in the Extracellular Space of the Brain with Amperometric Microsensors,” *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 18, pp. 4875–4881, Sep. 2003.
- [22] A. C. d’Audiffret, S. J. Frisbee, P. A. Stapleton, A. G. Goodwill, E. Isingrini, and J. C. Frisbee, “Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease?,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 108, no. 5, pp. 1041–1051, May 2010.
- [23] D. Di Carlo and L. P. Lee, “Dynamic single-cell analysis for quantitative biology,” *Anal. Chem.*, 2006.
- [24] F. S. O. Fritzsche, C. Dusny, O. Frick, and A. Schmid, “Single-Cell Analysis in Biotechnology, Systems Biology, and Biocatalysis,” *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 3, no. 1, pp. 129–155, Jul. 2012.
- [25] C. Amatore, S. Arbault, D. Bruce, P. de Oliveira, M. Erard, and M. Vuillaume, “Analysis of individual biochemical events based on artificial synapses using ultramicroelectrodes: cellular oxidative burst,” *Faraday Discuss.*, vol. 116, pp. 319–333, 2000.
- [26] S. Arbault, P. Pantano, J. A. Jankowski, M. Vuillaume, and C. Amatore, “Monitoring an oxidative stress mechanism at a single human fibroblast,” *Anal. Chem.*, vol. 67, no. 19, pp. 3382–3390, 1995.
- [27] C. Amatore *et al.*, “Monitoring in Real Time with a Microelectrode the Release of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by a Single Macrophage Stimulated by its Membrane Mechanical Depolarization,” *ChemBioChem*, vol. 7, no. 4, pp. 653–661, Apr. 2006.

- [28] C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, J.-C. Drapier, H. Ghandour, and A. C. W. Koh, "Real-Time Amperometric Analysis of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Released by Single Immunostimulated Macrophages," *ChemBioChem*, vol. 9, no. 9, pp. 1472–1480, Jun. 2008.
- [29] T. Malinski, S. Grunfeld, Z. Taha, and P. Tomboulian, "Monitoring metal concentrations in tissues and single cells using ultramicrosensors," *Environ. Health Perspect.*, vol. 102, no. Suppl 3, p. 147, 1994.
- [30] S. Bai, T. Fabian, F. Prinz, and R. Fasching, "Nanoscale probe system for cell-organelle analysis," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 130, no. 1, pp. 249–257, Mar. 2008.
- [31] Y. Wang *et al.*, "Nanoelectrodes for determination of reactive oxygen and nitrogen species inside murine macrophages," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 29, pp. 11534–11539, 2012.
- [32] C. Christophe, F. Sékli Belaidi, J. Launay, P. Gros, E. Questel, and P. Temple-Boyer, "Elaboration of integrated microelectrodes for the detection of antioxidant species," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 177, pp. 350–356, Feb. 2013.
- [33] J. Nilsson, M. Evander, B. Hammarström, and T. Laurell, "Review of cell and particle trapping in microfluidic systems," *Anal. Chim. Acta*, vol. 649, no. 2, pp. 141–157, Sep. 2009.
- [34] D. Di Carlo, N. Aghdam, and L. P. Lee, "Single-Cell Enzyme Concentrations, Kinetics, and Inhibition Analysis Using High-Density Hydrodynamic Cell Isolation Arrays," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 14, pp. 4925–4930, Jul. 2006.
- [35] J. Fink *et al.*, "Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques," *Lab Chip*, vol. 7, no. 6, pp. 672–680, 2007.
- [36] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith, and C. Bustamante, "Recent Advances in Optical Tweezers," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 205–228, Jun. 2008.
- [37] T. Kuroiwa *et al.*, "Optical isolation of individual mitochondria of *Physarum polycephalum* for PCR analysis," *Protoplasma*, vol. 194, no. 3, pp. 275–279, 1996.
- [38] K. Khoshmanesh, S. Nahavandi, S. Baratchi, A. Mitchell, and K. Kalantar-zadeh, "Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 5, pp. 1800–1814, Jan. 2011.
- [39] T. Murata, T. Yasukawa, H. Shiku, and T. Matsue, "Electrochemical single-cell gene-expression assay combining dielectrophoretic manipulation with secreted alkaline phosphatase reporter system," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 4, pp. 913–919, Dec. 2009.
- [40] N. Mittal, A. Rosenthal, and J. Voldman, "nDEP microwells for single-cell patterning in physiological media," *Lab. Chip*, vol. 7, no. 9, p. 1146, 2007.
- [41] O. Osman *et al.*, "Microfluidic immunomagnetic cell separation using integrated permanent micromagnets," *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 5, p. 054115, 2013.
- [42] A. E. Sgro, P. B. Allen, and D. T. Chiu, "Thermoelectric Manipulation of Aqueous Droplets in Microfluidic Devices," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 13, pp. 4845–4851, Jul. 2007.

- [43] W. Shi, J. Qin, N. Ye, and B. Lin, "Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assay," *Lab. Chip*, vol. 8, no. 9, p. 1432, 2008.
- [44] L.-M. Li *et al.*, "Integrated Microdevice for Long-Term Automated Perfusion Culture without Shear Stress and Real-Time Electrochemical Monitoring of Cells," *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 24, pp. 9524–9530, Dec. 2011.
- [45] A. Weltin *et al.*, "Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem," *Lab Chip*, vol. 14, no. 1, pp. 138–146, 2014.
- [46] M. Brischwein, E. R. Motrescu, E. Cabala, A. M. Otto, H. Grothe, and B. Wolf, "Functional cellular assays with multiparametric silicon sensor chips," *Lab. Chip*, vol. 3, no. 4, p. 234, 2003.
- [47] A. Tsopela *et al.*, "Light emitting devices and integrated electrochemical sensors on lab-on-chip for toxicity bioassays based on algal physiology," in *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS), 2015 Transducers-2015 18th International Conference on*, 2015, pp. 1621–1624.
- [48] A. Aloisi, E. Tarentini, A. Ferramosca, V. Zara, and R. Rinaldi, "Microoxygraph Device for Biosensoristic Applications," *J. Sens.*, vol. 2016, pp. 1–9, 2016.
- [49] P. M. Misun, J. Rothe, Y. R. F. Schmid, A. Hierlemann, and O. Frey, "Multi-analyte biosensor interface for real-time monitoring of 3D microtissue spheroids in hanging-drop networks," *Microsyst. Nanoeng.*, vol. 2, p. 16022, Jun. 2016.
- [50] Y. Li *et al.*, "Multi-chambers Microsystem for Simultaneous and Direct Electrochemical Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Released by Cell Populations," *Electroanalysis*, vol. 28, no. 8, pp. 1865–1872, Aug. 2016.
- [51] J. R. McKenzie, A. C. Cognata, A. N. Davis, J. P. Wikswo, and D. E. Cliffler, "Real-Time Monitoring of Cellular Bioenergetics with a Multianalyte Screen-Printed Electrode," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 15, pp. 7857–7864, Aug. 2015.
- [52] S.-C. Chang, N. Pereira-Rodrigues, J. R. Henderson, A. Cole, F. Bedioui, and C. J. McNeil, "An electrochemical sensor array system for the direct, simultaneous in vitro monitoring of nitric oxide and superoxide production by cultured cells," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 6, pp. 917–922, Dec. 2005.
- [53] C.-C. Wu *et al.*, "Microfluidic chip integrated with amperometric detector array for in situ estimating oxygen consumption characteristics of single bovine embryos," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 125, no. 2, pp. 680–687, Aug. 2007.
- [54] F. Xia, W. Jin, X. Yin, and Z. Fang, "Single-cell analysis by electrochemical detection with a microfluidic device," *J. Chromatogr. A*, vol. 1063, no. 1–2, pp. 227–233, Jan. 2005.
- [55] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 1, pp. 121–131, 2001.

- [56] K. Ino, W. Saito, M. Koide, T. Umemura, H. Shiku, and T. Matsue, “Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 3, pp. 385–388, 2011.
- [57] Z. P. Aguilar, W. R. Vandaveer, and I. Fritsch, “Self-Contained Microelectrochemical Immunoassay for Small Volumes Using Mouse IgG as a Model System,” *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 14, pp. 3321–3329, Jul. 2002.
- [58] Z. P. Aguilar, “Small-Volume Detection of *Plasmodium falciparum* CSP Gene Using a 50- μ m-Diameter Cavity with Self-Contained Electrochemistry,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 4, pp. 1122–1129, Feb. 2006.
- [59] J. Orozco, G. Suárez, C. Fernández-Sánchez, C. McNeil, and C. Jiménez-Jorquera, “Characterization of ultramicroelectrode arrays combining electrochemical techniques and optical microscopy imaging,” *Electrochimica Acta*, vol. 53, no. 2, pp. 729–736, Dec. 2007.
- [60] D. Menshkykau, A. M. O’Mahony, F. J. del Campo, F. X. Munõz, and R. G. Compton, “Microarrays of Ring-Recessed Disk Electrodes in Transient Generator-Collector Mode: Theory and Experiment,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 22, pp. 9372–9382, Nov. 2009.
- [61] C.-Y. Chang, Y. Takahashi, T. Murata, H. Shiku, H.-C. Chang, and T. Matsue, “Entrapment and measurement of a biologically functionalized microbead with a microwell electrode,” *Lab. Chip*, vol. 9, no. 9, p. 1185, 2009.
- [62] X. Liu, S. Barizuddin, W. Shin, C. J. Mathai, S. Gangopadhyay, and K. D. Gillis, “Microwell Device for Targeting Single Cells to Electrochemical Microelectrodes for High-Throughput Amperometric Detection of Quantal Exocytosis,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 7, pp. 2445–2451, Apr. 2011.
- [63] K. Kisler *et al.*, “Transparent electrode materials for simultaneous amperometric detection of exocytosis and fluorescence microscopy,” *J. Biomater. Nanobiotechnology*, vol. 3, no. 2A, p. 243, 2012.
- [64] K. D. Gillis, X. A. Liu, A. Marcantoni, and V. Carabelli, “Electrochemical measurement of quantal exocytosis using microchips,” *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, Sep. 2017.
- [65] K. Ino *et al.*, “Local Redox-Cycling-Based Electrochemical Chip Device with Deep Microwells for Evaluation of Embryoid Bodies,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 51, no. 27, pp. 6648–6652, Jul. 2012.
- [66] M. Şen, K. Ino, H. Shiku, and T. Matsue, “Accumulation and detection of secreted proteins from single cells for reporter gene assays using a local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device,” *Lab. Chip*, vol. 12, no. 21, p. 4328, 2012.
- [67] F. Zhu, J. Yan, M. Lu, Y. Zhou, Y. Yang, and B. Mao, “A strategy for selective detection based on interferent depleting and redox cycling using the plane-recessed microdisk array electrodes,” *Electrochimica Acta*, vol. 56, no. 24, pp. 8101–8107, Oct. 2011.

- [68] A. Oleinick, F. Zhu, J. Yan, B. Mao, I. Svir, and C. Amatore, "Theoretical Investigation of Generator-Collector Microwell Arrays for Improving Electroanalytical Selectivity: Application to Selective Dopamine Detection in the Presence of Ascorbic Acid," *ChemPhysChem*, vol. 14, no. 9, pp. 1887–1898, Jun. 2013.
- [69] F. Zhu *et al.*, "Strategy for Increasing the Electrode Density of Microelectrode Arrays by Utilizing Bipolar Behavior of a Metallic Film," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 6, pp. 3138–3145, Mar. 2014.
- [70] C. Ma, N. M. Contento, L. R. Gibson, and P. W. Bohn, "Redox Cycling in Nanoscale-Recessed Ring-Disk Electrode Arrays for Enhanced Electrochemical Sensitivity," *ACS Nano*, vol. 7, no. 6, pp. 5483–5490, Jun. 2013.
- [71] C. Ma, N. M. Contento, L. R. Gibson, and P. W. Bohn, "Recessed Ring-Disk Nanoelectrode Arrays Integrated in Nanofluidic Structures for Selective Electrochemical Detection," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 20, pp. 9882–9888, Oct. 2013.
- [72] M. Hüske, R. Stockmann, A. Offenhäusser, and B. Wolfum, "Redox cycling in nanoporous electrochemical devices," *Nanoscale*, vol. 6, no. 1, pp. 589–598, 2014.
- [73] J. Wang, R. Trouillon, J. Dunevall, and A. G. Ewing, "Spatial Resolution of Single-Cell Exocytosis by Microwell-Based Individually Addressable Thin Film Ultramicroelectrode Arrays," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 9, pp. 4515–4520, May 2014.
- [74] D. Han, L. P. Zaino, K. Fu, and P. W. Bohn, "Redox Cycling in Nanopore-Confined Recessed Dual-Ring Electrode Arrays," *J. Phys. Chem. C*, vol. 120, no. 37, pp. 20634–20641, Sep. 2016.
- [75] C. Privat, S. Trevin, F. Bedioui, and J. Devynck, "Direct electrochemical characterization of superoxide anion production and its reactivity toward nitric oxide in solution," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 436, no. 1–2, pp. 261–265, 1997.
- [76] F. Bedioui, D. Quinton, S. Griveau, and T. Nyokong, "Designing molecular materials and strategies for the electrochemical detection of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in biological systems," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, no. 34, p. 9976, 2010.
- [77] J. M. Cooper, K. R. Greenough, and C. J. McNeil, "Direct electron transfer reactions between immobilized cytochrome c and modified gold electrodes," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 347, pp. 267–275, 1993.
- [78] W. Chen, S. Cai, Q.-Q. Ren, W. Wen, and Y.-D. Zhao, "Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review," *The Analyst*, vol. 137, no. 1, pp. 49–58, 2012.
- [79] L. Qiang, S. Vaddiraju, J. F. Rusling, and F. Papadimitrakopoulos, "Highly sensitive and reusable Pt-black microfluidic electrodes for long-term electrochemical sensing," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 2, pp. 682–688, Oct. 2010.
- [80] E. Atci, J. T. Babauta, and H. Beyenal, "A hydrogen peroxide microelectrode to use in bioelectrochemical systems," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 226, pp. 429–435, Apr. 2016.

- [81] V. Badets, J. Pandard, N. Sojic, and S. Arbault, “Deciphering the Platinized Surface Reactivity to Improve the Detection of Hydrogen Peroxide in Bioanalyses,” *ChemElectroChem*, vol. 3, no. 12, pp. 2288–2296, Dec. 2016.
- [82] S. Lindström and H. Andersson-Svahn, “Miniaturization of biological assays — Overview on microwell devices for single-cell analyses,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1810, no. 3, pp. 308–316, Mar. 2011.
- [83] V. S. Vajjala *et al.*, “Optical microwell array for large scale studies of single mitochondria metabolic responses,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 4, pp. 931–941, Feb. 2014.
- [84] S. Kumar, G. G. Wolken, N. J. Wittenberg, E. A. Arriaga, and S.-H. Oh, “Nanohole Array-Directed Trapping of Mammalian Mitochondria Enabling Single Organelle Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 24, pp. 11973–11977, Dec. 2015.
- [85] M. D. Brand and D. G. Nicholls, “Assessing mitochondrial dysfunction in cells,” *Biochem. J.*, vol. 435, no. 2, pp. 297–312, Apr. 2011.

Chapitre 3

Conception du Microdispositif d'Analyse Électrochimique

Introduction

Comme son nom l'indique, l'électrochimie est une science [1], [2] se plaçant à l'interface entre la chimie et l'électronique. Elle représente un domaine d'application extrêmement vaste qu'il est possible de résumer comme tel : la production d'énergie électrique à partir de réactions chimiques spontanées, ou à l'inverse la génération de réactions chimiques par l'apport d'énergie électrique. La première propriété permet le stockage et la conversion de l'énergie (piles, accumulateurs, hypercondensateurs), alors que la seconde constitue d'une part une méthode de modification ou de synthèse de matériaux (électrosynthèse, électroaffinage, traitement de surfaces), et d'autre part un outil analytique permettant de détecter la présence d'espèces électroactives (oxydantes ou réductrices) dissoutes en solution. C'est sur l'aspect outil analytique, autrement dit capteur électrochimique, que nous nous focalisons dans cette partie. La théorie associée y est présentée, tout comme les avantages liés à la réduction des dimensions des électrodes.

La théorie est ensuite appliquée dans le cadre d'une simulation ayant deux objectifs. Le premier consiste, en prenant en compte les limitations d'ordre technologique, à définir les paramètres géométriques optimaux du micropuits instrumenté, en vue de maximiser son aptitude à détecter les espèces émises. Le second consiste, une fois l'ensemble des paramètres géométriques fixés, à évaluer les performances électrochimiques d'un puit unique, mais aussi d'un réseau de micropuits instrumentés. La simulation de voltamétries cycliques en particulier, permet d'obtenir des informations intéressantes sur les différents régimes de diffusion.

I Les principes de l'électrochimie

I.1 La réaction électrochimique

Les notions d'oxydant et de réducteur prennent leur sens lorsqu'une réaction chimique implique des échanges électroniques. Par définition, on appelle oxydant (O) l'espèce acceptant le ou les électrons, et réducteur (R) l'espèce donneuse. En conséquence, le terme oxydation désigne la perte d'électrons subie par le réducteur alors que le terme réduction désigne quant à lui un gain d'électrons subi par l'oxydant. Ces réactions ne sont pas toujours réversibles.



O : oxydant

R : réducteur

v_O et v_R : coefficients stœchiométriques

e^- : symbole de l'électron

n : nombre entier positif

O et R (Equation 1) forment un couple oxydant/réducteur. Les électrons n'étant pas libres en solution, la réaction les impliquant est possible dans deux configurations :

- l'électron est capté ou fourni par un métal, ou tout autre conducteur électronique plongé en solution ;
- un autre couple oxydant/réducteur (O'/R') réalise un échange analogue en sens inverse.

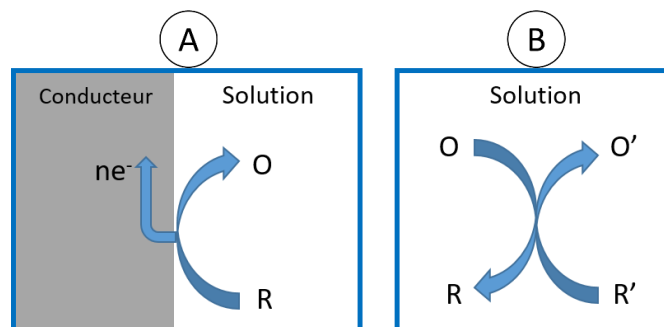


Figure 1 A : réaction électrochimique à l'interface électrode|solution. B : réaction chimique impliquant deux couples oxydant/réducteur.

Le premier cas (Figure 1A) désigne une réaction électrochimique (ici une oxydation) se produisant à l'interface conducteur|solution, alors que le second (Figure 1B) désigne une réaction chimique d'oxydoréduction se produisant en solution. Intéressons-nous désormais aux aspects théoriques permettant de contrôler les réactions électrochimiques.

I.2 Notions d'électrode et de potentiel d'électrode

L'électrode est un conducteur électronique au contact d'un conducteur ionique, appelé électrolyte. Si le conducteur est un métal (argent, platine, or...), alors tous ses électrons transférables possèdent le même niveau d'énergie : le niveau de Fermi (E_F), fixé selon la loi statistique de Fermi-Dirac. Le niveau de Fermi est, par définition, le niveau d'énergie correspondant à la probabilité $\frac{1}{2}$ d'y trouver un électron. Par analogie, on peut également définir une énergie de Fermi (E_F^{redox}) pour les électrons présents en solution. La condition d'équilibre de l'interface électrode|électrolyte correspond à l'égalité des énergies de Fermi de part et d'autre de l'interface, tel que :

$$E_F \equiv E_F^{redox} \quad (\text{Equation 2})$$

Le potentiel d'équilibre (E_{eq}) est le potentiel auquel doit se placer l'électrode pour permettre l'égalité des niveaux de Fermi (Figure 2B). Si l'on est en mesure de modifier le potentiel d'électrode, alors on peut rompre cette égalité (Equation 2). E_F étant fixé par le potentiel appliqué, ce sont les espèces électroactives présentes en solution qui vont tenter de rétablir l'égalité des niveaux de Fermi en réagissant à la surface de l'électrode. Ainsi, le potentiel d'électrode constitue le paramètre de contrôle du sens de l'évolution de la réaction électrochimique. À partir de la situation d'équilibre, il est possible de :

- provoquer la transformation de R en O en augmentant le potentiel de l'électrode (Figure 2A) ;
- provoquer la transformation de O en R en diminuant le potentiel de l'électrode (Figure 2C).

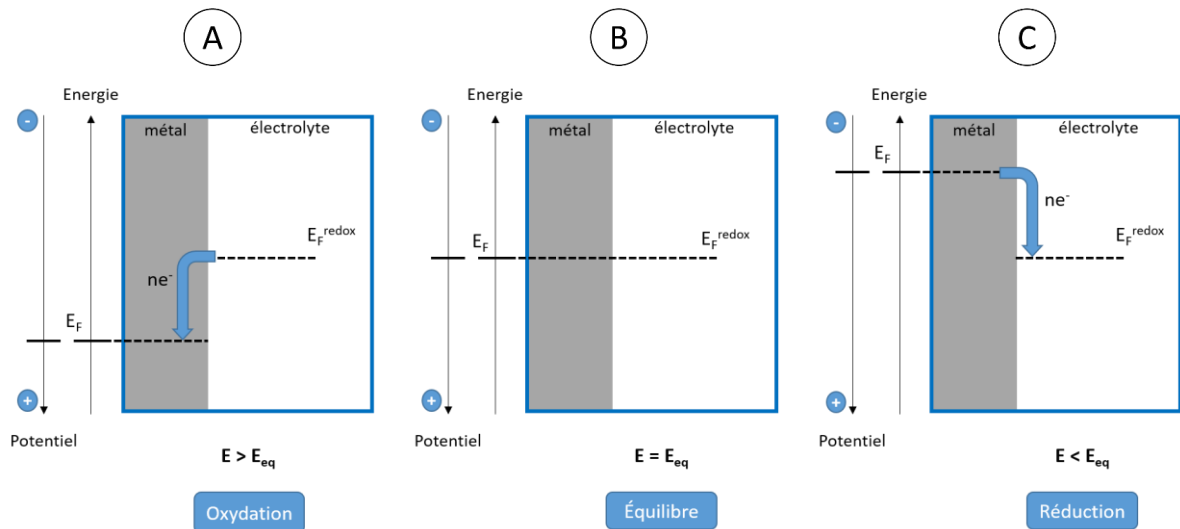


Figure 2 Notions d'équilibre électrochimique et de potentiel d'électrode. A : oxydation provoquée par l'abaissement du niveau de Fermi de l'électrode. B : Equilibre électrochimique : les niveaux de Fermi sont égaux. C : réduction provoquée par l'élévation du niveau de Fermi de l'électrode.

Lors d'une réaction électrochimique, la cinétique réactionnelle est souvent limitée par le transport des espèces électroactives depuis la solution jusqu'à la surface de l'électrode, il est donc indispensable d'en connaître les principes.

I.3 Les modes de transport de la matière en solution

Au cours d'une réaction électrochimique, on peut distinguer les modes de transports collectifs, qui concernent l'ensemble des espèces présentes en solution, des modes de transport individuels. Dans la première catégorie, on trouve essentiellement la convection, qui représente le mouvement d'ensemble du fluide. Ce mouvement peut être naturel, lorsqu'il existe des gradients de densité, de température, ou de pression au sein du fluide, ou alors forcé, par l'usage d'un agitateur magnétique par exemple, ou d'une électrode tournante. Dans la seconde catégorie, on trouve d'abord la diffusion régie par les lois de Fick. Elle désigne le mouvement des espèces en conséquence d'un gradient de concentration au sein du fluide, induit par la consommation de l'espèce réagissant à la surface de l'électrode. La vitesse de déplacement sera alors fonction de l'espèce concernée et de certains paramètres du fluide comme sa viscosité (coefficient de diffusion dans un milieu donné). On trouve enfin la migration, qui désigne le mouvement d'espèces chargées soumises à un champ électrique.

L'équation générale du transport de Nernst-Planck prend en compte l'ensemble des modes de transports, tel que :

$$J_k = -D_k \frac{\partial C_k}{\partial x} - \left(\frac{F}{RT} \frac{\partial \Phi}{\partial x} \right) z_k D_k C_k + v_f C_k \quad (\text{Equation 3})$$

Où :

J : flux de matière total (en mol.s⁻¹.cm⁻²)

k : espèce électroactive considérée

D : coefficient de diffusion (en cm².s⁻¹)

C : concentration (en mol.cm⁻³)

x : distance selon l'axe perpendiculaire à l'électrode (en cm)

F : constante de Faraday (96 485 C.mol⁻¹)

RT : produit de la constante universelle des gaz parfaits et de la température absolue (en J.mol⁻¹)

Φ : valeur du champ électrique (en V.cm⁻¹ ou N.C⁻¹)

z : valence (sans dimension), assimilable à la charge d'ions monoatomiques

v_f : vitesse d'ensemble du fluide (en cm.s⁻¹)

Le premier terme de l'équation 3 constitue la première équation de Fick. Le second caractérise le flux des espèces soumises à un champ électrique. Enfin, le troisième rend compte du mouvement de convection. Dans le contexte de l'électrochimie analytique, on choisit souvent d'ajouter un électrolyte support au milieu à analyser. L'électrolyte support est présent en solution à une concentration fortement supérieure à celle de l'espèce étudiée et ne participe pas aux réactions se déroulant aux électrodes. Cela a comme effet, d'une part, de fixer la conductivité de la solution et, d'autre part, de permettre de négliger la contribution des espèces électroactives au flux de migration.

Le principe général de conservation de la matière impose que la variation de quantité de matière dans un volume donné pendant un instant dt, est égale à la différence entre les flux entrants et sortants, multipliée par la durée et l'aire, soit : $[J(x, t) - J(x + dx, t)]Adt$. Elle est d'autre part égale au volume que multiplie la variation de concentration, soit : $AdxdC$. Fick s'est basé sur ce principe pour définir sa deuxième loi, permettant de déduire la variation de concentration d'une espèce k dans un volume à partir de la valeur du flux, telle que :

$$\frac{\partial J_k}{\partial x} = - \frac{\partial C_k}{\partial t} \quad (\text{Equation 4})$$

En combinant les deux lois de Fick (1^{er} terme de l'équation 3 et équation 4), on fait apparaître une équation aux dérivées partielles faisant intervenir uniquement la concentration :

$$\frac{\partial C_k}{\partial t} = D_k \frac{\partial^2 C_k}{\partial x^2} - v_f C_k \quad (\text{Equation 5})$$

Afin de s'affranchir du terme représentant la convection du fluide, il est courant d'appliquer l'approximation de la couche de diffusion. Elle consiste à considérer une zone proche de l'électrode où seule la diffusion intervient². La convection est finalement prise en compte par une condition sur la concentration de l'espèce réactive, imposée au-delà de la longueur de la couche de diffusion (δ), telle que :

- pour $x \geq \delta$ la concentration de k est considérée constante et égale à sa valeur initiale, soit :
 $C_k(t, x \geq \delta) = C_k^{sol}$

Les autres conditions imposées pour résoudre l'équation aux dérivées partielles sont :

² Les études en hydrodynamiques démontrent en effet, que le phénomène de convection s'opère principalement dans le volume constitué par le fluide, alors qu'il est très nettement minimisé aux niveaux des parois constituées par le réservoir dans lequel il est contenu. Une couche stagnante de fluide se forme au niveau de la paroi, où seules les lois de diffusion règnent.

- le liquide est de type newtonien
- à $t = 0$, soit avant la polarisation de l'électrode, la concentration de l'espèce k est égale dans tout le volume : $C_k(t = 0, x) = C_k^{sol}$
- pour $t > 0$, la concentration de k à la surface de l'électrode est constante, soit : $C_k(t > 0, x = 0) = C_k^{el}$

I.4 Régime stationnaire et régime transitoire

Dans le cas où la convection est suffisante pour assurer le renouvellement des espèces réactives au voisinage de l'électrode, un régime stationnaire peut s'établir. Autrement dit, on observe un équilibre entre le flux d'espèces consommées à l'électrode et le flux d'espèces apportées par convection. Dans ces conditions particulières, l'équation 4 vaut zéro, c'est-à-dire que le flux est constant dans toute la zone où règne le gradient de concentration. Le temps n'entrant plus en compte, la résolution de l'équation 5 aboutit sur une droite affine, telle que :

$$C_k(x) = C_k^{el} + (C_k^{sol} - C_k^{el}) \frac{x}{\delta}, \text{ avec } 0 \leq x \leq \delta \quad (\text{Equation 6})$$

Alors que la valeur du flux à l'électrode vaut :

$$J_k(x = 0) = -\frac{D_k}{\delta} (C_k^{sol} - C_k^{el}) \quad (\text{Equation 7})$$

De manière quasi-systématique, $C_k^{el} = 0$, car la cinétique de transfert électronique, relative à la réaction à l'électrode, est infiniment grande par rapport à la cinétique de diffusion (pour $x < \delta$). Dans ces conditions, le flux à l'électrode devient constant et directement proportionnel à C_k^{sol} , sa valeur est alors qualifiée de flux limite. *A contrario*, si la convection est absente ou insuffisante, le profil de concentration, donc le flux d'espèces, varie avec le temps. Dans ce régime, qualifié de transitoire, la variation du flux est exprimée par la loi de Cottrell, telle que :

$$J_k(x = 0, t) = -\sqrt{\frac{D_k}{\pi t}} (C_k^{sol} - C_k^{el}) \quad (\text{Equation 8})$$

Par analogie avec l'équation 7, on constate ici que $\delta = \sqrt{\pi D t}$, c'est à dire que la longueur de la couche de diffusion croît selon la racine carrée du temps. De plus, tant que δ croît, le flux J_k décroît. La figure 3 illustre l'évolution des profils de concentrations de l'espèce électroactive en régime stationnaire (Figure 3-1), et en régime transitoire (Figure 3-2).

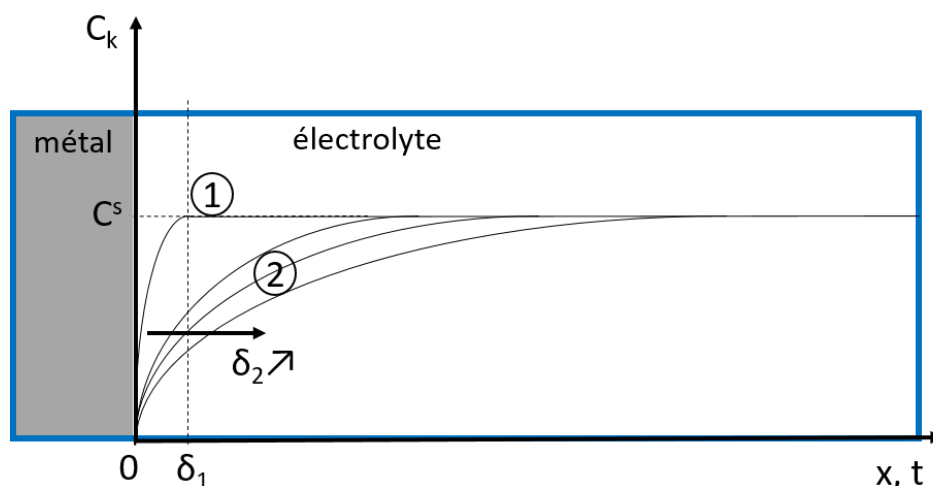


Figure 3 Profils de concentration de l'espèce réagissant à l'électrode en régime stationnaire (1) et en régime transitoire (2).

Voilà pour les aspects purement théoriques à maîtriser dans le cadre de l'électrochimie analytique. Toutefois, dans la pratique, on ne mesure ni n'applique un potentiel mais une différence de potentiel. Pour ce faire, il est nécessaire d'introduire au minimum deux électrodes en solution mais aussi de disposer d'un certain appareillage permettant à la fois de fournir l'énergie nécessaire à la modification du potentiel, et de mesurer un courant électrique à l'image du flux. On désigne cet ensemble par le terme cellule électrochimique, que nous allons décrire en suivant.

II La cellule électrochimique et l'ampérométrie aux ultramicroélectrodes

II.1 La cellule électrochimique

Pour que la différence de potentiel mesurée à l'équilibre (E_{eq}) entre deux électrodes prenne son sens, l'une des deux électrodes doit présenter un potentiel constant quelle que soit la solution dans laquelle elle est immergée. Une telle électrode est désignée électrode de référence (E_{ref}). L'électrode de référence dont le potentiel est fixé arbitrairement à zéro est l'électrode standard à hydrogène (ESH) mais sa fabrication est complexe. On privilégie alors d'autres types d'électrodes dont le potentiel est stable, que l'on exprime par rapport à l'ESH. On peut citer comme exemple l'électrode au calomel saturé dont le potentiel vaut 0,24V *versus* (ou *vs*) ESH, ou l'électrode à base d'argent notée Ag/AgCl/KCl_{sat} dont le potentiel vaut 0,22V *vs* ESH. L'autre électrode, celle dont le potentiel est fonction de la composition de la solution, est désignée électrode de travail (E_w).

Comme nous l'avons vu précédemment (voir I.2), quand les électrodes sont plongées en solution, les espèces dissoutes représentées par le couple O/R réagissent spontanément pour permettre l'alignement du niveau d'énergie E_F^{redox} avec le niveau E_F du métal et atteindre l'équilibre. Ceci se traduit par l'apparition d'un potentiel d'équilibre mesurable entre E_{ref} et E_w . Connaissant la composition de la solution, on peut déterminer E_{eq} par l'application de la loi de Nernst, telle que :

$$E_{eq} = E_{eq}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O^{vO}}{C_R^{vR}} \quad (\text{Equation 9})$$

avec E_{eq}^0 : potentiel standard³

L'application d'une surtension ($\eta = E - E_{eq}$) à l'aide d'une source externe, modifie le niveau d'énergie du métal constituant l'électrode de travail, et entraîne des réactions électrochimiques contrôlées à l'interface avec l'électrolyte, telles que le décrit la figure 4.

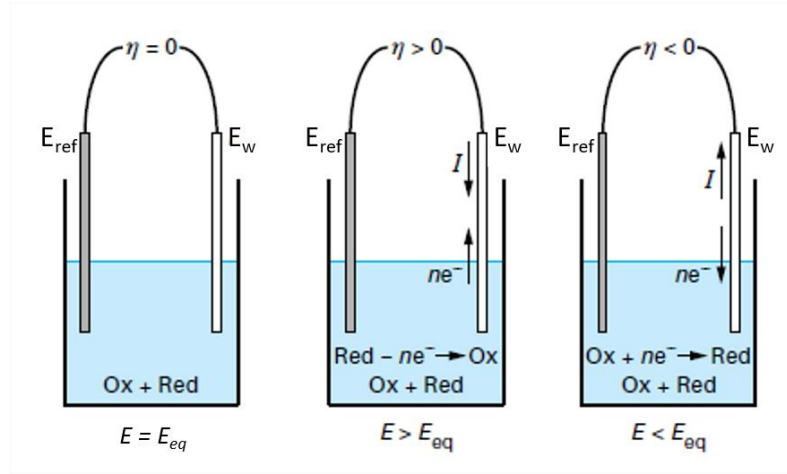


Figure 4 La cellule électrochimique : principe d'un montage à deux électrodes.

Si un ampèremètre est placé dans le circuit, alors il indiquera un courant à l'image de la quantité d'espèces réagissant à la surface de E_w . La relation de Butler-Volmer⁴ exprime de manière générale la variation du courant en fonction de la surtension appliquée, telle que :

$$i = nFAk_0 \left[C_R^{el} \exp\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT} \eta\right) - C_O^{el} \exp\left(\frac{-\alpha nF}{RT} \eta\right) \right] \quad (\text{Equation 10})$$

avec :

A : aire de l'électrode de travail (en cm^2)

k_0 : constante de vitesse standard (en $\text{mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ou M.s^{-1})

α : coefficient de transfert de charges

η : surtension appliquée (en V)

Comme pour le flux, si l'apport de convection permet d'entrer en régime stationnaire, alors la longueur de la couche de diffusion (δ) ne croît pas dans le temps et le courant prend une valeur limite (I_{lim}) :

$$I_{lim} = \frac{nFAD_k}{\delta} C_k^{sol} \quad (\text{Equation 11})$$

³ L'expression du potentiel standard n'est pas exposée ici par soucis de simplicité, cela nécessiterait d'introduire d'autres notions relativement complexes, et superflues dans notre contexte. L'important est de noter que ce terme est fonction de la température et du pH. Ceci offre la possibilité d'utiliser une cellule électrochimique en tant que sonde pH, par la mesure du potentiel d'équilibre à une température constante.

⁴ La validité de cette expression peut être vérifiée en considérant le cas particulier de l'équilibre. En effet, en posant $i = 0$, on retrouve l'expression de la loi de Nernst.

Enfin, par convention, l'intensité est négative si les électrons sont transférés de l'électrode vers la solution (réduction), et positive dans le cas inverse (oxydation).

II.2 La chute ohmique et le montage à trois électrodes

Quand la différence de potentiel est mesurée entre les deux électrodes pendant qu'un courant circule, la chute ohmique de potentiel (iR), R représentant la résistance électrique de l'électrolyte, vient systématiquement s'ajouter à la valeur mesurée. L'appareil de mesure, appelé potentiostat, doit alors compenser en permanence cette erreur pour appliquer une différence de potentiel en accord avec la consigne de l'expérimentateur, autrement dit :

Si $i = 0$, alors $E_{mes} = E_{eq}$

Si $i \neq 0$, alors $E_{mes} = E_{cons} + iR$, avec : $E_{cons} = E_{eq} + \eta$

D'où $E_{appl} = E_{cons} - iR = E_{eq} + \eta - iR$

(Equation 12)

où :

E_{mes} : différence de potentiel mesurée par le potentiostat

E_{cons} : différence de potentiel donnée en consigne par l'expérimentateur

C'est la différence de potentiel qui détermine la ou les espèces réagissant à la surface de l'électrode de travail. Dans le cadre de l'électrochimie analytique, il est crucial de contrôler parfaitement le potentiel pour éviter au maximum la réaction d'interférents. Pour ce faire, une troisième électrode dédiée à la circulation du courant est introduite : la contre-électrode (E_c). Finalement, dans un montage à trois électrodes, la différence de potentiel est appliquée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, tandis que la circulation du courant est permise par la présence de la contre-électrode.

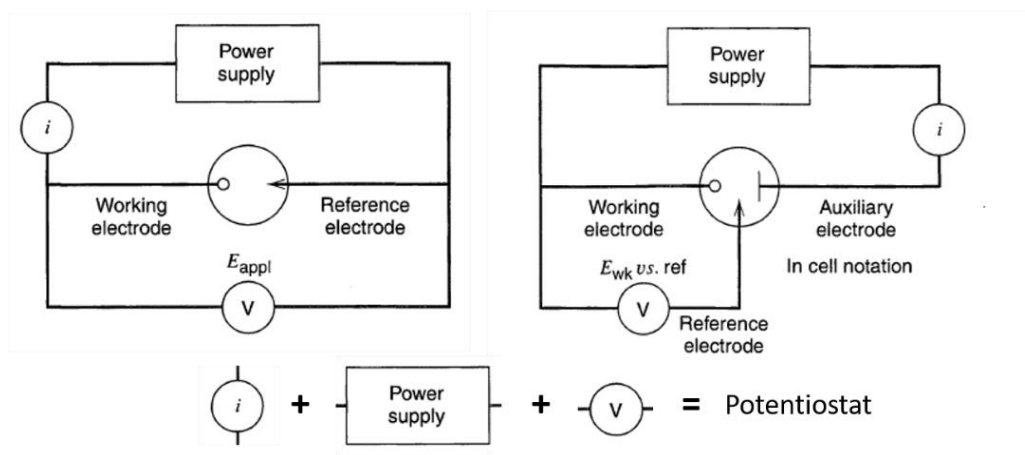


Figure 5 La cellule électrochimique : un montage à deux ou trois électrodes.

Pour résumer, un montage à trois électrodes limite l'influence de la chute ohmique, ce qui permet un meilleur contrôle de la différence de potentiel appliquée, donc une meilleure sélection des espèces réagissant sur E_w . La différence de potentiel appliquée entre E_w et E_{ref} peut être constante ou varier avec le temps, c'est ce que nous verrons dans la partie suivante.

II.3 Méthodes analytiques ampérométriques

En électrochimie analytique [3], on distingue principalement deux techniques : la potentiométrie et l'ampérométrie. La potentiométrie consiste à imposer un courant (possiblement de valeur nulle), et à observer une variation de tension à l'image du dosage de l'espèce électroactive d'intérêt. C'est le cas des transistors à effet de champ chimiquement sensibles (ChemFET), dont la tension de seuil varie en fonction de la quantité d'espèces en contact avec sa grille. A l'inverse, l'ampérométrie consiste à appliquer une différence de potentiel, et à observer une variation de courant à l'image du dosage de l'espèce électroactive d'intérêt. Le signal d'entrée peut être constant ou bien varier au cours du temps, ce qui offre à l'expérimentateur une large gamme de méthodes analytiques, plus ou moins adaptées à telle ou telle application. Nous présenterons ici les deux méthodes les plus répandues : la chronoampérométrie et la voltamétrie cyclique.

La chronoampérométrie constitue la méthode analytique la plus basique puisqu'elle consiste à appliquer un potentiel constant entre E_w et E_{ref} et à suivre l'évolution du courant circulant entre E_w et E_c au cours du temps. Etant donné que la mesure résulte sur la consommation de l'espèce dosée, il faut dans certains cas prendre garde à ne pas polariser l'électrode trop longtemps, au risque de modifier significativement la composition de la solution. Tout dépend du rapport entre la surface de l'électrode de travail et le volume de l'électrolyte. Ce cas de figure est à prendre en compte dans le cadre, par exemple, de la mesure de la consommation d'oxygène par cellule dans un micropuits dont le volume est de l'ordre du picolitre. Dans une telle situation, on privilégie une chronoampérométrie à sauts de potentiels, pour échantillonner la mesure dans le temps en revenant périodiquement au potentiel d'équilibre, et permettre à l'espèce consommée de rediffuser depuis la solution vers la surface de l'électrode de travail. Cette dernière technique peut aussi être mise en œuvre dans le but de discriminer la contribution de deux espèces interférentes au courant mesuré (mesures différentielles).

La voltamétrie cyclique consiste quant à elle à effectuer des allers-retours entre deux valeurs de différences de potentiels. Ainsi, plutôt que d'appliquer un échelon de tension ou un signal carré, on applique un signal triangulaire dont la pente correspond à la vitesse de balayage (V_b), exprimée en volts par seconde. L'expérimentateur exploite dans ce cas une courbe de type courant-potentiel, où l'on suit la variation du courant en fonction du potentiel appliqué. Quel que soit le solvant, aqueux ou organique, il est lui aussi capable de s'oxyder ou de se réduire par voie électrochimique. Présent en large majorité, le signal résultant de sa réaction englobera tous les autres. Lors d'un électrodosage, la différence de potentiel appliquée est donc obligatoirement inférieure aux potentiels (ou murs) d'oxydation et de réduction du solvant. La voltamétrie cyclique délivre de nombreuses informations inaccessibles par chronoampérométrie, comme : le nombre d'espèces détectables présentes en solution, les potentiels auxquels les détecter, les cinétiques de réactions, la réversibilité des réactions...

II.4 Courants faradiques et capacitifs

Jusqu'à maintenant, seuls les processus faradiques ont été évoqués. Ceux-ci englobent les réactions électrochimiques impliquant un échange électronique à l'interface métal|électrolyte, conduisant à la modification locale de la composition de la solution. On nomme ces processus faradiques car ils obéissent à la loi de Faraday, qui stipule que la quantité de matière convertie par la réaction électrochimique est proportionnelle à la quantité d'électricité ayant traversé l'interface, telle que :

$$Q = it = nFN \quad (\text{Equation 13})$$

avec :

Q : charge totale (en C)

N : quantité totale de l'espèce ayant réagi à la surface de l'électrode de travail (en mol)

Néanmoins, le passage d'une certaine quantité d'électricité à l'interface n'est pas nécessairement lié à une réaction électrochimique. En effet, lors des premiers instants d'électrolyse, l'interface électrode|électrolyte se comporte comme un condensateur. Les charges, négatives ou positives, sont instantanément disponibles du côté de l'électrode, tandis qu'elles doivent progressivement s'accumuler du côté de la solution pour former la double couche électrique⁵. Ceci entraîne le passage d'un courant uniquement lié à la réorganisation de la répartition des charges de part et d'autre de l'interface. On parle alors de processus non-faradiques, et de courants capacitifs.

Ainsi, lors d'une électrolyse, on assiste à une contribution commune au signal utile du courant capacitif et du courant faradique. Pendant une chronoampérométrie, le courant capacitif s'annule assez rapidement pour laisser place au courant faradique, porteur de l'information. Pendant une voltamétrie cyclique le courant capacitif est constant, augmentant proportionnellement à la vitesse de balayage, alors que le courant faradique croît proportionnellement à la racine carrée de V_b . Finalement, le courant capacitif définit le temps de réponse en chronoampérométrie, tandis qu'il limite la vitesse de balayage maximale en voltamétrie cyclique. Pour s'affranchir de ces contraintes, il est fréquent de chercher à minimiser la surface de l'électrode de travail.

II.5 La théorie des ultra-microélectrodes

Le terme ultramicroélectrode (UME) désigne des électrodes dont le rayon équivalent (r_0) de la surface active est inférieur ou égal à 25 μm . A de telles dimensions, les effets de bords deviennent proéminents [4], [5] alors qu'ils étaient négligeables avec des microélectrodes (dont les dimensions sont souvent millimétriques). Autrement dit, plutôt que de considérer une électrode plane, avec des phénomènes de diffusion linéaires, il faut considérer les UMEs comme ponctuelles, avec des phénomènes de diffusion hémisphériques. La variable à considérer est désormais la distance r (autrefois x) par rapport au point considéré au centre de l'électrode. Dans ces conditions, l'équation 5 précédemment considérée doit s'exprimer selon des coordonnées sphériques. Elle fait donc apparaître un nouveau terme, tel que :

$$D_k \left[\frac{\partial^2 C_k}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_k}{\partial r} \right] = - \frac{\partial C_k}{\partial t} \quad (\text{Equation 14})$$

Afin de résoudre l'équation 14, les conditions imposées restent les mêmes, si ce n'est que l'on remplace $x = 0$ par $r = r_0$. On obtient ainsi une nouvelle expression du flux, telle que :

$$J_k(r = 0, t) = -D_k (C_k^{sol} - C_k^{el}) \left[\frac{1}{\sqrt{\pi D_k t}} + \frac{1}{r_0} \right] \quad (\text{Equation 15})$$

⁵ Attention à ne pas confondre la double couche électrique, longue de quelques nanomètres, avec la longueur de la couche de diffusion, qui peut s'étendre bien plus largement.

L'équation 15 démontre que, plus le rayon r_0 de l'électrode est petit, plus le terme associé devient prééminent face à celui faisant intervenir le temps. (C'est d'ailleurs d'autant plus vrai au fur et à mesure que celui-ci s'écoule.) En d'autres termes, les UME présentent comme principal intérêt la possibilité d'entrer en régime stationnaire en absence de convection. La figure 6 illustre les différents régimes de diffusion considérés en fonction des dimensions des électrodes, et leurs conséquences sur l'allure des voltammogrammes associés. On qualifie d'hémisphérique le régime de diffusion aux UME, par opposition au régime linéaire des microélectrodes plus classiques. Il y a bien sûr une zone intermédiaire, où le régime de diffusion est mixte.

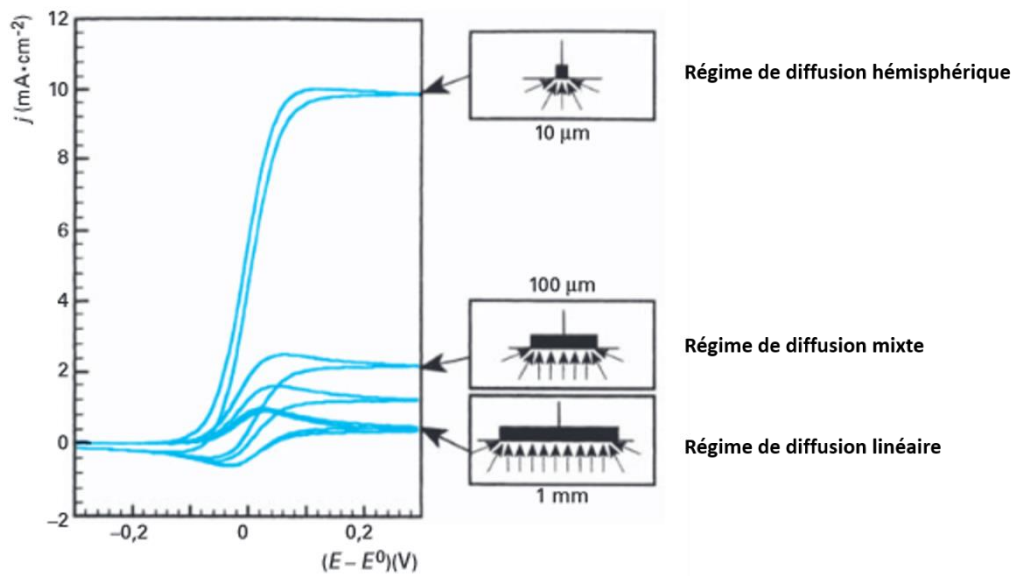


Figure 6 Régimes de diffusion et voltammogrammes associés, en fonction des dimensions de l'électrode travail.

Les UME présentent d'autres avantages très intéressants. D'abord, en régime de diffusion hémisphérique, la densité de courant mesurée à l'électrode est bien plus importante qu'en régime de diffusion linéaire. Ensuite, comme la surface de l'électrode est fortement réduite, le courant d'origine capacitive l'est aussi. Par conséquent, le temps de réponse du capteur est fortement diminué en chronoampérométrie, et les vitesses de balayages peuvent être fortement augmentées en voltamétrie cyclique. Enfin, comme les courants mesurés sont plus faibles, la chute ohmique est fortement réduite avec les UME. Cela offre d'une part la possibilité d'effectuer des mesures dans des milieux peu conducteurs sans ajouter d'électrolyte support, et d'autre part, de rendre dans certains cas facultatif l'usage d'un montage à trois électrodes.

Jusqu'à maintenant seules des électrodes planaires, dont les couches de diffusion associées peuvent s'étendre dans toutes les directions, ont été évoquées. La partie suivante va concerner la définition de la configuration de nos futurs micropuits instrumentés, ainsi que la théorie associée aux UME dans cette configuration particulière.

III Théorie appliquée à la structure du micropuits sélectionnée

III.1 Choix de la configuration des micropuits instrumentés

Une notion va être essentielle tout au long de l'étape de conception, celle du taux de collecte (τ). Le taux de collecte désigne la capacité d'un capteur électrochimique, à capter le total des espèces émises par une source quelconque. La figure suivante (Figure 7) illustre cette notion par le chevauchement des couches de diffusion et de détection. On comprend alors aisément l'intérêt porté vers les micropuits instrumentés, de par leur qualité vis-à-vis du confinement des espèces produites par une entité biologique unique.

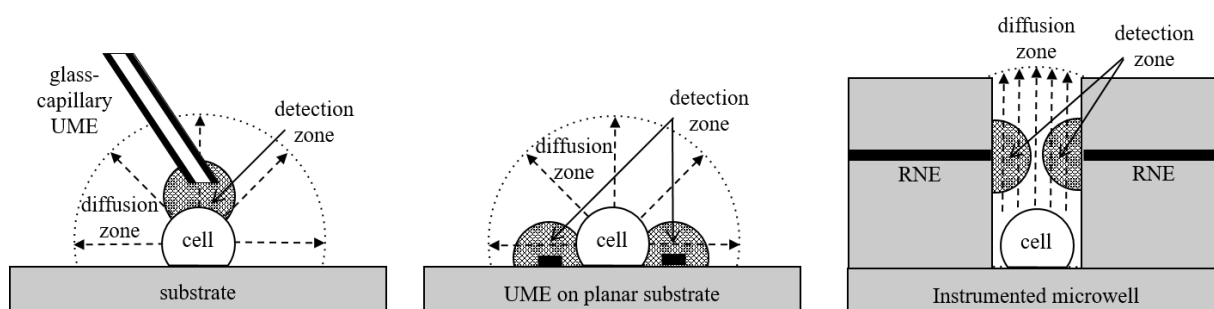


Figure 7 Chevauchements entre les couches de diffusion des espèces émises par une entité biologique unique et les couches de détection relatives à la polarisation d'une UME, dans les trois configurations proposées par la littérature.

Lors de la conception d'un micropuits instrumenté, on considère systématiquement l'élément biologique situé au fond. L'usage d'une électrode disque encastrée (Figure 13A Chap2) comme électrode de mesure risque de perturber de manière non négligeable l'élément étudié, par la modification locale du pH ou les phénomènes d'électroporation [6]. Les configurations avec une électrode surfacique (Figure 13B, D Chap2) présentent certains intérêts mais ne se justifient pas si l'objectif est précisément de maximiser le taux de collecte. La présence d'un anneau intégré (Figure 13C, D, E Chap2), constitue finalement la stratégie la plus appropriée, pour maximiser la détection des espèces produites par une entité biologique située au fond d'un micropuits. Toutefois, si l'on souhaite être en mesure de déterminer expérimentalement la valeur du taux de collecte, il faut alors être capable de générer de manière contrôlée la production d'une espèce électroactive au fond du puits. Pour cet objectif précis, une électrode disque formant le fond du puits pourra être employée.

III.2 Théorie de l'électrochimie appliquée aux UME intégrées dans un micropuits : le micro-disque encastré

L'ensemble des équations présentées jusqu'ici considèrent des électrodes planaires. Dans une configuration 3D, les mécanismes de transport de la matière deviennent plus complexes. En prenant en compte un micropuits, deux zones sont à considérer : le transport de matière depuis la solution jusqu'au micropuits (régime de diffusion hémisphérique), et le transport dans le micropuits, où le confinement des couches de diffusion entraîne la réapparition d'un régime de diffusion de type linéaire. La figure suivante (Figure 8) illustre ce principe.

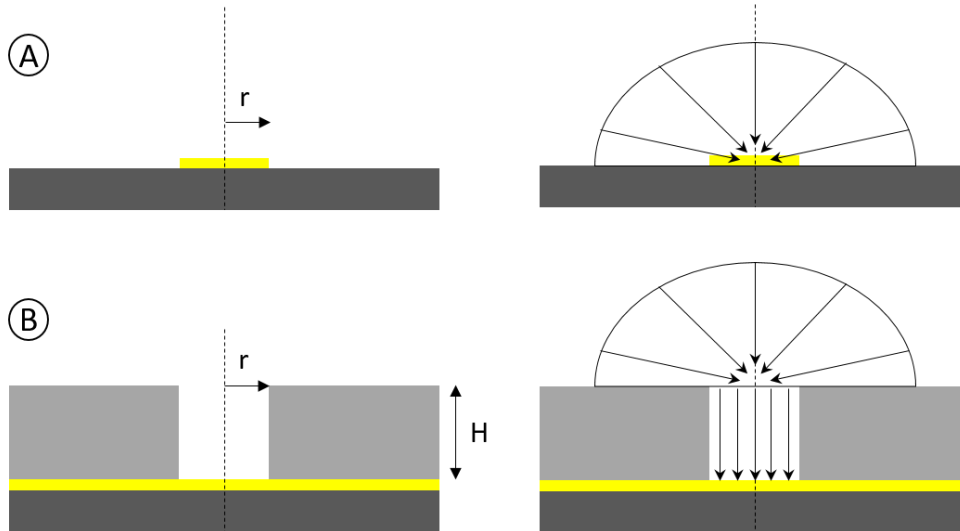


Figure 8 Comparaison des régimes diffusioennels entre un microdisque planaire (A) et un microdisque encastré (B).

La longueur de la couche de diffusion d'une UME disque plan s'exprime par [5]:

$$\delta = \frac{\pi r}{4} \quad (\text{Equation 16})$$

avec :

$$I_{lim} = \frac{nFCDA}{\delta} \quad (\text{Equation 17})$$

Lorsque le disque est encastré dans un microcylindre, la loi de continuité des flux donne [7]:

$$I_{lim} = \frac{nFADC_H}{H} = \frac{nFAD(C - C_H)}{\delta} \quad (\text{Equation 18})$$

avec :

C_H la concentration de l'espèce à l'entrée du puits en régime stationnaire

C : la concentration en solution

A : l'aire du disque

En posant $C_H = \frac{I_{lim}H}{nFAD}$, on obtient finalement :

$$I_{lim} = \frac{nFADC}{H + \delta} \quad (\text{Equation 19})$$

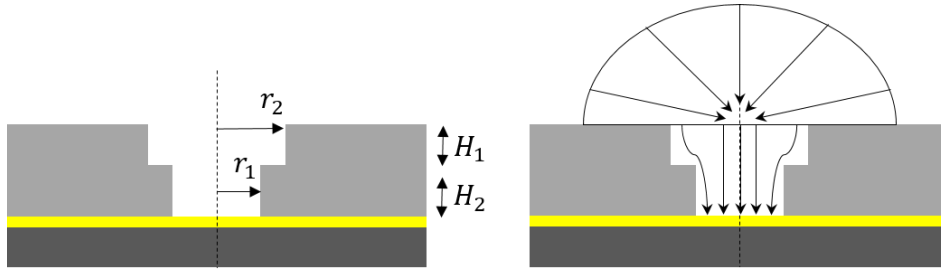


Figure 9 Considération d'un microdisque au sein d'un double encastrement.

Si le disque est doublement encastéré (Figure 9), alors on peut appliquer le même raisonnement basé sur les lois de diffusion, au niveau de la marche (H_2), tel que :

$$I_{lim} = \frac{nFA_1DC_{H_2}}{H_2} = \frac{nFA_2D(C - C_{H_2})}{\delta + H_1} \quad (\text{Equation 20})$$

avec :

C_{H_2} : la concentration de l'espèce au niveau de la marche en régime stationnaire

C : la concentration en solution

A_1 : aire du disque représentant la surface de l'encastrement supérieur

A_2 : aire de l'électrode disque doublement encastéré

En posant dans ce cas $C_{H_2} = \frac{I_{lim}H_2}{nFA_2D}$, on obtient finalement :

$$I_{lim} = \frac{A_1C}{\delta + H_1 + H_2 \frac{A_1}{A_2}} \quad (\text{Equation 21})$$

III.3 Théorie de l'électrochimie appliquée aux UME intégrées dans un micropuits : le nano-anneau encastéré

Intéressons-nous désormais aux UME de forme annulaire. Le courant mesuré à une UME plane de ce type avec r_1 et r_2 , les rayons intérieur et extérieur, s'exprime selon [8] :

$$I_{lim} = nFCD \frac{\pi^2(r_1 + r_2)}{\ln\left(\frac{32r_1}{r_2 - r_1} + \exp\left(-\frac{\pi^2}{4}\right)\right)} \quad (\text{Equation 22})$$

Pour simplifier, considérons $l_0 = \frac{\pi^2(r_1 + r_2)}{\ln\left(\frac{32r_1}{r_2 - r_1} + \exp\left(-\frac{\pi^2}{4}\right)\right)}$, soit un paramètre homogène à une longueur, représentatif de la géométrie de l'électrode.

En régime de diffusion stationnaire, une UME annulaire encastrée dans un cylindre de profondeur H, dont le rayon externe est égal à celui du puits (r_2) peut être assimilée à disque (Figure 10). En effet, dans ces conditions, la concentration de l'espèce réagissant à l'électrode est nulle au niveau de toute la surface formant le fond du puits. Finalement, que l'électrode prenne la forme d'un disque ou d'un anneau, on considère une section formant le fond du micropuits.

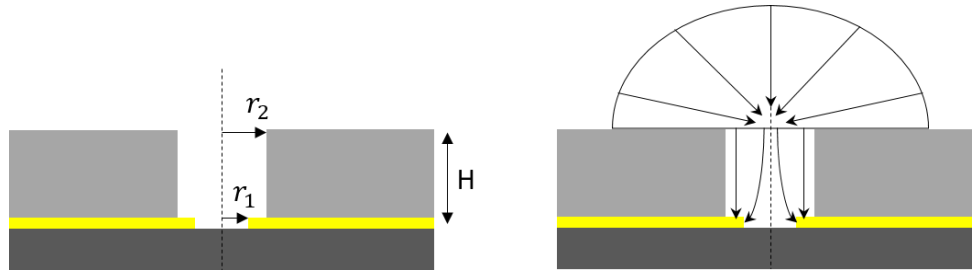


Figure 10 Considération d'un anneau encastré.

Si on assimile le courant mesuré à un anneau à celui mesuré à un disque plan, alors :

$$nFDCl_0 = \frac{nFDCA}{\delta} \quad (\text{Equation 23})$$

d'où :

$$A = l_0\delta$$

En remplaçant A par sa nouvelle expression dans l'équation 17, on a :

$$I_{lim} = \frac{nFDCl_0}{1 + \frac{H}{\delta}} \quad (\text{Equation 24})$$

Dans le cas où l'UME annulaire est encastrée au sein d'un double encastrement, on admet que l'état stationnaire est atteint une fois que la partie inférieure du micropuits est vidée de l'espèce réagissant à la surface de l'électrode (Figure 11B). L'anneau étant en quelque sorte suspendu, il faut désormais prendre en compte son épaisseur (e).

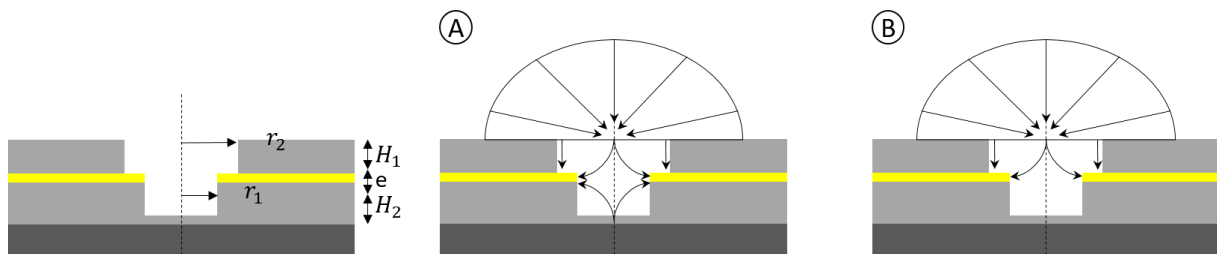


Figure 11 Considération d'un anneau encastré au sein d'un double encastrement en régime transitoire (A) et en régime permanent (B).

L'équation précédente reste ainsi valable, à condition de remplacer la valeur de r_1 dans l_0 par un terme équivalent (r_{eq}) prenant en compte l'épaisseur, tel que :

$$\pi(r_2^2 - r_{eq}^2) = \pi(r_2^2 - r_1^2) + 2\pi r_1 e$$

d'où :

$$r_{eq} = r_1 \sqrt{1 - \frac{2e}{r_1}} \quad (\text{Equation 25})$$

Les modèles théoriques développés seront validés ou infirmés par l'expérience une fois les composants réalisés. Néanmoins, il est possible de prendre de l'avance en confrontant ces équations aux résultats issus d'un modèle de simulation par éléments finis. C'est l'un des objectifs des travaux de simulation présentés dans la quatrième partie de ce chapitre.

IV. Simulation

IV.1 Définition et validation du modèle de simulation

Le logiciel COMSOL est un logiciel de simulation par éléments finis. Son usage requiert la définition d'une géométrie (1D, 2D ou 3D), puis sa division à l'aide de motifs élémentaires appelés « mailles ». Finalement, quelle que soit la forme de l'objet dessiné, le logiciel le considère comme un objet fractal. En fonction des conditions imposées aux limites (géométriques et/ou temporelles), le logiciel résout les équations aux dérivées partielles au niveau de chaque nœud, et moyenne les résultats pour remplir les mailles. Par conséquent, la durée de la simulation est fonction du nombre de mailles (et des performances de calcul de l'ordinateur), tandis que la précision des résultats est liée à la taille des mailles.

Dans le contexte de la simulation des performances d'un puits unique [9], [10], on privilégie le dessin d'un demi-puits en 2D. Une fois les résultats calculés, on demande au logiciel d'effectuer une rotation de l'objet selon l'axe central du micropuits. En résulte une image 3D présentant un puits dans son entièreté. La définition d'un dessin 3D aboutirait au même résultat, mais avec un temps de calcul nettement plus conséquent. Concernant le maillage, on impose des contraintes sur la taille maximale des mailles au niveau de l'électrode ($r/100$), alors que le logiciel gère de lui-même la taille des mailles situées dans le volume de solution. Afin de s'assurer que la couche de diffusion puisse s'étendre sans limitations, les dimensions du carré formant l'espace extra-puits sont fixées dix fois supérieures à la valeur maximale théorique de celle-ci : soit $z_{max} = 10\delta_{max} = 90 \mu m$ (pour $R_{max} = H = 5 \mu m$).

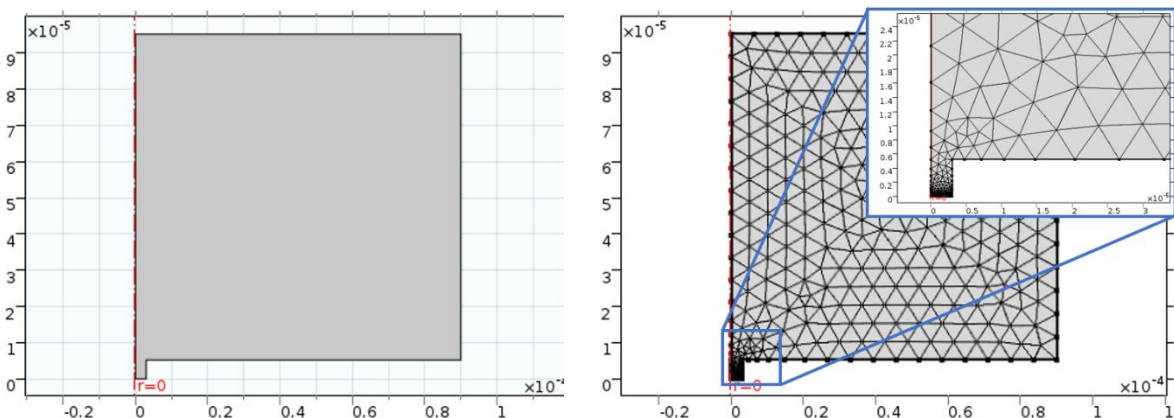


Figure 12 Définition de la géométrie et du maillage dans le cadre de la simulation des phénomènes de diffusion dans un demi-micropuits 2D.

Avant d'interpréter des résultats issus de la simulation, il vaut mieux s'assurer au préalable que ceux-ci sont fiables, c'est-à-dire qu'ils sont en accord avec la théorie de l'électrochimie évoquée précédemment. Plaçons-nous dans les conditions du régime stationnaire aux ultramicroélectrodes, où les termes de l'équation de Nernst-Planck (Equation 3) liés à la convection et à la migration sont négligés. Considérons maintenant une UME disque formant le fond du micropuits, par analogie avec l'équation 19, le flux s'exprime par :

$$J = \frac{DCA}{H + \delta} \quad (\text{Equation 26})$$

Si on impose la valeur du flux, alors on peut déduire la valeur de la concentration de l'espèce réactive selon z , soit l'axe situé au centre du disque et orienté perpendiculairement, telle que :

$$C(z) = \frac{J}{\pi R^2 D} \left(H + \frac{\pi R}{4} - z \right) \quad (\text{Equation 27})$$

Voyons voir maintenant si les résultats issus de la simulation aboutissent sur les mêmes valeurs que les résultats obtenus par le calcul.

Posons : $H = 5,2 \mu\text{m}$; $C(t = 0) = 0$; $D = 6,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $J = 1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, et traçons le profil de concentration de l'espèce émise depuis le fond du puits selon trois valeurs de R : $1,5 \mu\text{m}$, $3 \mu\text{m}$ et $4,5 \mu\text{m}$. Enfin, comparons les résultats de simulation avec ceux calculés selon l'équation 27.

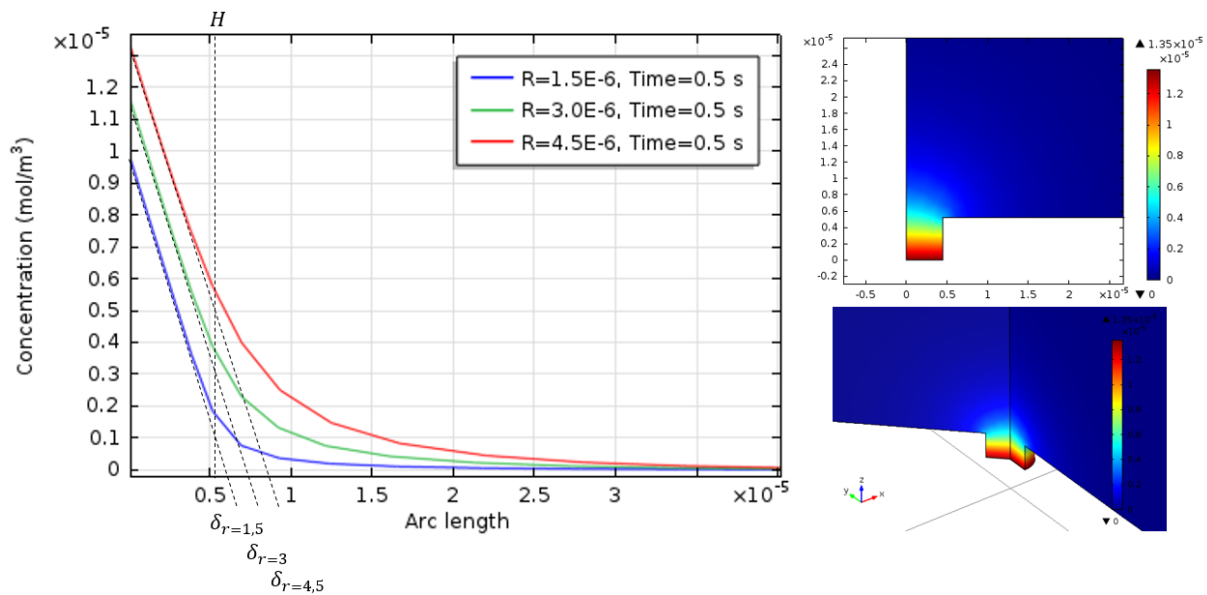


Figure 13 Profils de concentrations en régime permanent pour trois valeurs de rayons : 1,5 ; 3 et 4,5 μm .

Table 1 Comparaison des valeurs obtenues par calcul et par simulation.

R (μm)	C(z) calculées ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)		C(z) simulées ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)		C(z) = 0 ou δ (en μm)	
	C(0)	C(H)	C(0)	C(H)	calculée	simulée
1,5	$1,05 \times 10^{-5}$	$1,93 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,85 \times 10^{-6}$	6,38	6,33
3	$1,24 \times 10^{-5}$	$3,86 \times 10^{-6}$	$1,18 \times 10^{-5}$	$3,86 \times 10^{-6}$	7,56	7,42
4,5	$1,43 \times 10^{-5}$	$5,79 \times 10^{-6}$	$1,35 \times 10^{-5}$	$5,75 \times 10^{-6}$	8,73	8,92

Table 2 Validation du modèle de simulation 2D.

R (μm)	Erreurs normalisées		
	C(0)	C(H)	δ
1,5	4,36%	4,21%	0,78%
3	4,74%	0,07%	1,85%
4,5	5,72%	0,76%	2,18%

On constate une erreur maximale de 5%. On peut donc considérer que le modèle de simulation est fiable et poursuivre notre étude visant l'optimisation du taux de collecte.

IV.2 Définition des paramètres géométriques de la structure pour l'optimisation du taux de collecte

Le taux de collecte (τ) est un paramètre sans dimension traduisant la capacité de l'anneau intégré à capter les espèces produites au fond du puits. Dans la simulation comme dans l'étape de validation par l'expérience (caractérisation électrochimique), une électrode disque formant le fond du puits permet d'électrogénérer une espèce qui réagira par la suite à la surface de l'anneau. Il suffit alors de calculer le rapport entre les flux sortant (J_{out}) et entrant (J_{in}) (ou des courants associés) pour obtenir la valeur de τ . Dans le cadre de l'application finale, le taux de collecte traduit la capacité de l'anneau intégré à détecter les espèces libérées par une mitochondrie située au fond du puits.

Les travaux de simulation et de mise au point du procédé de fabrication ont été menés en parallèle. Le procédé de fabrication va être exposé en détails dans le chapitre suivant mais pour résumer, il consiste à empiler les couches de matériaux, puis à les creuser pour former les micropuits. Cette dernière étape conduit à la formation d'une marche de longueur L au niveau de l'anneau intégré, modifiant au passage la valeur de la surface active de l'électrode. Les observations effectuées au microscope électronique à balayage (MEB) ont permis d'évaluer cette longueur : entre 200 et 500 nm. Pour que le modèle de simulation soit au plus proche de la réalité, ce nouveau paramètre L doit être pris en compte. La figure 14 présente la nouvelle géométrie considérée et tous ses paramètres.

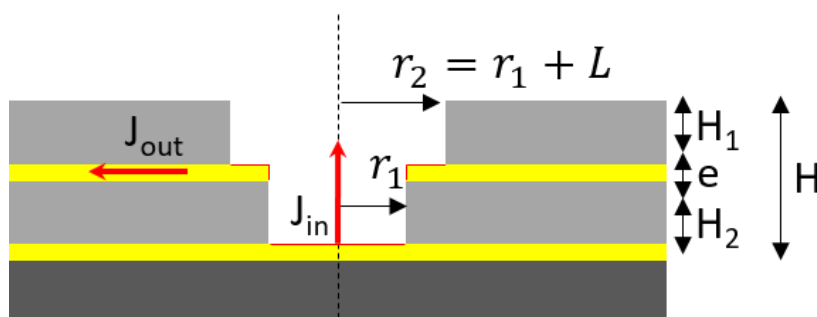


Figure 14 Optimisation de la géométrie du micropuit instrumenté.

On impose la même condition sur le maillage au niveau de la surface active de l'électrode annulaire qu'au niveau de l'électrode disque considérée précédemment.

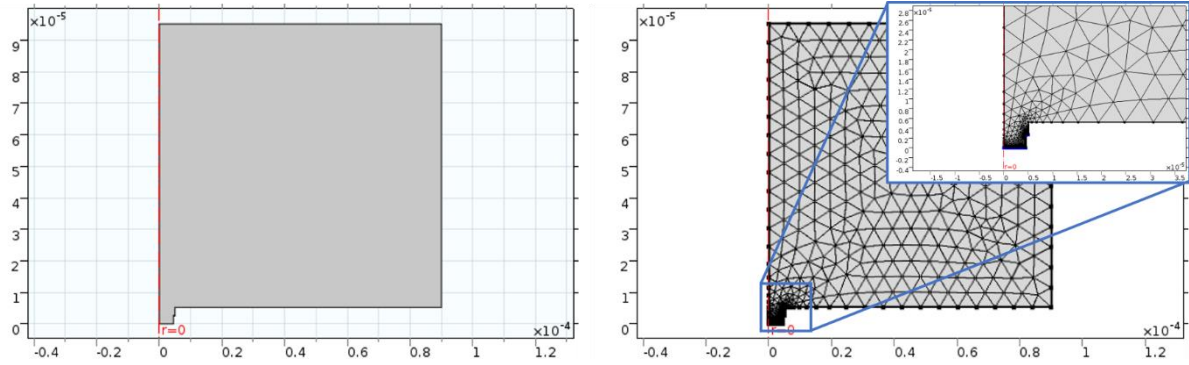
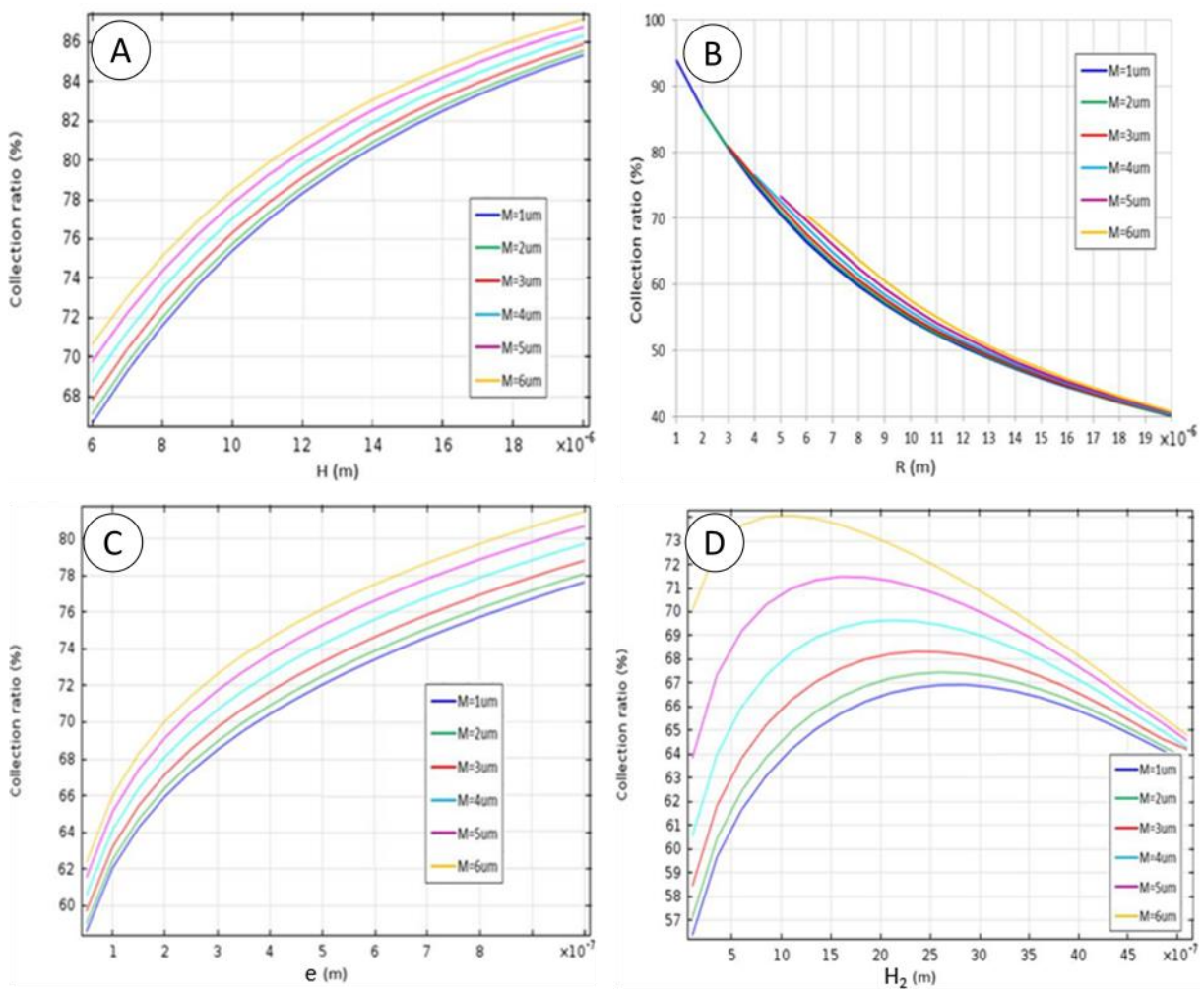


Figure 15 Nouvelle définition de la géométrie et du maillage après prise en compte de la présence d'une marche au niveau de l'électrode annulaire.

Puisqu'elle découle directement de la fabrication, la longueur de la marche (L) n'est pas considérée ($r_1 = r_2 = R$) dans un premier temps. Son influence sur le taux de collecte sera évaluée à part, après avoir fixé l'ensemble des autres paramètres géométriques. Afin de définir la structure géométrique la plus adaptée, on fait varier un à un l'ensemble des paramètres, tels que : le rayon (r_1), la hauteur totale (H), l'épaisseur de l'électrode annulaire (e) et son emplacement (H_2). Par ailleurs, on introduit un paramètre supplémentaire : le paramètre M , décrivant le rayon du disque où l'espèce électroactive est générée. Précédemment M prenait la valeur de R , ici M varie entre 1 et $6 \mu\text{m}^6$.



⁶ Résultats issus des stages de William Tiddi et de Matthieu Polverel

Figure 16 Variations de la valeur du taux de collecte en fonction de A : la hauteur (H), B : le rayon (R), C : l'épaisseur de l'électrode annulaire (e), D : l'emplacement de l'électrode annulaire (H₂).

La figure 16 présente les variations du taux de collecte en fonction des différents paramètres géométriques d'intérêt. Étant donné que tous les paramètres agissent les uns avec les autres, cette étude nous permet surtout de dégager des tendances. Ainsi, le taux de collecte augmente si :

- le rapport de forme H/R augmente ;
- l'épaisseur (e) de l'électrode augmente ;
- l'électrode annulaire est placée à mi-hauteur⁷ (H₂ = H/2).

L'idéal serait donc de maximiser H et minimiser R, ce qui est d'ailleurs tout à fait logique compte tenu du principe de confinement (figure 7). Cependant, des limitations d'ordre technologique (décrites dans le prochain chapitre) nous contraignent à fixer comme valeurs maximales : H = 5 μm, e = 200 nm, et comme valeur minimale : R = 1,5 μm. N'étant pas absolument certains de pouvoir produire des puits de 1,5 μm de rayon, trois valeurs seront considérées pendant la suite des travaux de simulation, telles que : R = {1,5 ; 3 ; 4,5} μm. Désormais, intéressons-nous à l'influence de la longueur de marche (paramètre non-maîtrisé) pour ces trois valeurs de rayons.

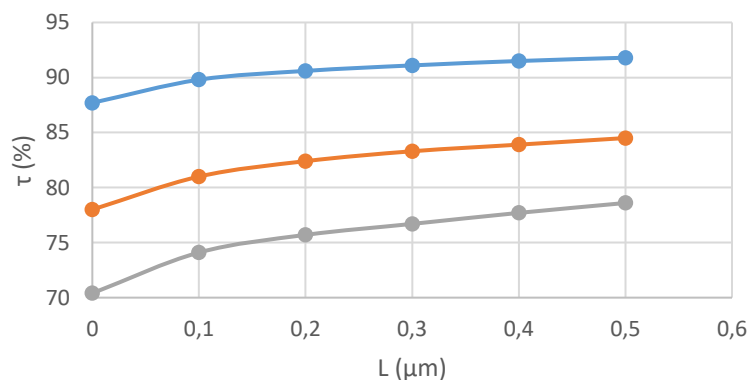


Figure 17 Variations de la valeur du taux de collecte en fonction de la longueur de la marche pour trois valeurs de rayon : 1,5 μm (bleu), 3 μm (orange), 4,5 μm (gris).

Le paramètre L influe sur deux facteurs : le confinement apporté par la structure et la valeur de la surface active de l'électrode de travail. Les résultats de simulation montrent que la présence de la marche provoque une augmentation de l'ordre de 5% du taux de collecte. Cela signifie donc que l'augmentation de la surface de l'électrode influe davantage sur τ que la perte de confinement.

Maintenant que tous les paramètres géométriques sont fixés, on peut chercher à prédire le courant mesuré lors des futures étapes de caractérisations électrochimiques. Lors de ces caractérisations, le ferrocène-méthanol, désigné Fc, est oxydé à la surface de la nanoélectrode annulaire pour former l'ion ferricénium, noté Fc⁺. Le ferrocène-méthanol a été sélectionné car il est stable en solution aqueuse et son oxydation monoélectronique est réversible, telle que :



⁷ Placer l'électrode à mi-hauteur constitue le meilleur compromis si l'on prend en compte l'ensemble de valeurs que prend M. De plus, on voit que τ est maximisé pour H₂ = H/2 quand M = 1 μm, dimension proche de celle d'une mitochondrie isolée.

Il est nécessaire de renseigner au logiciel les caractéristiques de cette espèce électroactive afin qu'il puisse résoudre l'équation de Butler-Volmer (Equation 10) :

$$C_{t=0} = [Fc]_{t=0} = 1 \text{ mM}$$

$$D = D_{Fc} = 6,1 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \text{ [11]}$$

$$k_0 = 0,01 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$\alpha = 0,5$$

$$E_{eq} = 0,15 \text{ V}$$

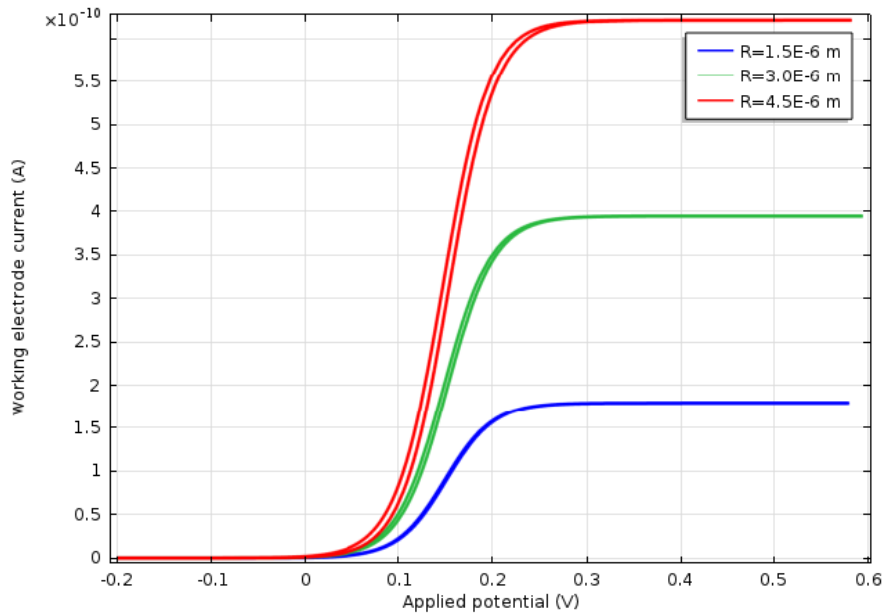


Figure 18 Voltammogrammes obtenus par simulation de l'oxydation du ferrocène diméthanol (1 mM) à la surface de l'électrode annulaire pour trois valeurs de rayon : 4,5 μm (rouge), 3 μm (vert), 1,5 μm (bleu).

Table 3 Valeurs des courant limite obtenues par calcul et par simulation pour l'oxydation du FcMeOH à 1 mM.

r_1 (μm)	1,5	3	4,5
Courant limite simulé (pA)	180	390	622
Courant limite calculé (pA)	174	388	619

Considérant une géométrie fixe (à l'exception du rayon r_1), il y a une très bonne concordance entre les résultats obtenus par le calcul et par la simulation. Au-delà de définir les performances attendues lors de l'étape de caractérisation électrochimique, les résultats exposés ci-dessus permettent de valider à la fois le modèle de simulation et le modèle mathématique définis dans le cadre d'un anneau doublement encastré. Comme évoqué précédemment, la présence d'une électrode disque encastrée permet de générer la production d'une espèce au fond du puits, dans le but de déterminer expérimentalement la valeur du taux de collecte. La prochaine partie vise à prédire les valeurs de courants obtenues dans ce mode de fonctionnement particulier.

IV.3 Mode générateur-collecteur

Le mode générateur-collecteur (ou mode GC) [12] désigne un mode de fonctionnement particulier, où une électrode est utilisée pour générer une espèce (générateur), alors qu'une autre électrode placée à proximité est utilisée pour consommer l'espèce générée (collecteur). Dans le cadre des micropuits instrumentés, l'électrode disque formant le fond du puits est utilisée comme électrode génératrice, alors que l'anneau intégré ou une électrode surfacique est utilisée en tant qu'électrode collectrice [13]. De plus, si la réaction est réversible, l'électrode collectrice est aussi régénératrice. Ce cas de figure est désigné dans la littérature par le terme « redox cycling ».

Dans notre modèle de simulation, le ferrocène-méthanol, initialement seul en solution, est oxydé au disque pour former l'ion ferricénium. Fc^+ est ensuite réduit au niveau de l'anneau, entraînant la régénération de Fc , dont une partie diffuse vers le fond du puits et s'ajoute à celui diffusant depuis la solution. Par conséquent, la longueur de la couche de diffusion relative à l'oxydation de Fc au niveau du disque se retrouve en quelque sorte compressée. Finalement, la polarisation de l'anneau entraîne une augmentation du courant mesuré au niveau du disque, introduisant par la même occasion une nouvelle notion : le facteur d'amplification, défini tel que :

$$A = \frac{I_{DME|RNE}}{I_{DME|\overline{RNE}}} \quad (\text{Equation 29})$$

où :

DME traduit le terme « disc microelectrode »

RNE traduit le terme « ring nanoelectrode »

$I_{DME|RNE}$: courant mesuré à la DME sachant la RNE polarisée

$I_{DME|\overline{RNE}}$: courant mesuré à la DME sachant la RNE non-polarisée

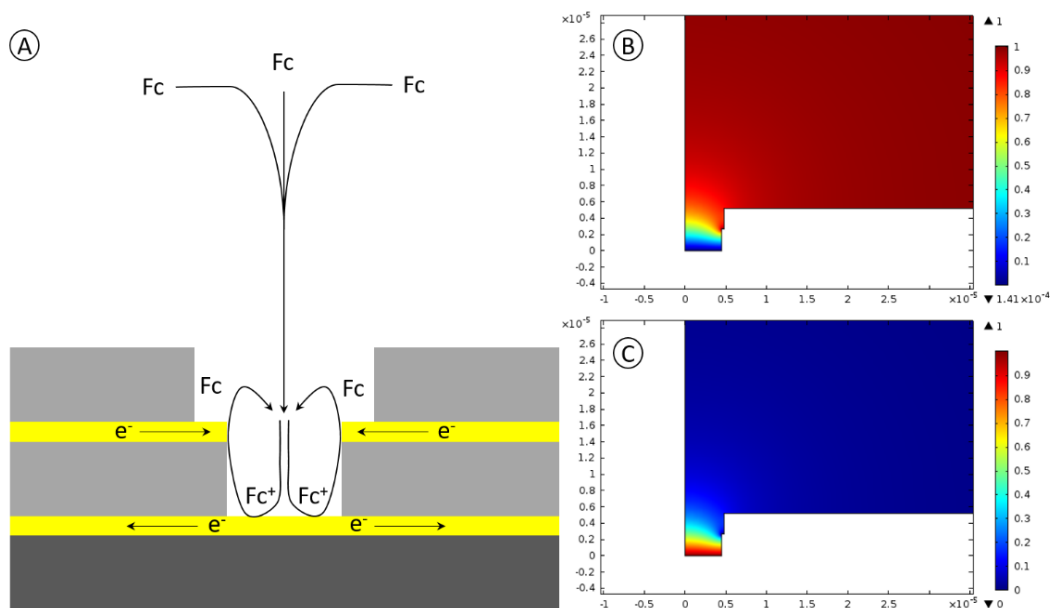


Figure 19 A : schéma descriptif du mode GC, B : profil 2D de la concentration de Fc en mode GC, C profil 2D de la concentration de Fc^+ en mode GC.

De plus, en mode générateur/collecteur, le taux de collecte s'exprime par :

$$\tau = \frac{I_{RNE|DME}}{I_{DME|RNE}} \quad (\text{Equation 30})$$

Afin d'évaluer en une seule fois l'ensemble des variables nécessaires aux calculs du facteur d'amplification et du taux de collecte, un scénario a été mis en place, tel que :

- pour $0 < t \leq 3$ s : seul le disque est polarisé (Figure 20A) ;
- pour $3 < t \leq 6$ s : le disque et l'anneau sont polarisés : mode générateur/collecteur (Figure 20B) ;
- pour $t > 6$ s : seul l'anneau est polarisé (Figure 20C).

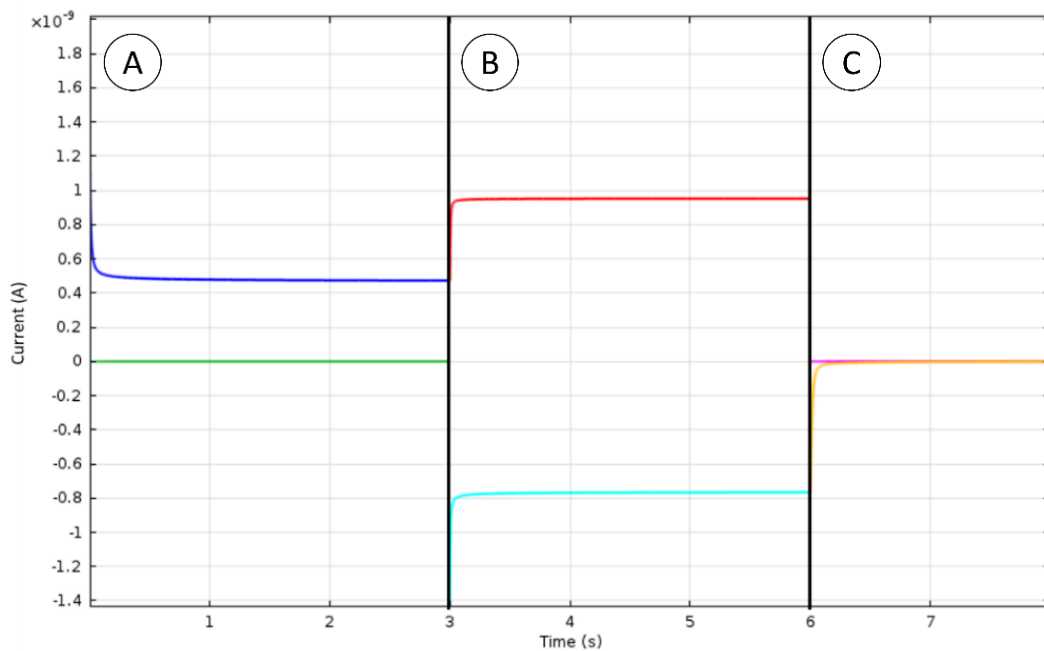


Figure 20 A : oxydation de Fc à la DME, B : oxydation de Fc à la DME et réduction de Fc⁺ à la RNE (mode GC), C : réduction de Fc⁺ à la RNE, pour R = 4,5 μm.

Table 4 Courants obtenus, facteur d'amplification et taux de collecte, pour trois valeurs de rayon.

R (μm)	I _{DME} (pA)	I _{DME RNE} (pA)	I _{RNE DME} (pA)	A	τ
1,5	82	141	-130	1,7	91%
3	251	487	-413	1,8	85%
4,5	473	955	-766	2	80%

Les résultats obtenus montrent que la valeur du taux de collecte diminue quand le rayon du puits augmente, à l'inverse de la valeur du facteur d'amplification. L'explication de la variation du taux de collecte est assez évidente : plus le puits est étroit, plus la capacité de l'anneau encastré à capter ce qui transite par le puits, dans un sens comme dans l'autre, grandit. Concernant la valeur du facteur d'amplification, on pourrait penser que lui aussi augmente avec le confinement mais ce n'est pas le cas. Cela s'explique par la variation des surfaces des électrodes en fonction du rayon du micropuits. En effet, quand le rayon augmente, l'aire du disque augmente fortement ($A_{DME}(r_1) = \pi r_1^2$) comparativement à

l'aire de l'anneau ($A_{RNE}(r_1) = 5,25r_1$). Autrement dit, même si la quantité de Fc régénérée à l'anneau (τ) diminue quand le rayon augmente, le facteur d'amplification augmente car le disque voit sa capacité à capter le Fc régénéré améliorée.

On a considéré jusqu'ici un micropuits unique dans un espace de diffusion infini. Si on considère cette fois un réseau de micropuits instrumentés, il est indispensable d'introduire un paramètre géométrique supplémentaire : la distance centre-à-centre (d).

IV.4 Performances optimisées d'un réseau de micropuits instrumentés

Considérant un réseau d'ultramicroélectrodes (UMEA), le régime de diffusion hémisphérique, assimilable au régime stationnaire, est atteignable si et seulement s'il n'y a pas de chevauchement des couches de diffusion d'un ultramicroélectrode à l'autre. La figure 21 illustre ce concept et donne la forme des voltammogrammes cycliques associés à chaque situation, selon des électrodes disque plan.

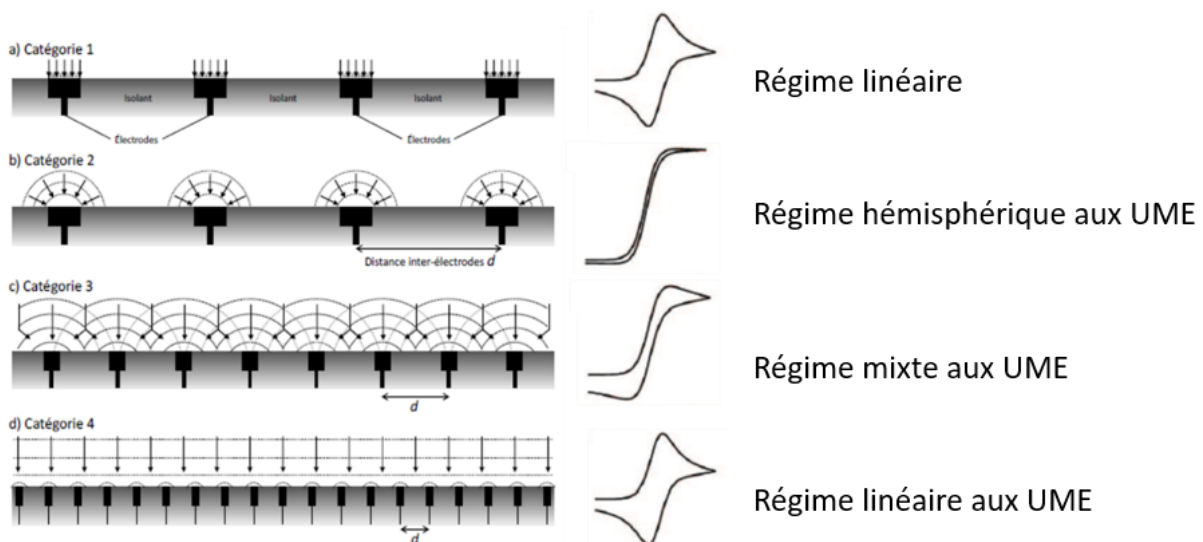


Figure 21 Influence de la distance inter-électrodes considérant des UME disques plans.

Si les UME ne sont pas suffisamment éloignées les unes des autres, alors le régime de diffusion linéaire sera systématiquement atteint en chronoampérométrie (Figure 21D). En voltamétrie cyclique, on peut limiter l'expansion des couches de diffusion en augmentant la vitesse de balayage (V_b). Par ailleurs, nous avons vu précédemment (III.2), que lorsqu'une électrode disque (ou anneau) n'est plus planaire mais encastrée dans un micropuits, deux régimes de diffusion interviennent : le régime de diffusion hémisphérique jusqu'à l'entrée du micropuits et le régime de diffusion linéaire à l'intérieur (Figure 22). Ainsi, considérant un micropuits de profondeur H , le régime de diffusion linéaire est susceptible de s'opérer pour de grandes vitesses de balayage (Figure 22D). Finalement, considérant un réseau de micropuits instrumentés, et quelle que soit la vitesse de balayage, deux facteurs contribuent au régime de diffusion observé : la distance centre-à-centre (d) et la profondeur de l'encastrement (H).

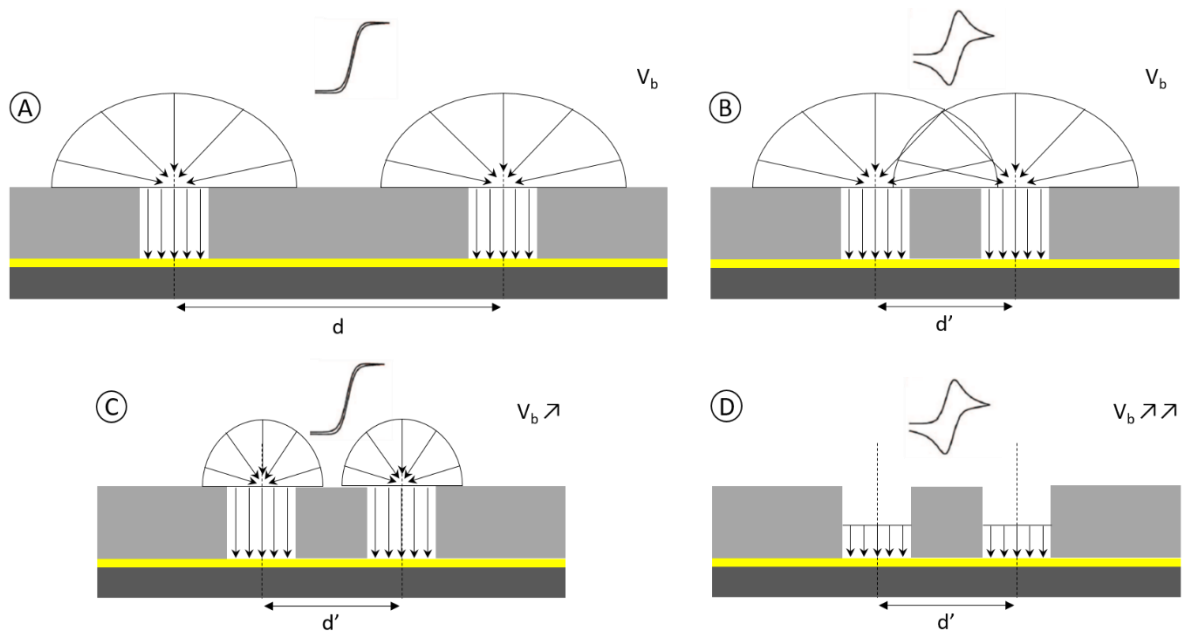


Figure 22 Influences de la distance centre-à-centre (d) et de la vitesse de balayage (V_b) sur les régimes diffusifs considérant des UME disques encastrés d'une profondeur constante H .

Afin d'assurer le régime de diffusion hémisphérique en se passant de mener cette étude, on pourrait imposer un critère comme $d \geq 10\delta_{théorique}$. Cependant, le futur dispositif devra permettre un couplage de l'analyse électrochimique avec l'analyse optique. En microscopie optique, un compromis est toujours fait entre la valeur du grossissement et la distance de travail. Autrement dit, pour effectuer un zoom, l'objectif s'approche de la surface d'intérêt et le champ de vision (selon les axes x et y) réduit. Finalement, l'objectif de cette étude est de déterminer la distance centre-à-centre (d) minimale assurant un régime de diffusion hémisphérique, pour des vitesses de balayages comprises entre $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, ceci dans l'optique de maximiser la densité des micropuits dans le cadre d'observations au microscope. Au-delà de $V_b = 500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, on entre dans la situation décrite par la figure 22D.

Dans un premier temps, ce problème a été traité *via* un modèle de simulation 2D, en s'inspirant fortement de la méthode décrite par Lavacchi et al. [10]. La seule différence avec le modèle considérant un puits unique, est la limitation de l'espace de diffusion selon l'axe horizontal. Précédemment, l'espace de diffusion était un carré de coté z_{max} , cette fois il prend la forme d'un rectangle de longueur z_{max} et de largeur R_0 . Le paramètre R_0 reflète la distance centre-à-centre (d), en prenant en compte la configuration du réseau : matricielle ou concentrique, telle que le montre la figure 23.

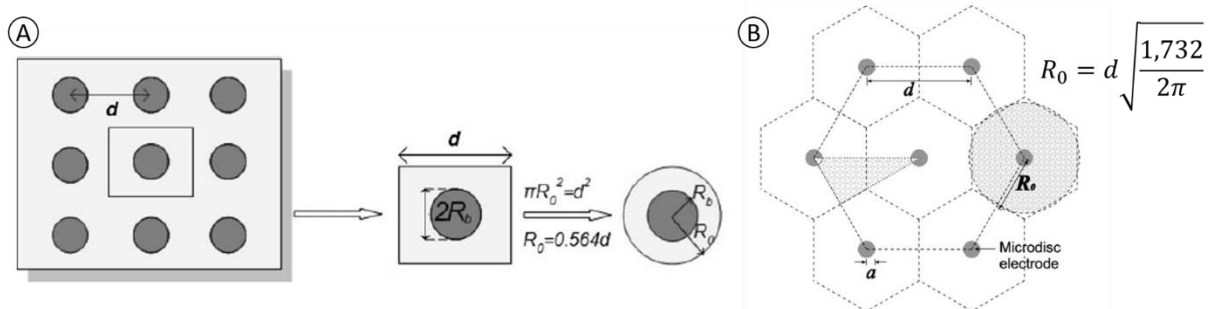


Figure 23 Prise en compte de la distance centre-à-centre par l'intermédiaire du paramètre R_0 dans un modèle de simulation 2D selon la configuration du réseau : matricielle (A), ou concentrique (B).

Etant donné que la première génération des dispositifs ElecWell présente une configuration matricielle, nous considérerons par la suite :

$$R_0 = 0,564d \quad (\text{Equation 31})$$

A vrai dire, ce type d'approche n'est pas tout à fait fidèle à la réalité. En effet, limiter l'expansion de la couche de diffusion selon l'axe horizontal revient finalement à considérer un double encastrement (cf III.2 et III.3), où le rayon externe (r_2) est égal à la distance centre-à-centre (d ou R_0), et où la hauteur de la partie supérieure (H_1) tend vers l'infini. Par comparaison avec un modèle 3D, où la couche de diffusion peut s'étendre dans toutes les directions, un modèle 2D considérant un puits unique favorise l'apparition de régime de diffusion linéaire et l'expansion de la couche selon l'axe vertical.

Pour vérifier ces dires, les deux modèles de simulation doivent être mis en œuvre. Pour ce faire, une maille élémentaire du réseau de micropuits disposés matriciellement (figure 23A) est définie au sein d'un espace de diffusion prenant cette fois la forme d'un cylindre de hauteur z_{max} et de rayon z_{max} . Les contraintes sur le maillage demeurent identiques au modèle 2D, si ce n'est que les mailles prennent la forme de tétraèdres au lieu de triangles. Enfin, les conditions aux limites et les réactions se déroulant aux électrodes sont strictement identiques entre les deux modèles. Evidemment, dans ces conditions le temps de simulation est très largement supérieur à celui du modèle 2D.

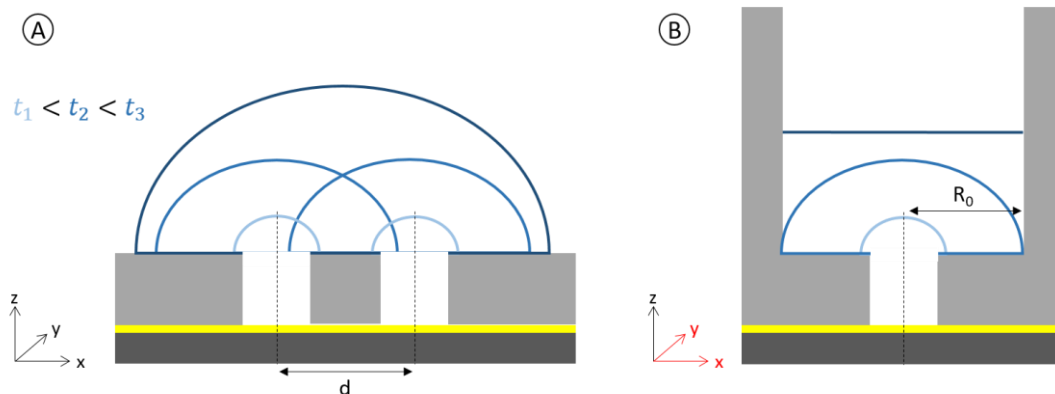


Figure 24 Schéma de l'évolution de la couche de diffusion au cours du temps selon le modèle de simulation considéré (A) : modèle 3D, (B) : modèle 2D.

Avant d'étudier les différents régimes diffusionnels, on s'attarde à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'épaisseur de la couche de diffusion croît plus rapidement dans le modèle 2D que dans le modèle 3D. Pour ce faire, on se place dans des conditions où le chevauchement des couches de diffusion (Figure 22B) doit avoir lieu. Ainsi, on pose : $d = 5r_1$. A $t = 0$, l'anneau est polarisé pour entraîner l'oxydation du ferrocène à sa surface. Pour rappel, il est impossible d'atteindre le régime stationnaire en régime de diffusion linéaire, c'est-à-dire que la couche de diffusion croît continuellement selon la racine carrée du temps. Pour les deux modèles, on suspend la simulation à $t = 1$ s, et on trace les profils de concentration du ferrocène selon l'axe vertical (au centre du puits) afin de déterminer, comme dans la partie IV.1, la valeur de δ à cet instant précis.

A $t = 1$ s, on a : $\delta_{2D} = 17,5 \mu\text{m}$, $\delta_{3D} = 12,6 \mu\text{m}$, donc $\delta_{2D} > \delta_{3D}$.

Ce résultat démontre bien que les deux modèles ne sont pas équivalents.

Etudions maintenant la forme des voltamogrammes obtenus pour $d = \{5R ; 10R ; 20R\}$, avec $V_b = \{5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 500\} mV$.

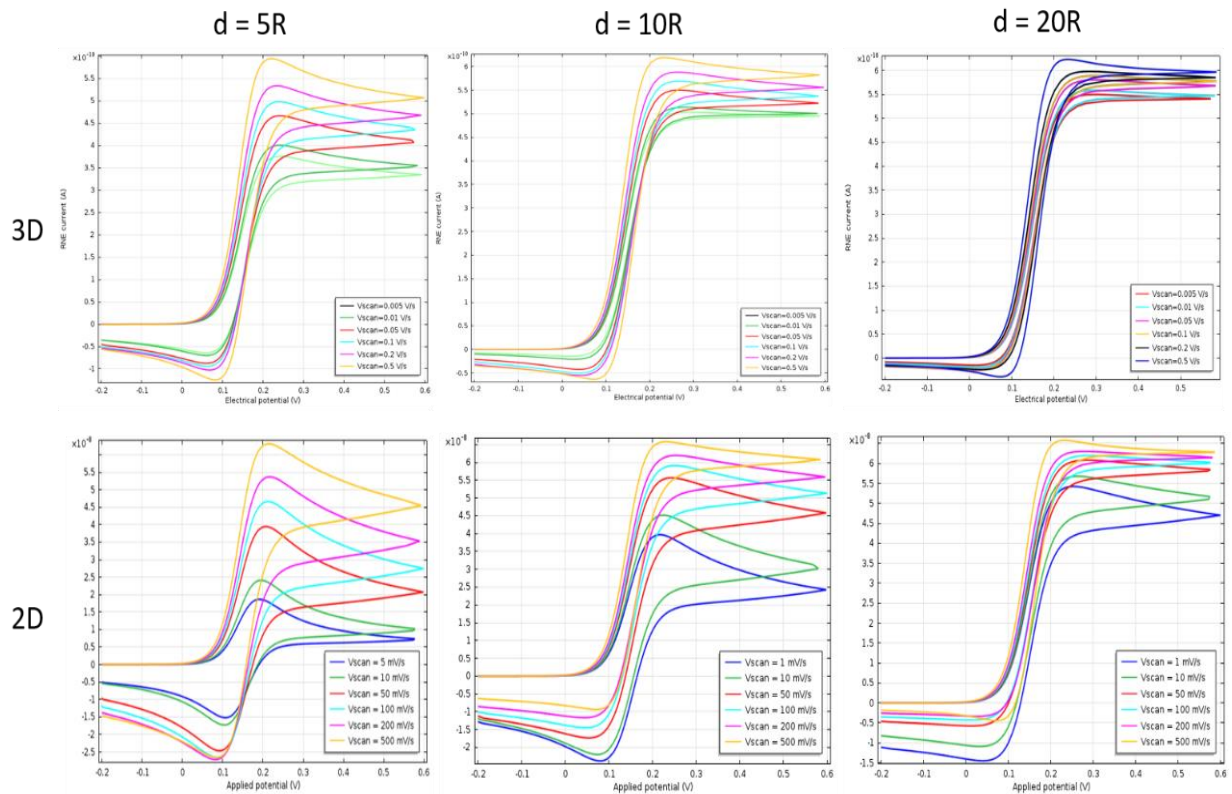


Figure 25 Voltamogrammes issus de la simulation des modèles 2D et 3D. Evaluation des régimes diffusionnels en fonction de la distance centre-à-centre (d) pour des vitesses de balayages comprises entre $5 mV.s^{-1}$ et $500 mV.s^{-1}$.

Ces résultats démontrent une nouvelle fois que le modèle 2D favorise l'apparition du régime de diffusion linéaire par la limitation de l'expansion de la couche de diffusion selon l'axe horizontal. De plus, comme δ augmente plus rapidement en 2D qu'en 3D, le courant résultant de la réaction à l'électrode est sous-estimé par le modèle 2D (en régime de diffusion linéaire). Enfin, ces résultats montrent que pour des vitesses de balayages allant jusqu'à $500 mV.s^{-1}$, le régime de diffusion de type hémisphérique est assuré pour $d \geq 20r_1$. La figure 26 permet de visualiser les profils des couches de diffusion en fonction de l'espacement des micropuits.

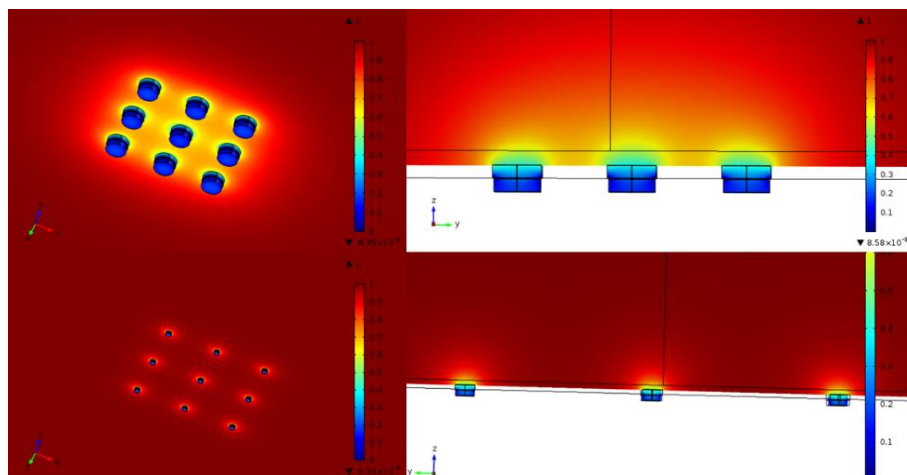


Figure 26 Vue 3D et coupe 2D représentation la concentration en ferrocène diméthanol dans le cadre de son oxydation à la surface de l'électrode annulaire, pour deux valeurs de distance centre-à-centre : 5R et 20R.

Conclusion

Nous avons donc décidé de s'orienter vers la solution des micropuits instrumentés. Une telle structure permet d'isoler spatialement les éléments biologiques les uns des autres, permettant d'envisager l'analyse multiplexée d'un grand nombre d'entre eux à l'échelle individuelle. Un modèle théorique a été développé pour déterminer le courant limite d'une électrode prenant la forme d'un anneau ou d'un disque au sein d'un double encastrement. Ensuite, la structure du micropuits a été modélisée dans un logiciel de calcul par éléments finis. Ce modèle a permis de déterminer la meilleure géométrie en vue de profiter du confinement pour maximiser la valeur du taux de collecte. Considérant cette fois la configuration en réseau, la simulation a permis de définir la distance centre-à-centre minimale garantissant un régime de diffusion de type hémisphérique aux électrodes. Enfin, le courant limite attendu dans le cadre de l'oxydation du ferrocène diméthanol a été déterminé en appliquant le modèle théorique et le modèle de simulation. La cohérence des résultats nous donne une indication précise sur la valeur du courant limite devant être obtenue expérimentalement, considérant trois différentes valeurs de rayons : 1,5 μm , 3 μm et 4,5 μm . Le chapitre suivant expose le travail réalisé en salle blanche menant à la fabrication des réseaux de micropuits instrumentés.

Bibliographie

- [1] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed. New York: Wiley, 2001.
- [2] F. Miomandre, S. Sadki, P. Audebert, and R. Méallet-Renault, *Électrochimie - 3e édition: Des concepts aux applications - Cours et exercices corrigés*. Dunod, 2014.
- [3] K.-H. Lubert and K. Kalcher, “History of Electroanalytical Methods,” *Electroanalysis*, vol. 22, no. 17–18, pp. 1937–1946, Sep. 2010.
- [4] K. Aoki, “Theory of ultramicroelectrodes,” *Electroanalysis*, vol. 5, no. 8, pp. 627–639, 1993.
- [5] Y. SAITO, “A theoretical study on the diffusion current at the stationary electrodes of circular and narrow band types,” *Rev. Polarogr.*, vol. 15, no. 6, pp. 177–187, 1968.
- [6] M. Gabi, T. Sannomiya, A. Larmagnac, M. Puttaswamy, and J. Vörös, “Influence of applied currents on the viability of cells close to microelectrodes,” *Integr Biol*, vol. 1, no. 1, pp. 108–115, 2009.
- [7] H. H. Girault, *Electrochimie physique et analytique*. PPUR presses polytechniques, 2007.
- [8] A. Szabo, “Theory of the current at microelectrodes: application to ring electrodes,” *J. Phys. Chem.*, vol. 91, no. 11, pp. 3108–3111, 1987.
- [9] J. Guo and E. Lindner, “Cyclic Voltammograms at Coplanar and Shallow Recessed Microdisk Electrode Arrays: Guidelines for Design and Experiment,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 1, pp. 130–138, Jan. 2009.
- [10] A. Lavacchi, U. Bardi, C. Borri, S. Caporali, A. Fossati, and I. Perissi, “Cyclic voltammetry simulation at microelectrode arrays with COMSOL Multiphysics®,” *J. Appl. Electrochem.*, vol. 39, no. 11, pp. 2159–2163, Nov. 2009.
- [11] P. Liljeroth, C. Johans, C. J. Slevin, B. M. Quinn, and K. Kontturi, “Micro ring–disk electrode probes for scanning electrochemical microscopy,” *Electrochem. Commun.*, vol. 4, no. 1, pp. 67–71, 2002.
- [12] E. O. Barnes, G. E. M. Lewis, S. E. C. Dale, F. Marken, and R. G. Compton, “Generator-collector double electrode systems: A review,” *The Analyst*, vol. 137, no. 5, p. 1068, 2012.
- [13] A. Oleinick, J. Yan, B. Mao, I. Svir, and C. Amatore, “Theory of Microwell Arrays Performing as Generators-Collectors Based on a Single Bipolar Plane Electrode,” *ChemElectroChem*, vol. 3, no. 3, pp. 487–494, Mar. 2016.

Chapitre 4

Fabrication des Microdispositifs Électrochimiques et du Système Associé

Introduction : le système ElecWell de première génération

Avant d'aller plus loin, il convient de décrire les travaux effectués dans le cadre du projet NANOMITO (ANR-11-BSV5-0025). Ce projet, portant sur le développement de technologies innovantes pour l'analyse de la fonction mitochondriale, s'est déroulé sur 36 mois à partir de février 2012. Il a impliqué trois partenaires principaux : l'équipe NsysA de l'institut des sciences moléculaires de Bordeaux (ISM), l'équipe « Cell Energetic Metabolism » de l'institut de biochimie et génétique cellulaires de Bordeaux (IBGC), et l'équipe MICA du laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes de Toulouse (LAAS). Le projet MITAML profite donc directement des développements réalisés pendant cette période.

Les objectifs majeurs des travaux effectués par le Dr. Fadhila Sekli-Belaïdi (chercheur post-doctoral, de février 2014 à février 2015) au LAAS étaient au nombre de deux : définir le procédé de fabrication (preuve de faisabilité), et vérifier expérimentalement que les performances électrochimiques des dispositifs fabriqués sont conformes avec la théorie [1]. Pour ce faire, une première sélection de matériaux a été définie, ainsi que les techniques de fabrication associées. Plusieurs configurations de réseaux ont été réalisées, dans le but de pouvoir étudier expérimentalement les profils des couches de diffusion en fonction de la distance centre-à-centre. Finalement, les dispositifs ont été appliqués à l'analyse du métabolisme mitochondries isolées à partir de levure du boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*). Les résultats obtenus ont permis d'identifier l'ensemble des verrous à lever dans le cadre de la conception de la seconde génération des dispositifs ElecWell.

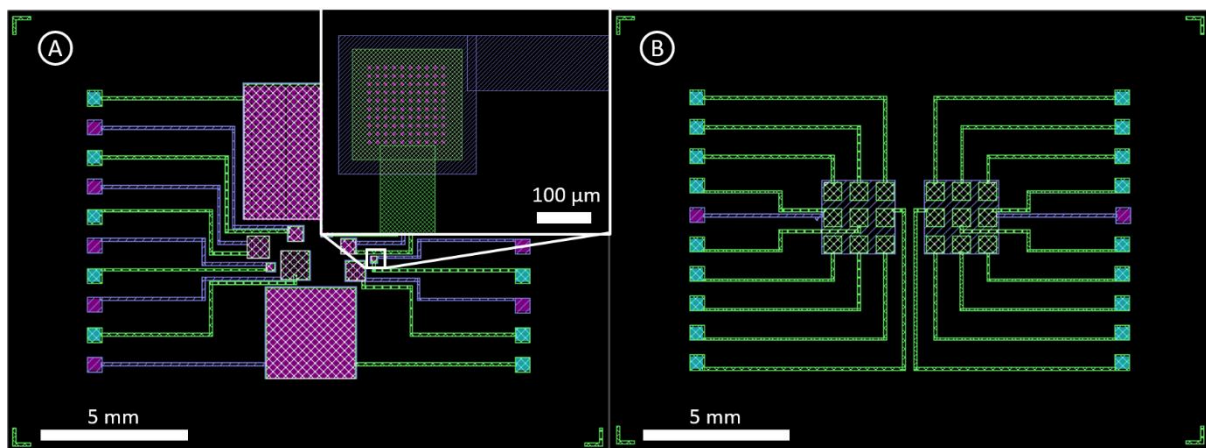


Figure 1 Conception de la première génération des dispositifs ElecWell.

La figure ci-dessus (Figure 1) présente les masques de photolithographie utilisés mais aussi et surtout la configuration des dispositifs de première génération. Les puces, de dimensions 15 mm x 20 mm, présentent soit différents réseaux de micropuits instrumentés (Figure 1A), soit des puits adressables individuellement (Figure 1B). Sur toutes les puces on trouve des puits de 3 µm de rayon et des puits de 4,5 µm de rayon. La puce de gauche (Figure 1A), contient des réseaux dont le nombre de puits (N), et la distance centre-à-centre (d) varient. On a : $N = 100$ ou $N = 10000$, et d prend une valeur parmi $\{5R ; 10R ; 15R ; 20R\}$. Concernant les autres dimensions, elles sont celles définies par la simulation⁸,

⁸ Stages de Matthieu Polverel et de William Tiddi.

en accord avec les contraintes technologiques identifiées, soit pour rappel : $H_1 = H_2 = 2,5 \mu\text{m}$ et $e = 200 \text{ nm}$. Les contraintes technologiques découlent directement des matériaux sélectionnés et des techniques associées. En attendant de les décrire précisément, la figure 2 présente les matériaux utilisés pour la fabrication des composants ElecWell de première génération.

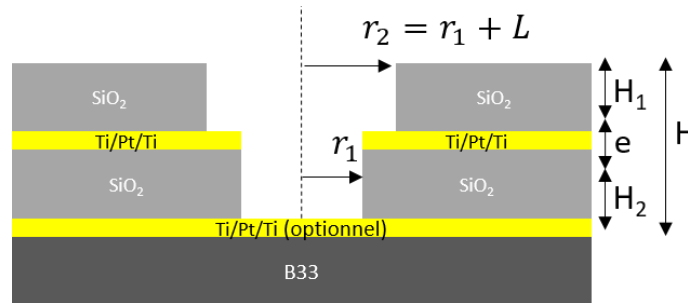


Figure 2 Paramètres géométriques et matériaux utilisés dans le cadre de la fabrication de la première génération des dispositifs ElecWell.

Le matériau d'électrode, le platine (Pt), est opaque. Pour cette raison, la présence d'une électrode disque formant le fond du puits (DME) est rendue optionnelle : on choisira une puce avec DME dans le cadre de l'évaluation expérimentale du taux de collecte, alors qu'un dispositif sans DME sera privilégié lorsque le couplage avec l'analyse optique s'avérera nécessaire, c'est-à-dire lors d'expériences impliquant des mitochondries isolées. La figure suivante (Figure 3) montre des images prises au microscope électronique à balayage (MEB) des dispositifs ElecWell de première génération à l'issue du procédé de fabrication. On remarque la présence de la marche dont la longueur (L) vaut approximativement 300 nm .

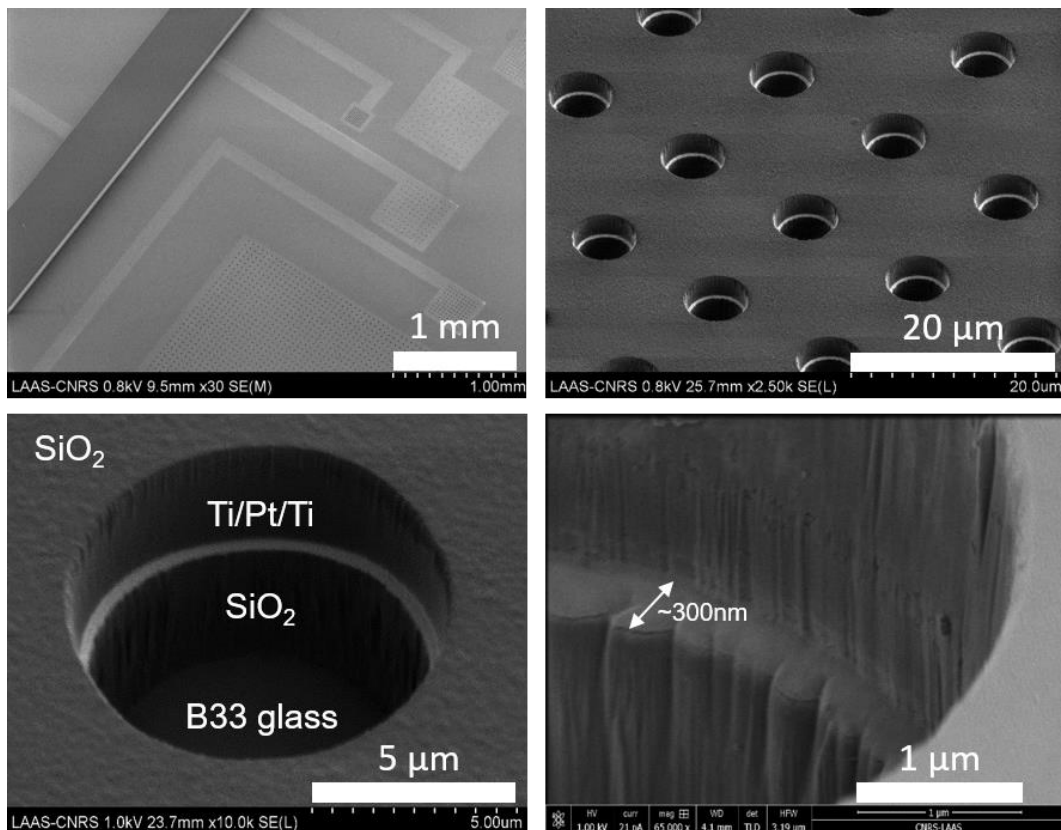


Figure 3 Observations au microscope électronique à balayage d'une puce ElecWell de génération 1 finalisée.

Une fois les performances électrochimiques validées expérimentalement, ces dispositifs furent appliqués à l'analyse de l'activité métabolique de mitochondries issues de levures. La figure 4 montre le dispositif assemblé, et donne une idée de la configuration expérimentale mise en œuvre lors de ces premiers essais.

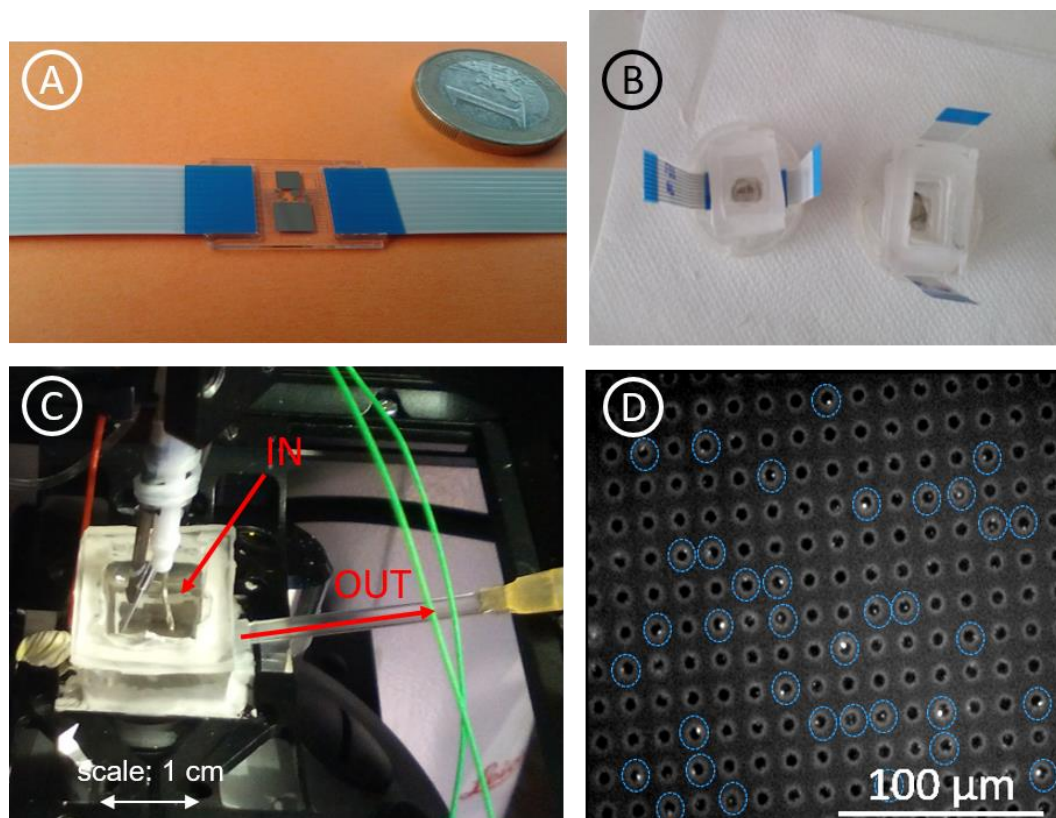


Figure 4 Usage des dispositifs de génération 1 pour l'analyse couplée optique/électrochimie de l'activité métabolique de mitochondries isolées à partir de levures. A : puce ElecWell de génération 1 assemblée. B : report d'une cuve fluïdique en PDMS sur la puce. C : montage expérimental sur microscope de fluorescence avec deux électrodes externes plongées dans la cuve fluïdique. D : mitochondries isolées observées par l'autofluorescence du NADH (vue face arrière).

Les dispositifs de première génération ayant été conçu avec l'objectif principal de mener des études sur les performances électrochimiques d'une telle structure, comme l'influence de la distance centre-à-centre, ceux-ci ne sont pas forcément adaptés à la manipulation d'éléments biologiques. Tout d'abord, l'absence d'une contre-électrode et d'une électrode de référence intégrées oblige à travailler en configuration « chambre ouverte », afin de pouvoir plonger en solution des électrodes sous forme de tiges (Figure 4C). Ensuite, la présence de dix réseaux sur une seule et même puce sous-entend vingt prises de contacts (si la DME est présente), donc l'usage de deux câbles de dix contacts de part et d'autre de la puce. Cette connectique, de 5 cm de longueur, (Figure 4A, B) ne facilite pas la mise en œuvre expérimentale, c'est-à-dire le positionnement de la puce sur le microscope, la mise en place d'une cuve fluïdique (sans fuites) et le raccordement à l'appareil de mesure : le potentiostat. Enfin, la méthode de remplissage, consistant à remplir la cuve à l'aide d'une pipette par le dessus, à patienter une vingtaine de minutes en laissant les mitochondries sédimenter, puis à vider le surplus de solution à l'aide d'une seringue *via* la sortie dédiée, est loin d'être optimal. En effet, même en effectuant plusieurs remplissages successifs, le taux de remplissage moyen des micropuits par une ou plusieurs mitochondries, ne dépassait pas 20% (Figure 4D). La figure suivante (Figure 5) présente les résultats obtenus par voie électrochimique avec des réseaux de 10^6 puits (Figure 5 A et B) ou 10^4 puits (Figure 5C).

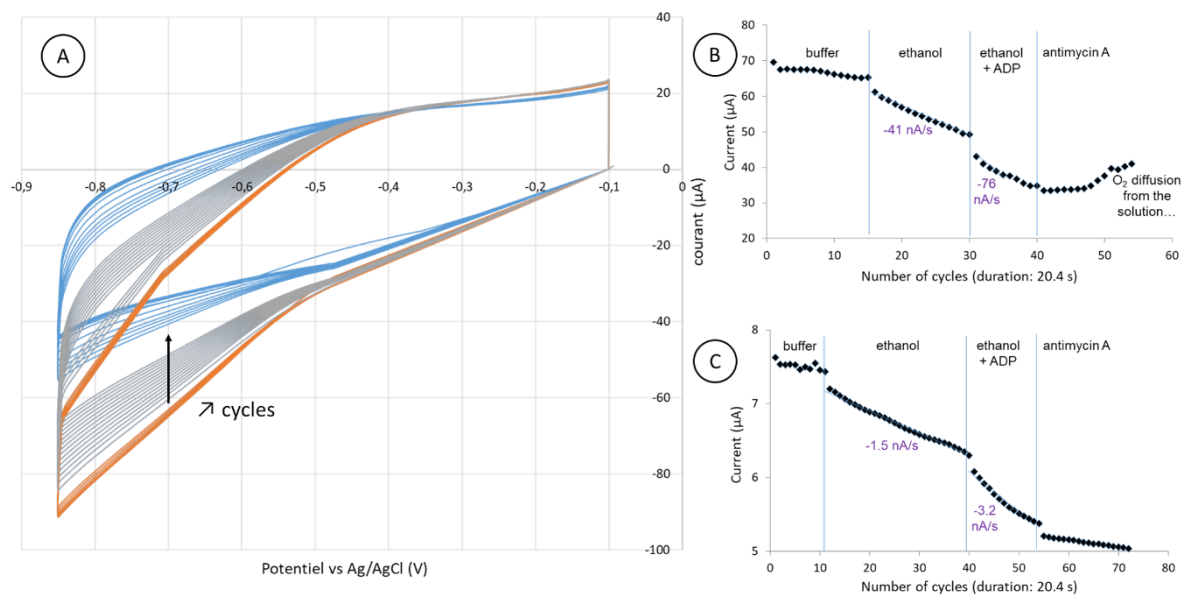


Figure 5 Détection par voie électrochimique de la respiration mitochondriale en fonction d'ajouts de substrats et inhibiteurs de l'ETC. A : Exemple de résultat brut obtenu par voltamétrie cyclique. B : courbe refétant la variation de la concentration en oxygène dissout au cours du temps (un cycle correspond à 20,4s) $N = 10^6$. C : courbe refétant la variation de la concentration en oxygène dissout au cours du temps (un cycle correspond à 20,4s) $N = 10^4$.

Comme le volume de la cuve est relativement important (3 ml), à chaque ajout la mesure est interrompue et des aller-retours sont effectués à la pipette pour homogénéiser le milieu par convection forcée. A chaque cycle (Figure 5A), on extrait la valeur du courant mesurée à -0,7 V vs Ag/AgCl pour construire les courbes de droite, représentant la variation de la concentration en oxygène dissout au cours du temps.

En fin d'expériences, des observations de la face avant du dispositif ont permis de mettre en évidence l'inefficacité des rinçages effectués, puisqu'une forte quantité de mitochondries demeurait visible en surface. Si ces mitochondries (invisibles par la face arrière) sont situées en dehors des couches de diffusions liées à la polarisation des RNEs, alors leur influence sur le signal mesuré est limitée. Par contre, si elles sont situées à l'intérieur des couches de diffusions, leur activité influence directement le courant mesuré, compromettant fortement la normalisation de la mesure et remettant en cause l'intérêt des micropuits. Car sans normalisation précise, les résultats obtenus ne seront jamais exploitables par des biologistes.

Pour résumer, voici une liste, par ordre de priorité, des huit exigences identifiées dans le cadre de la conception de la prochaine génération des dispositifs ElecWell :

- 1 – Ajouter une contre-électrode et une électrode de référence sur la puce, afin d'obtenir une cellule électrochimique à trois électrodes tout intégrée, donc autonome, facilitant le travail en configuration « chambre fermée ».
- 2 – Mettre en place un système fluïdique complet, pour un meilleur contrôle de la manipulation des éléments biologiques et des concentrations des substances ajoutées en cours d'analyse. La fluïdique devra assurer un flux laminaire pour maximiser l'efficacité des rinçages (évacuation des mitochondries interférentes).

- 3 – Rendre l'ensemble parfaitement compatible avec une large gamme de microscopes.
- 4 – Favoriser l'augmentation du taux de remplissage par le guidage et/ou l'immobilisation des mitochondries au fond des puits.
- 5 – Mettre en œuvre une solution efficace pour limiter au maximum la sédimentation de mitochondries sur la surface inter-puits.
- 6 – Permettre de régler la température du fluide (typiquement à 37 °C).
- 7 – Réduire la valeur du rayon du puits à 1,5 μm pour limiter le nombre de mitochondries susceptibles d'y entrer et augmenter légèrement la valeur du taux de collecte (+ 5%).
- 8 – Modifier la surface de l'électrode de travail pour gagner en sensibilité et/ou sélectivité.

Le quatrième chapitre, dédié à la fabrication des dispositifs ElecWell de deuxième génération et au système associé, répondra en partie à ces nouvelles exigences.

I Le système ElecWell de seconde génération

I.1 Adapter le microsysteme à une solution commerciale

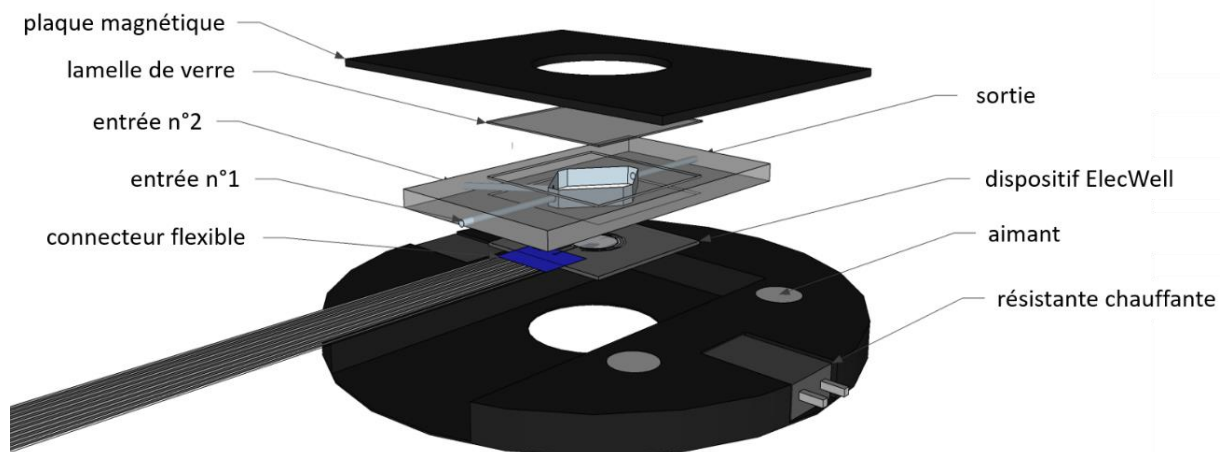


Figure 6 Vue d'artiste du système ElecWell de seconde génération.

Le premier choix de conception consiste à rendre la future puce compatible avec un système commercial proposé par la société Warner Instruments (Figure 6). Ce système, initialement dédié au suivi de l'évolution de cultures cellulaires par microscopie au cours du temps, comprend une plateforme (référence : PM-2) de microscopie, dont la température est contrôlée à l'aide de deux résistances chauffantes, ainsi qu'une chambre fluide (référence : RC-21B) comprenant deux entrées et une sortie. La chambre fluide est formée à l'aide de deux lamelles de microscopie disposées de part et d'autre

de la chambre en polycarbonate. L'idée consiste à remplacer la lamelle formant la base de la chambre par la future puce ElecWell, ce qui impose une contrainte sur ses dimensions : la future puce devra prendre la forme d'un carré de 22 mm de côté. Généralement, quand un microcapteur est intégré dans une fluidique, celle-ci est scellée de manière permanente, l'exemple le plus courant étant le collage irréversible du PDMS [2]. L'avantage principal d'utiliser une fluidique non-permanente est la possibilité d'effectuer certaines étapes en son absence, comme des caractérisations et des fonctionnalisations, mais aussi et surtout des étapes de nettoyages relativement agressives comme un bain à ultrasons ou un plasma oxygène [3], permettant à la fois de rétablir les états de surfaces initiaux des électrodes et de limiter les risques de contaminations. Enfin, choisir d'adapter la puce à une solution commerciale permet non seulement de répondre aux problématiques liées à la gestion des fluides et à la thermorégulation mais aussi et surtout, d'assurer la compatibilité du système complet avec une large gamme de microscopes (Nikon, Olympus, Leica et Zeiss).

I.2 Définition de la nouvelle structure du micropuits

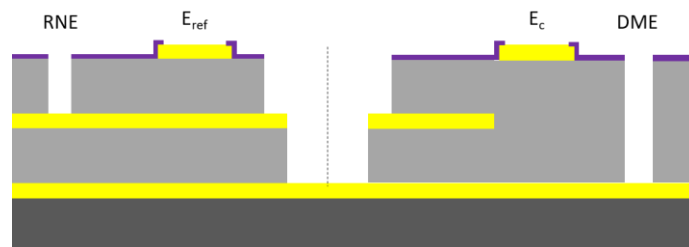


Figure 7 Définition de la structure des micropuits de deuxième génération

La structure de la seconde génération reste à peu de choses près celle de la première. Deux électrodes planaires, communes à l'ensemble des puits présents sur la puce, sont ajoutées. Cela sous-entend l'utilisation d'un matériau supplémentaire, servant à l'étape dénommée « passivation ». En effet, pour récupérer le contact électrique d'électrodes surfaciques, une piste électrique doit faire le lien entre l'électrode et l'appareil de mesure. L'étape de passivation consiste à déposer un matériau isolant (en violet sur la figure 7), afin de définir précisément la surface active de l'électrode, celle où se dérouleront les réactions électrochimiques. Si la piste électrique n'est pas isolée, alors elle se comportera de la même manière que l'électrode, ce qui n'est absolument pas souhaitable. L'autre principal changement par rapport à la première génération de capteurs, est la présence obligatoire de l'électrode disque encastrée (DME). En plus de permettre la détermination expérimentale du taux de collecte, une électrode de ce type offre de nombreuses possibilités dans le cadre du guidage et/ou de l'immobilisation des mitochondries dans le puits. Pour autant, il reste nécessaire d'être en mesure d'évaluer le taux de remplissage des micropuits *via* des observations au microscope optique en face arrière. Cela impose une contrainte sur le matériau constituant la DME : il doit être transparent.

I.3 Matériaux isolants

La première étape d'un procédé technologique réalisé en salle blanche est toujours la même : le choix du substrat. Le substrat constitue le support sur lequel seront déposés les différents matériaux en vue de réaliser une fonction spécifique. Le substrat prend généralement la forme d'une plaquette, c'est-à-dire d'un disque présentant un méplat, dont l'épaisseur est rigoureusement contrôlée. En recherche, les

plaquettes utilisées font deux, quatre ou six pouces de diamètre, alors que leur taille est maximisée dans l'industrie pour réduire les coûts de production. Dans la salle blanche du LAAS-CNRS, les équipements sont particulièrement adaptés à des plaquettes de quatre pouces. Nous nous sommes donc naturellement orientés vers cette solution. Par ailleurs, puisque les fonds des micropuits doivent être transparents, le substrat doit lui-même être transparent. Le choix s'est posé entre les plaquettes en verre de type Borosilicate 33 et ceux en silice fondue, deux épaisseurs étant disponibles : 500 μm ou 1 mm. Compte tenu qu'en microscopie, les performances sont directement liées à la distance de travail, nous avons privilégié l'épaisseur la plus faible, soit 500 μm . Considérant finalement le prix d'achat, le choix du substrat s'est porté vers une plaquette en verre Borosilicate 33 (ou B33).

L'état de l'art des micropuits instrumentés (Chapitre 2, Tableau 3) montre que l'isolant choisi pour former la structure du micropuits peut être organique ou inorganique [4], [5]. Les matériaux organiques présentent le principal avantage d'autoriser de forts rapports de forme (H/R). Néanmoins, comparés aux matériaux inorganiques (SiO_2 , Si_3N_4 , SiN_x ...), les matériaux organiques (SU-8, PDMS, Polyimide, Parylène, films secs...) sont susceptibles de relarguer des espèces en solution comme de l'antimoine cancérigène [6], posant des doutes quant à leur parfaite biocompatibilité et inactivité électrochimique. De plus, même si les constantes de temps sont longues, certains matériaux organiques absorbent l'eau, ce qui provoque à terme leur gonflement et leur délamination. Le tableau suivant (Tableau 1) présente les principales caractéristiques de plusieurs de ces matériaux en terme de procédés de microfabrication.

Table 1 Caractéristiques des matériaux isolants les plus couramment utilisés en microfabrication, d'après [4].

Material	Deposition technique	Patterning technique	Thickness range (from-to)	Equipment cost	Batch fabrication	Main advantages	Main disadvantages
SiO_2	Physical VD (PVD), CVD	Etching	Tens of nm-a few μm	High	Yes	Compatible to microfabrication tools	Higher temperature gives better quality
Parylene	CVD	Etching	Hundreds of nm-tens of μm	High	Possible	Pinhole-free, very conformal	Patterned by only dry etching
SU-8	Spin-coating	Photolithography	Hundreds of nm-hundreds of μm	Medium	No	High aspect-ratio, enables microfluidic channel fabrication	Stress issues, long baking duration
Dry-film	Lamination	Photolithography	Tens of μm -hundreds of μm	Low	No	Low-cost, independent of substrate shape and dimension	Low resolution, manual processing

Les rapports de formes offerts par le dioxyde de silicium (SiO_2) sont tout à fait adaptés au piégeage de mitochondries isolées⁹, il a donc été retenu pour former la structure du micropuits. Les équipements disponibles en salle blanche du LAAS-CNRS permettent d'effectuer des dépôts de haute qualité pour des épaisseurs allant jusqu'à 5 μm . Au-delà, les contraintes mécaniques induites entre le verre borosilicate et le matériau entraînent une déformation de la plaquette qui compromet sérieusement le reste du procédé de fabrication.

Le troisième matériau isolant sert à l'étape de passivation des électrodes surfaciques. Pour s'assurer d'obtenir des électrodes en accord avec la théorie des UME planaires et éviter de se retrouver dans une configuration d'UME encastrée, la couche de passivation doit être la plus fine possible. Le matériau répondant à cette fonction doit donc présenter des caractéristiques particulièrement performantes en terme d'isolation électrique et d'étanchéité. De plus, il devra conserver ses caractéristiques dans le temps tout en demeurant parfaitement attaché aux matériaux sur lesquels il est déposé : le SiO_2 et le platine. Des travaux ont été menés précisément sur ce thème en 2012 par l'équipe, le choix final se portant sur le dépôt d'une couche de 100 nm de nitrure de silicium (Si_3N_4) [5].

⁹ On pourrait déjà imaginer remplacer ce matériau par du parylène pour aller vers un dispositif ElecWell consacré à l'analyse de la cellule unique.

I.4 Matériaux conducteurs

La microélectrode disque encastrée

Comme évoqué précédemment, la présence d'une électrode disque formant le fond du puits se justifie par la possibilité de déterminer expérimentalement la valeur du taux de collecte, mais aussi par la possibilité de mettre en œuvre diverses stratégies en vue de guider et/ou d'immobiliser les mitochondries au fond des micropuits. Pour ne pas gêner l'évaluation du taux de remplissage des micropuits par des mitochondries et l'analyse optique de leurs réponses, cette électrode doit être transparente dans le spectre visible en plus d'être conductrice. Deux solutions sont disponibles : soit le dépôt d'une couche nanométrique d'or (~ 20 nm), soit le dépôt d'oxydes semi-conducteurs [7]. Malgré son coût élevé étant donné la rareté de l'indium, l'oxyde d'indium-étain (ou ITO) a été sélectionné parmi l'ensemble des oxydes semiconducteurs (exemple : oxydes de zinc dopés à l'aluminium ou au gallium) puisqu'il s'agit du matériau le plus utilisé actuellement pour ce type d'application, ce qui sous-entend que les méthodes de dépôts sont elles aussi répandues et parfaitement maîtrisées, contrairement aux matériaux de substitution. L'ITO est évidemment moins bon conducteur que l'or, mais sa transparence présente de meilleures caractéristiques (Figure 8).

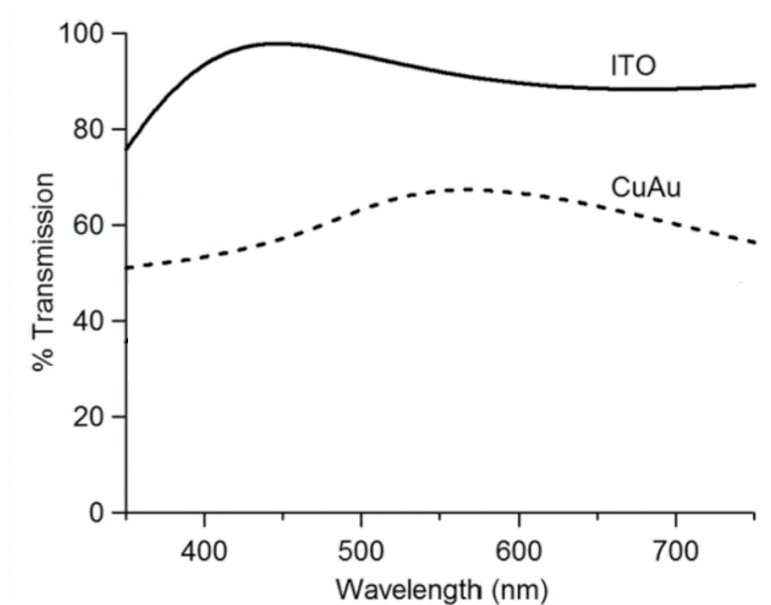


Figure 8 Spectres de transmission dans le visible d'une couche d'ITO d'environ 175 nm et d'une couche cuivre/or 2 nm / 15 nm, d'après [8].

La nanoélectrode annulaire encastrée

La nanoélectrode annulaire encastrée constitue l'électrode de travail de la cellule électrochimique, les caractéristiques du matériau dont elle est constituée vont donc être directement liées aux performances du capteur (gamme de mesure, sensibilité et stabilité essentiellement). Les matériaux conducteurs les plus utilisés en électrochimie pour constituer une électrode de travail sont incontestablement les métaux nobles tels que l'or (Au) et le platine (Pt), viennent ensuite des métaux comme le cuivre ou des alliages comme l'acier inoxydable pour des applications « low-cost ». Le carbone peut aussi être utilisé sous toutes ses formes (diamant, carbone vitreux, nanotubes...), tout comme les gouttes tombantes de mercure (polarographie). Dans le contexte de la microfabrication des micropuits instrumentés (voir

Chapitre 2, Tableau 3), le choix se porte entre l'or et le platine pour des raisons de performances et de compatibilité avec les techniques de fabrications mises en œuvre. Dans le cas particulier de la détection de l'oxygène dissout par réduction à la surface de E_w , le platine se montre plus performant [9]. Considérant cette fois la détection du peroxyde d'hydrogène par oxydation, le platine constitue une base idéale pour un électrodépôt de noir de platine [10], [11], puisque la qualité de l'adhésion d'un matériau sur un autre dépend principalement de leurs structures cristallines. Enfin, le platine est aussi tout à fait adapté si la stratégie de détection de H_2O_2 consiste à immobiliser des enzymes par électropolymérisation. Pour assurer l'adhésion du métal sur le substrat, il est nécessaire d'introduire un matériau supplémentaire servant de sous-couche [12]. Le chrome, le tantale et le titane, sont les matériaux les plus fréquemment utilisés dans le cadre de cette problématique. Ces matériaux ont l'avantage de pouvoir être déposés par les mêmes techniques que les matériaux d'électrode, le tout se faisant en une seule et même étape. Dans notre cas, le titane (Ti) est utilisé pour prendre la RNE de platine en sandwich et assurer son adhésion sur les couches de SiO_2 disposées de part et d'autre.

Les électrodes surfaciques : contre-électrode et électrode de référence

Le rôle de la contre-électrode est simplement de permettre la circulation du courant lié à la réaction se déroulant à la surface de l'électrode de travail. Pour ne pas être limitante, la valeur de la surface de la contre-électrode doit donc être supérieure à celle de l'électrode de travail. C'est finalement le principal critère à prendre en compte.

Le rôle de l'électrode de référence est de présenter un potentiel constant. Des efforts considérables ont été fournis pour miniaturiser des électrodes de références classiques [13], avec l'objectif d'obtenir une cellule électrochimique entièrement miniaturisée capable d'effectuer des analyses en microvolumes. La grande majorité des travaux portent sur la miniaturisation des électrodes de référence $Ag/AgCl/KCl_{sat}$, comportant un métal (Ag) en équilibre avec un de ses composés peu solubles ($AgCl$), le tout immergé dans une solution ionique saturée (ions Cl^-). Il est relativement simple de produire des microélectrodes de pseudo-référence en $Ag/AgCl$ mais elles présentent le défaut d'obéir à la loi de Nernst, autrement dit leur potentiel varie de 58 mV par décade en fonction de la concentration en ions chlorures. Même dans la situation où la concentration en ions chlorures reste constante tout au long de l'analyse, l'immersion de l'électrode en milieux aqueux entraîne la dissolution du sel $AgCl$. Afin de pallier à ce problème, il suffit de régulièrement oxyder l'argent en présence de Cl^- . Néanmoins, la formation de la couche $AgCl$ sous-entend la consommation d'une certaine quantité de l'argent initialement déposé en fines couches ($< 1 \mu m$), ce qui devient dans la plupart des cas limitant, ou au minimum contraignant. Dans certains cas, une solution liquide ou sous forme de gel, comportant l'ion Cl^- en concentration saturée, est déposée à la surface de l' $AgCl$. Si elle est sous forme de gel, elle peut être directement mise en contact avec la solution d'analyse, autrement, un matériau semi-perméable est déposé pour piéger le liquide dans une chambre fermée. Ces solutions complexes manquent de fiabilité sur le long terme. La question actuelle repose sur savoir s'il est théoriquement possible de fabriquer des électrodes de références par une approche classique à l'échelle micrométrique.

En comparaison avec les électrodes de référence conventionnelles, l'électropolymérisation d'un polymère conducteur facilite son intégration en éliminant toutes formes de solutions ioniques. Ce qui leur permet d'ailleurs d'évoluer à des températures élevées et dans des solvants organiques. Ghilane et al. [14] ont décrit la fabrication d'une électrode de quasi-référence basée sur l'électrodépôt de polypyrrole (Ppy) à la surface d'une électrode de platine. Celle-ci fut caractérisée dans divers solvants aqueux ou non. Neuf ans plus tard, Duarte-Guevara et al. [15] ont utilisé ce type de quasi-référence pour

des analyses potentiométriques. Le polypyrrole déposé dans les conditions décrites par Ghilane sur divers matériaux d'électrodes comme l'or, le platine, le cuivre et l'acier inoxydable, a dans tous les cas significativement amélioré la stabilité de leurs potentiels en circuit ouvert. La figure suivante (Figure 9) extraite de leurs travaux, montre que les performances d'une électrode Pt/Ppy présente une stabilité tout à fait comparable avec celle d'une Ag/AgCl classique plongée dans une solution de KCl, la facilité de mise en œuvre en plus. Enfin, si on ne considère plus le dispositif ElecWell seulement comme un capteur chimique, il est important de prendre en compte le fait que l'argent est un bactéricide connu, donc que l'exposition directe des mitochondries à ce matériau est un risque vital [16]–[19].

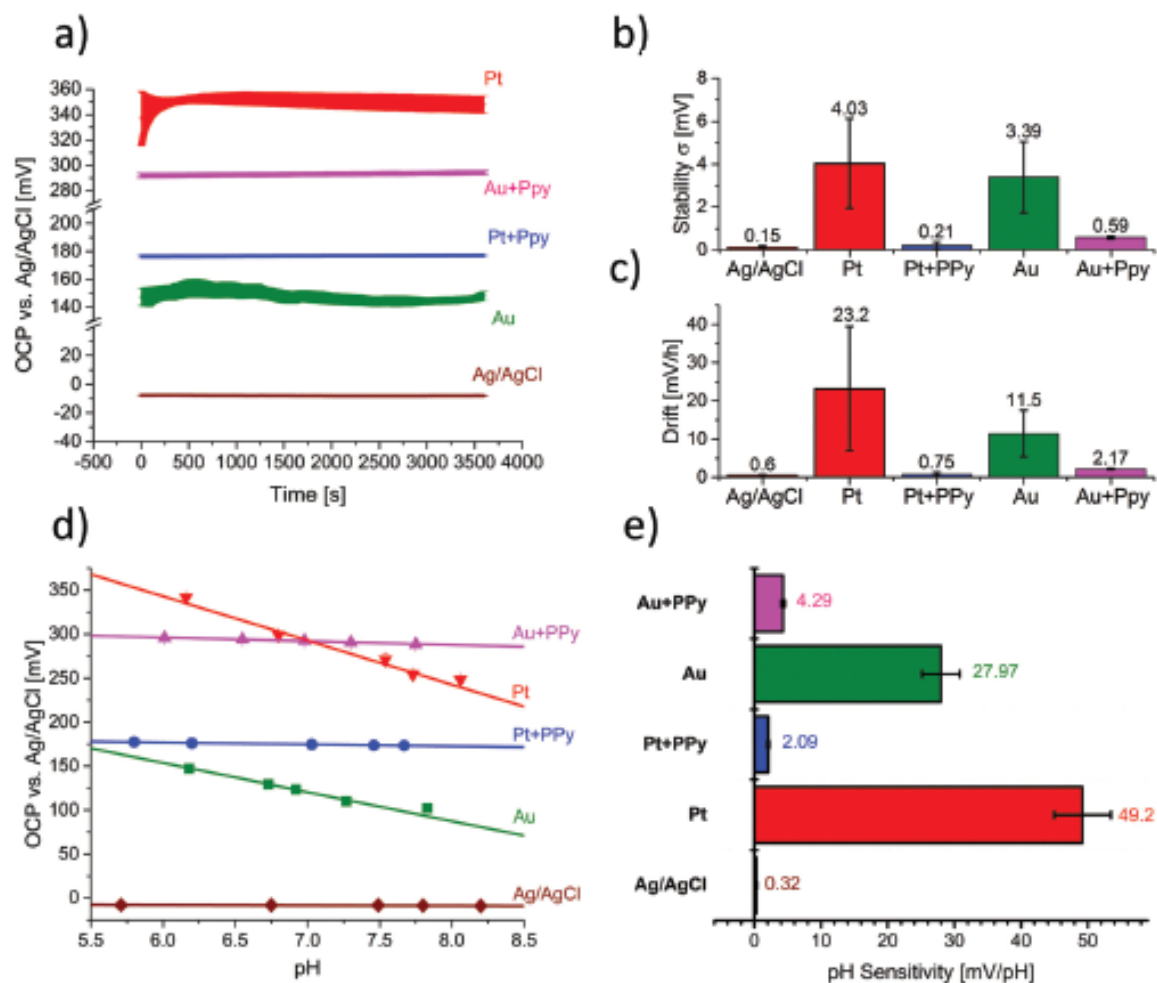


Figure 9 Mesure du potentiel en circuit ouvert (OCP) en fonction du temps et de l'acidité dans une solution de KCl 10 mM, d'après [15]. (a) OCP vs Ag/AgCl. Les bandes représentent trois expériences. Leur épaisseur représente la répétabilité, leurs fluctuations la stabilité. (b) Stabilité, exprimée comme la différence entre OCP_{max} et OCP_{min} . (c) : la dérive du potentiel au cours du temps. (d) OCP en fonction du pH. (e) expression de la sensibilité au pH.

Le choix s'est porté vers la fabrication des deux électrodes planaires en une seule et même étape. Celles-ci sont toutes deux constituées de platine avec une sous-couche en titane. Le platine demeurera nu en ce qui concerne la contre-électrode, tandis qu'il servira de support pour l'électropolymérisation de polypyrrole en ce qui concerne la microélectrode de quasi-référence. Finalement, l'obtention d'une cellule électrochimique à trois électrodes tout intégrée permettra de mener des analyses en microvolumes, minimisant ainsi les conséquences de l'absence de convection lors d'ajouts de substances agissant sur l'activité mitochondriale.

II Techniques de microfabrication associées

II.1 La photolithographie

La photolithographie constitue l'étape centrale d'un procédé de microfabrication car elle permet de définir les formes des matériaux déposés, donc leur fonction finale. Il existe plusieurs variantes mais la méthode la plus répandue est très certainement la lithographie UV. Celle-ci consiste à exposer un polymère photosensible à une lumière ultra-violette (insolation) après l'avoir déposé uniformément à la surface d'une plaquette (enduction). Les polymères, appelés aussi résines, peuvent être qualifiés de positifs ou négatifs. Inspirée de la lithographie classique, mais peut-être plus proche de la technique artistique du pochoir, la photolithographie fait intervenir un masque, afin de définir les zones exposées aux ultraviolets tout comme les zones protégées. Le masque fait de verre et de chrome est quant à lui dessiné à l'aide d'un faisceau d'électrons. Si la polarité de la résine est positive, les zones exposées deviennent solubles, tandis que les zones non-exposées demeurent insolubles une fois la plaquette plongée dans une solution adaptée (développement). A l'inverse, lorsqu'une résine est négative, ce sont les zones non-exposées qui sont solubles. La photolithographie permet ainsi de définir des motifs dont la résolution dépendra de nombreux paramètres comme la longueur d'onde UV, le temps d'exposition, l'épaisseur de la résine, le type de résine, la durée du développement... Une fois les motifs définis dans la résine, l'utilisateur a le choix : soit déposer un ou des matériaux dans les ouvertures créées, soit effectuer une gravure, c'est-à-dire creuser le(s) matériau(x) accessible(s) *via* les ouvertures. On peut alors distinguer les procédés additifs des procédés soustractifs. Dans le cadre de la réalisation d'un composant de microélectronique, ces étapes sont répétées en boucle jusqu'à l'obtention de la fonction désirée. A chaque cycle, le contrôle précis de la superposition des couches est permis par la présence de deux motifs spécifiques : les marques d'alignement, disposées à la périphérie de la plaquette (une à gauche et une à droite).

II.2 Procédés additifs : dépôts de matériaux

Il existe de nombreuses méthodes pour déposer un matériau à la surface d'un substrat [20]. Néanmoins, la très grande majorité dérivent de deux techniques fondamentales : le dépôt chimique en phase vapeur (« CVD ») et le dépôt physique en phase vapeur (« PVD »). De manière générale mais pas systématique la CVD est utilisée pour des dépôts de matériaux isolants, tandis que la PVD est privilégiée pour déposer des métaux (Figure 10).

La CVD consiste à mélanger des composés sous forme gazeuse dans une chambre hermétique en présence d'une ou plusieurs plaquettes, puis à permettre leur dépôt en ajustant les paramètres de vide et de pression. Des réactions chimiques ont lieu entre la surface de la plaquette et le mélange gazeux lors de la formation de la couche déposée, c'est pourquoi la technique porte ce nom. Le plus souvent pour améliorer la qualité du dépôt, ou réduire sa durée, ou encore abaisser la température, un plasma est généré.

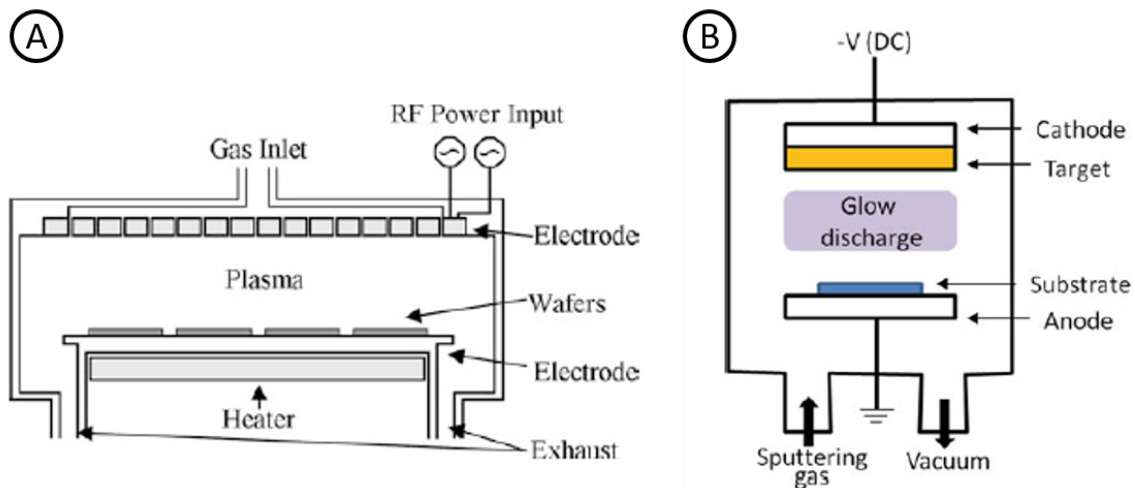


Figure 10 A : description schématique d'une enceinte de PECVD. B : description schématique d'une enceinte PVD par pulvérisation cathodique, d'après [20].

Le plasma désigne l'excitation du mélange gazeux par l'application d'un champ électrique. C'est cette méthode, la PECVD (pour « plasma enhanced chemical vapor deposition », Figure 10A), qui est mise en œuvre lors du dépôt du dioxyde de silicium utilisé pour la fabrication des dispositifs ElecWell, alors qu'une méthode encore plus sophistiquée, l'IC-PECVD (pour « inductively coupled plasma enhanced chemical vapor deposition ») est utilisée pour réaliser des dépôts de couches minces de nitrure de silicium de haute qualité à basse température. La PVD repose quant à elle uniquement sur des phénomènes physiques. Le matériau, souvent métallique, peut être déposé par évaporation ou pulvérisation cathodique. Le principe de l'évaporation est simple, le matériau à déposer est porté à haute température dans une enceinte portée sous vide pour entrer en phase gazeuse et venir se condenser aux surfaces maintenues à température inférieure, soient la plaquette et la surface interne de l'enceinte. La pulvérisation cathodique (Figure 10B) consiste à littéralement bombarder le matériau à déposer. L'application d'un fort champ électrique sous vide permet de générer et de guider des ions vers la cible (le matériau à déposer) qui est située sur la cathode. Les atomes arrachés à la cible vont se déposer sur la surface de la plaquette située sur l'anode. La technique de pulvérisation cathodique est utilisée pour le dépôt de l'ITO, l'évaporation pour ceux du titane et du platine.

II.3 Procédés soustractifs : la gravure et le « lift-off »

Dans tous les cas, les dépôts de matériaux se font sur la plaquette entière. La photolithographie permet de définir les zones qui resteront ancrées à la plaquette, soit de manière préméditée dans le cadre d'un lift-off (Figure 11A), soit post-dépôt s'il s'agit d'une gravure (Figure 11B).

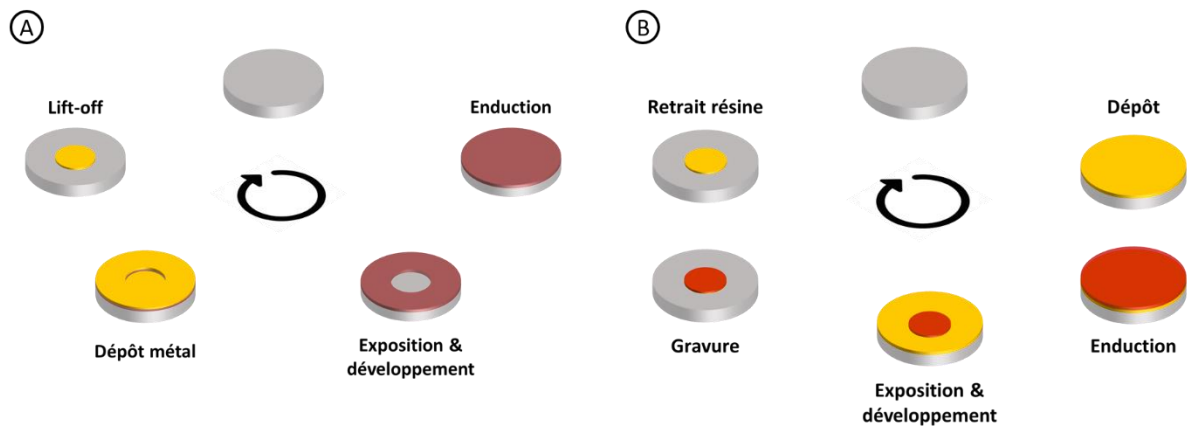


Figure 11 A : description schématique d'une étape de « lift-off ». B : description schématique d'une étape de gravure.

Le lift-off consiste à créer un profil de résine incliné pour la rendre accessible à la solution utilisée lors de son retrait malgré la présence d'un matériau à sa base. De cette façon, le matériau déposé sur la résine se détachera de la surface de la plaquette, définissant ainsi des motifs dans les zones où la résine est absente. Quant à la gravure, elle consiste à effectuer l'étape de photolithographie suite au dépôt pleine plaque du matériau. Cette fois les flancs de résine se veulent droits (90° d'inclinaison) pour offrir le choix entre une gravure sèche unidirectionnelle ou une gravure humide isotrope. La gravure humide consiste à plonger la plaquette dans un bain capable de dissoudre le matériau à graver. La gravure sèche est une méthode relativement similaire au principe de la pulvérisation cathodique, les réactions chimiques en plus. La plaquette est bombardée d'un plasma créé à partir de gaz précurseurs spécifiques au matériau à graver, c'est pourquoi cette technique est aussi appelée gravure ionique réactive ou RIE (pour « reactive ion etching »). Dans notre contexte, la gravure humide est adaptée à l'ouverture des contacts des électrodes annulaires encastrées, car un seul matériau, le SiO_2 , est à graver. Quand on souhaite obtenir des flancs de gravure droits, on privilégie systématiquement la gravure sèche unidirectionnelle, ce qui est le cas pour l'ouverture de la couche de passivation (Si_3N_4), tout comme l'empilement dans lequel seront formés les micropuits ($\text{SiO}_2/\text{Ti}/\text{Pt}/\text{Ti}/\text{SiO}_2$). Autre facteur à prendre en compte : le platine est l'un des matériaux les plus difficiles à graver par voie chimique. Enfin, la gravure servant à former les micropuits sert aussi à récupérer les contacts des DMEs.

III Dessins des masques et réalisation technologique

Une plaquette quatre pouces permet de fabriquer en une seule fois jusqu'à neuf puces de 22 mm de côtés. Cela offre par la même occasion la possibilité de définir jusqu'à neuf configurations différentes. Faisant face à plusieurs incertitudes comme le taux de remplissage des micropuits par les mitochondries ($\geq 20\%$), les flux de consommation d'oxygène et de production de peroxyde d'hydrogène d'une mitochondrie unique, et la possibilité de réduire le diamètre du micropuits à $3 \mu\text{m}$, la décision est prise de définir quatre configurations différentes (Figure 12) :

- puce A1 : sept micropuits de $1,5 \mu\text{m}$ de rayon adressables individuellement ;
- puces B1 et B2 : 10000 micropuits de $3 \mu\text{m}$ de rayon formant un réseau ($d = 20r$) ;
- puces C1, C2 et C3 : deux réseaux de 10000 micropuits de $1,5 \mu\text{m}$ de rayon ($d = 20r$) ;
- puces D1, D2 et D3 : sept réseaux de 100 micropuits de $1,5 \mu\text{m}$ de rayon ($d = 20r$).

A noter que les réseaux de micropuits sont désormais organisés selon des cercles concentriques pour assurer l'homogénéité des lignes de champ. Le procédé de fabrication débute par le dépôt pleine plaque de 370 nm d'ITO par pulvérisation cathodique (PVD), suivi du dépôt pleine plaque de 2,5 μm de dioxyde de silicium par PECVD. Ensuite, cinq étapes de photolithographie sont nécessaires avant de pouvoir sortir les composants ElecWell de seconde génération de la salle blanche. La partie III est organisée selon chacune de ces étapes, avec un focus porté sur les puces de type D.

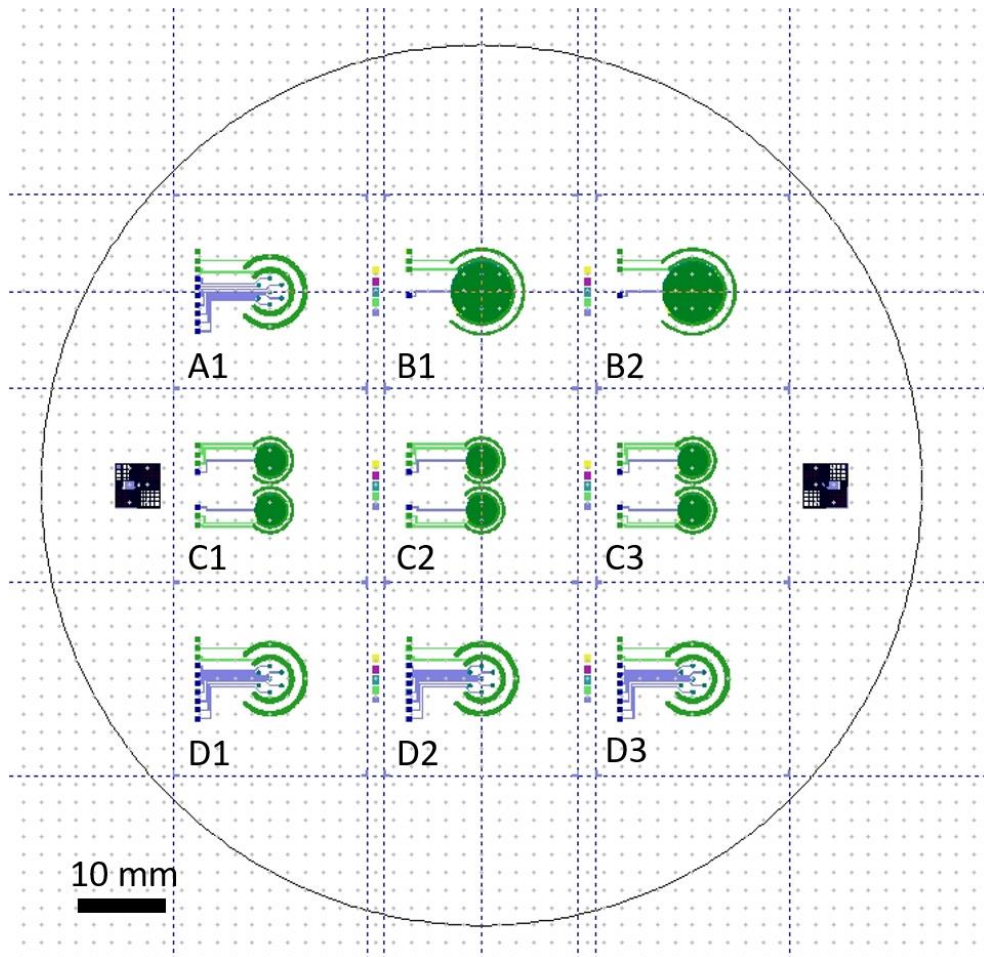


Figure 12 Vue obtenue par superposition des cinq masques de photolithographie. Le trait plein représente les bords d'une plaquette quatre pouces, tandis que les lignes pointillées représentent les lignes de découpe. Les marques d'alignements sont aussi visibles de chaque côté de la plaquette.

III.1 Dépôts d'oxydes et métallisations

La première étape de photolithographie sert à définir dans la résine les zones dans lesquelles un empilement Ti/Pt/Ti 20 nm / 200 nm / 20 nm doit être déposé. Concernant la puce D, ces zones sont : les disques qui seront gravés pour former les sept réseaux de 100 RNE, leurs pistes de connections et leurs prises de contacts (Figure 13). Pour créer un profil de résine incliné nécessaire au bon déroulement du lift-off, deux résines (LOR 3A 350 nm et NLOF 5 μm) sont superposées à l'aide d'une tournette. Suite à l'insolation et au développement, il faut s'assurer par une observation au microscope optique qu'un double trait est visible. Cela signifie que la résine en sous-couche (LOR 3A) est davantage

développée selon l'axe horizontal que celle située au-dessus (NLOF), donc que le profil incliné, ou plutôt son équivalent, est obtenu. Si c'est le cas, alors les trois couches métalliques sont déposées successivement par PVD. Enfin, la plaquette est plongée dans l'acétone ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour retirer la résine restante et les métaux déposés dessus.

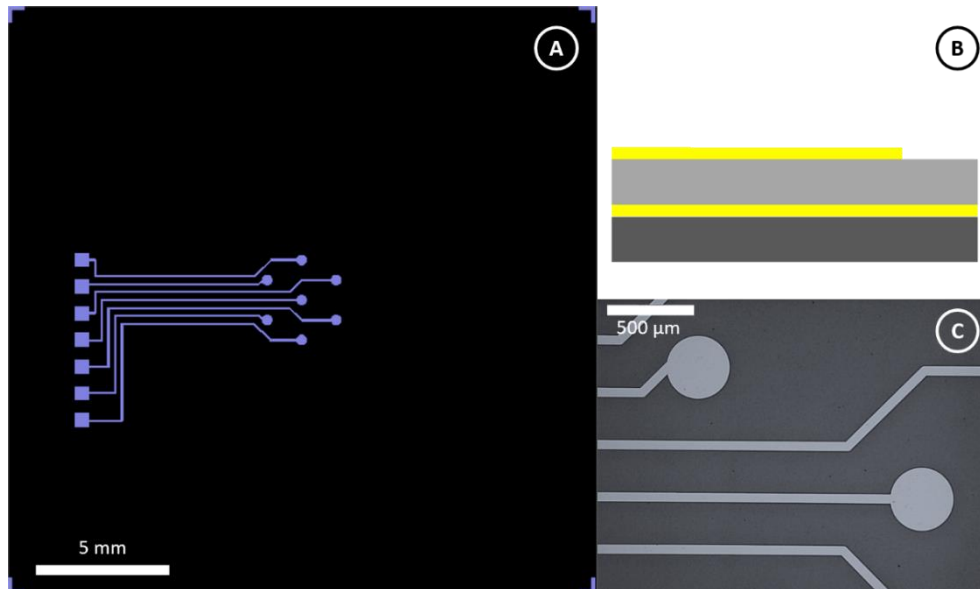


Figure 13 A : représentation du premier masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope optique après lift-off.

Après la première métallisation, une deuxième couche de $2,5 \mu\text{m}$ de SiO_2 est déposée par PECVD sur toute la surface de la plaquette. Ensuite, un nouveau lift-off est réalisé exactement dans les mêmes conditions pour déposer, toujours par PVD, une couche Ti/Pt $20 \text{ nm} / 150 \text{ nm}$ servant à définir la contre-électrode, l'électrode de référence, leurs pistes de connections et leurs contacts (Figure 14). De manière générale il est conseillé de positionner l'électrode de référence proche de l'électrode de travail pour limiter la chute ohmique, au contraire de la contre-électrode que l'on préfère éloignée pour éviter que les produits de la contre-réaction puissent venir interférer avec la réaction se produisant à la surface de l'électrode de travail. Ainsi, l'électrode la plus au centre constitue la future électrode de référence, tandis que celle placée plus à l'extérieur, constitue la future contre-électrode.

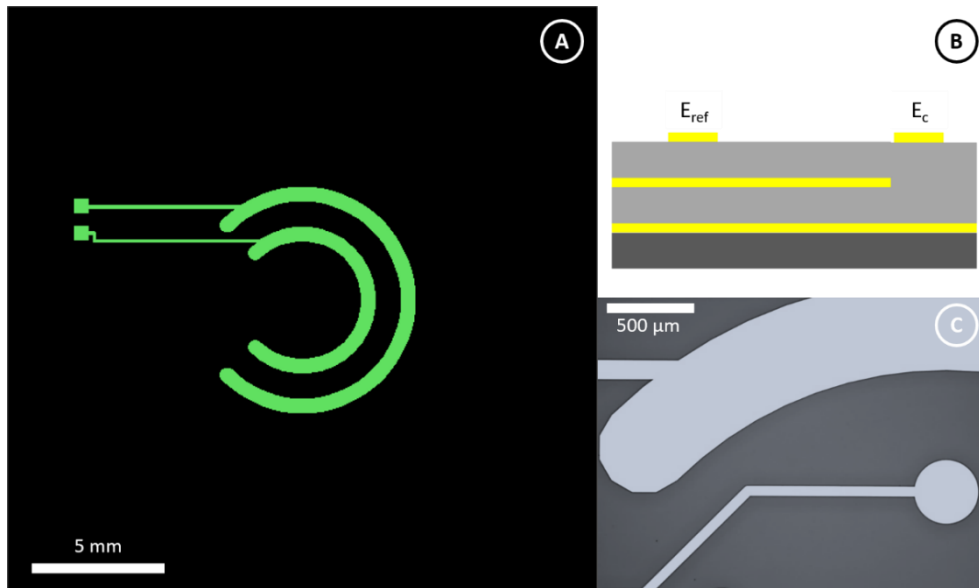


Figure 14 A : représentation du second masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope optique après lift-off.

III.2 Passivation et ouverture des contacts des nanoélectrodes

Le lift-off est privilégié dans le cadre de la structuration de matériaux difficiles à graver, ce qui n'est pas le cas du nitrure de silicium. Le dépôt d'une couche de 100 nm de Si_3N_4 est effectué par IC-PECVD. La plaquette est ensuite enduite d'une résine négative, la NLOF (5 μm). Enfin, le nitrure est gravé par RIE (au tétrafluorure de carbone pendant 45 secondes) dans les zones où la résine est ouverte, c'est-à-dire au niveau des électrodes planaires pour définir leurs surfaces actives et au niveau des contacts et des zones où seront formés les puits (Figure 15), afin de faciliter les futures étapes de gravures en retirant par avance une première couche de matériau.

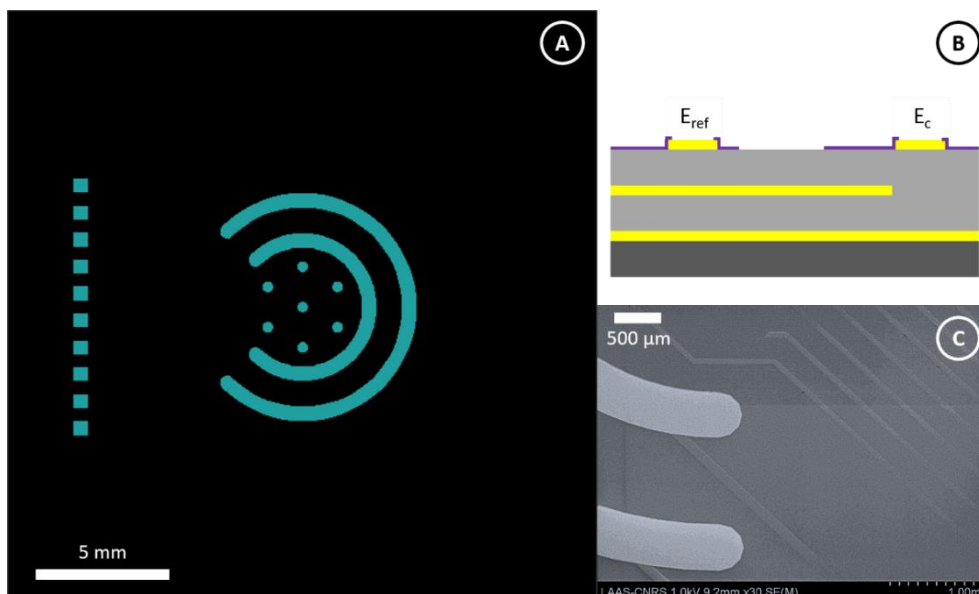


Figure 15 A : représentation du troisième masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope électronique à balayage après gravure RIE du Si_3N_4 .

L'objectif de la quatrième étape de photolithographie est simplement de venir ouvrir le SiO_2 au niveau des contacts des électrodes annulaires encastrées (Figure 16). Puisqu'il n'y pas de contraintes particulières vis-à-vis de la résolution des motifs ou de la verticalité des flancs de gravure, la gravure humide, plus simple de mise en œuvre, est privilégiée. Le verre borosilicate constituant la plaquette est composé de 70 à 80% de silice, on protège alors sa face arrière à l'aide d'un film colant en polychlorure de vinyle. Finalement, la plaquette est plongée dans une solution d'acide fluorhydrique dosé à 5% pendant dix à quinze minutes. Des tests de conductivité sont réalisés sous pointes pour vérifier la prise de contact avant de passer à l'étape suivante.

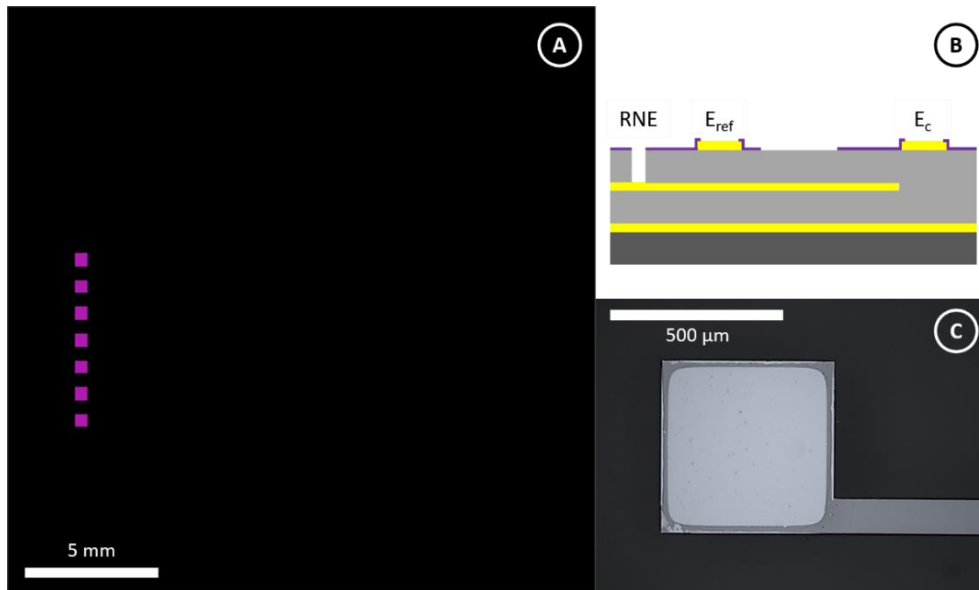


Figure 16 A : Représentation du quatrième masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope optique après gravure humide du SiO_2 .

III.3 Ouverture des contacts des microélectrodes et formation des micropuits

Pendant une gravure ionique réactive, le plasma réagit chimiquement avec le matériau ciblé selon une certaine sélectivité. La sélectivité s'exprime par le rapport entre la vitesse de gravure du matériau cible et la vitesse de gravure du masque de résine. Celle-ci varie fortement en fonction des mélanges gazeux utilisés (Tableau 2). En plus de consommer la résine en réagissant chimiquement avec elle, le plasma entraîne son échauffement. Un fluide comme l'huile Fomblin ou la pâte thermique est placé sous la plaquette pour améliorer le transfert thermique avec le support. Néanmoins, dans le contexte d'une gravure de longue durée, des temporisations sont effectuées dans le but de laisser la plaquette et la résine redescendre régulièrement en température. Le risque n'est pas uniquement de consommer l'entièreté de la résine avant la fin du procédé de gravure, il est aussi de provoquer son durcissement. Dans certains cas la résine peut se retrouver déstructurée par l'échauffement, rendant son retrait impossible en fin de procédé.

Table 2 Plasmas associés aux matériaux à graver ; vitesses de gravures et sélectivités.

Matériau cible	Composition du plasma	Vitesse de gravure (nm.min ⁻¹)	Sélectivité
Dioxyde de silicium (SiO ₂)	Tétrafluorure de carbone (CF ₄) et Argon (Ar)	150	0,72
Titanes (Ti) et oxydes de titane (TiO _x)	Hexafluorure de soufre (SF ₆)	4	0,015
Platine (Pt)	Dichlore (Cl ₂)	17	0,34

L'étape finale de gravure ionique réactive, consistant à former les micropuits tout comme les RNEs et les DMEs, est la plus critique. Cinq couches de matériaux doivent être gravées successivement, ce qui implique le dépôt d'une couche épaisse de résine (13 µm d'AZ 40XT). C'est d'ailleurs ce qui justifie la décision de réduire progressivement le rayon du puits jusqu'à 1,5 µm, puisque l'épaisseur de résine déposée est directement liée à la résolution maximale des motifs obtenus par photolithographie. De plus, il faut savoir que la vitesse de gravure d'un matériau par RIE diminue suivant la taille de l'ouverture dans la résine. La figure suivante (Figure 17) présente l'évolution des épaisseurs de la résine et de l'empilement SiO₂/Ti/Pt/Ti/SiO₂ au cours de la gravure, dans le cadre de la réalisation des composants de première génération (rayons 3 et 4,5 µm).

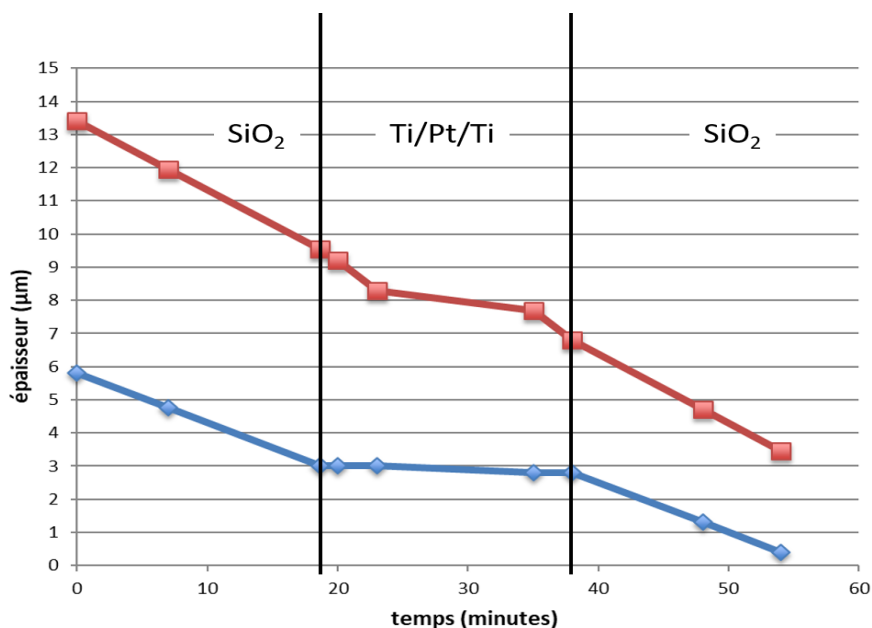


Figure 17 Mesure de l'évolution des épaisseurs de résine (rouge) et de l'empilement de matériaux à graver (bleu) au cours de la gravure RIE.

On constate que la résine est consommée plus rapidement que l'empilement, et que son épaisseur finale est comprise entre 3 et 4 µm. La marge, en terme de temps de gravure, est donc faible : ~10 minutes en considérant le plasma utilisé pour la gravure du SiO₂. Au-delà de cette marge, le risque est d'exposer la couche de passivation (Si₃N₄) au plasma, donc d'entraîner de graves défauts vis-à-vis des électrodes surfaciques, en plus de réduire la profondeur totale des cavités. Intéressons-nous donc maintenant aux modifications apportées au procédé en vue d'obtenir des micropuits instrumentés de 1,5 µm de rayon.

Au cours de l'insolation, le masque et la plaquette sont mis en contact. Si le contact n'est pas parfait, des phénomènes de diffraction de lumière peuvent se manifester entraînant des défauts dans la définition des motifs transférés dans la résine (forme et/ou taille). De plus, quand le substrat est transparent, contrairement aux substrats en silicium, la lumière transmise est susceptible d'être réfléchi sur le support où est déposé la plaquette, ce qui là aussi peut entraîner des défauts. Dans le but de limiter l'apparition de tels défauts, le vide est réalisé entre la plaquette et le masque, et un film bleu foncé constitué de polychlorure de vinyle (PVC) et d'acrylique est déposé entre la plaquette et son support durant l'insolation. Des plaquettes en verre borosilicate avec un dépôt de $2\ \mu\text{m}$ de SiO_2 ont été utilisées dans un premier temps pour valider l'étape de photolithographie. Par comparaison avec la recette précédemment considérée, les temps d'exposition et de développement sont augmentés. Augmenter le temps d'insolation permet d'augmenter la dose d'énergie transmise par rayonnements ultra-violet à la résine donc sa solubilité, tandis qu'augmenter la durée du développement permet de limiter les risques. En effet, un sous-développement (Figure 18A) de la résine est grave dans notre situation, car le plasma va s'attaquer à la résine avant de s'attaquer à l'empilement des matériaux à gravés, ce qui va entraîner un décalage temporel de l'arrivée des différents gaz. Par opposition, un surdéveloppement (Figure 18D) risque uniquement d'entraîner une augmentation du diamètre des micropuits, ce qui n'est pas dramatique.

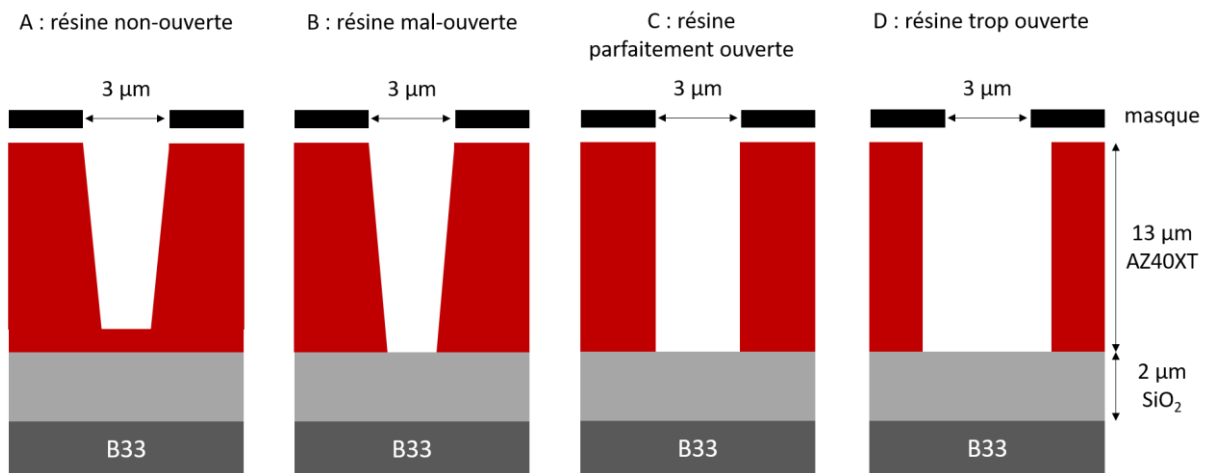


Figure 18 Ouvertures de résine susceptibles d'être obtenues après développement.

Lors des essais menés dans le cadre du projet NANOMITO, des micropuits présentant les trois valeurs de rayons considérées ($4,5\ \mu\text{m}$; $3\ \mu\text{m}$; $1,5\ \mu\text{m}$) étaient associés sur la même puce. Les résultats de caractérisations au MEB montrent par une vue en coupe¹⁰ que la gravure s'est à peu de choses près arrêtée au niveau de la nanocouche de platine pour les puits de $1,5\ \mu\text{m}$ de rayon (Figure 19A), alors qu'elle s'est correctement déroulée pour les autres puits (Figure 3). Ceci laisse supposer¹¹ que l'étape de photolithographie réalisée précédemment a mené à un sous-développement de la résine (Figure 18A). Dans cette situation, le plasma CF_4/Ar s'attaque d'abord à la résine avant d'atteindre le dioxyde de silicium. Ainsi, les plasmas suivants, constitués de SF_6 ou de dichlore, sont envoyés trop tôt dans l'enceinte et s'attaquent au SiO_2 plutôt qu'aux métaux (Ti/Pt). Quand le mélange CF_4/Ar est introduit de nouveau dans l'enceinte pour graver la partie inférieure de SiO_2 , la couche de métal semi-gravée agit comme une barrière.

¹⁰ La plaquette est scindée au niveau des puits (étape de caractérisation destructive).

¹¹ Le terme « supposer » est utilisé ici car, étant donné les rapports de formes, il est extrêmement difficile de venir vérifier par microscopie optique ou électronique que la résine est correctement ouverte avant d'effectuer la RIE. De même, l'ouverture est trop étroite pour permettre le passage de la pointe d'un profilomètre.

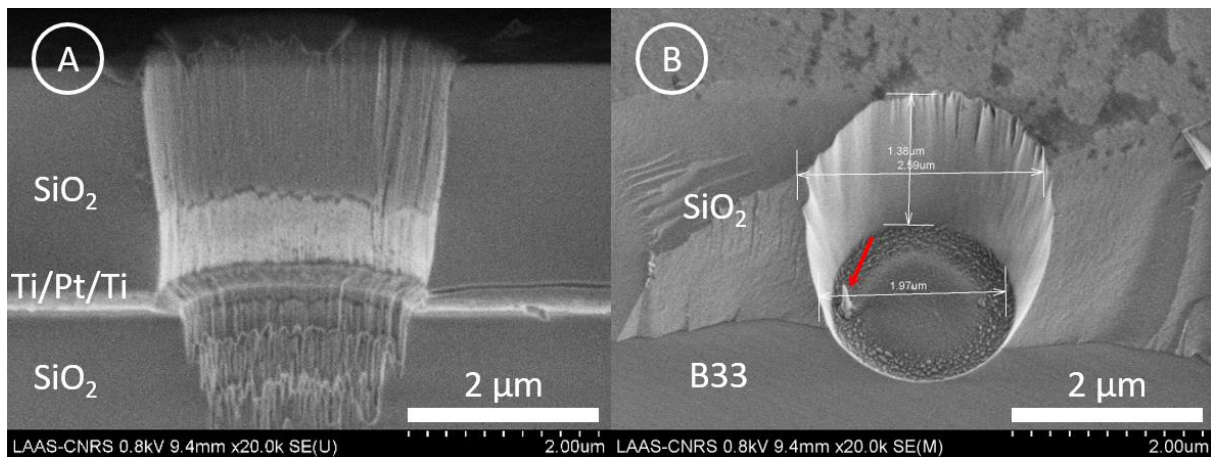


Figure 19 A : résultat de gravure RIE obtenu dans le cadre de la fabrication des composants ElecWell de première génération ($R = 1,5 \mu\text{m}$). B : résultat de gravure RIE obtenu dans le cadre de la modification du protocole de photolithographie pour les composants de deuxième génération ($R = 1,5 \mu\text{m}$). L'image est prise avec une inclinaison de 30° . La flèche rouge indique un phénomène de micro-masquage, lié à la présence de résidus de résine en début de gravure.

L'allongement des temps d'insolation et de développement ont permis de valider l'ouverture de la résine (Figure 19B). Cependant, les micropuits obtenus avec cette plaquette test, présentent un diamètre supérieur moyen de $2,7 \mu\text{m}$ et un diamètre inférieur moyen de $1,9 \mu\text{m}$. L'inclinaison des flancs et le fait que le rayon du micropuits soit inférieur à celui de l'ouverture présente sur le masque de photolithographie, tendent à prouver que la résine n'était pas parfaitement ouverte (Figure 18B). C'est la raison pour laquelle le temps de développement sera encore davantage augmenté dans le cadre de la fabrication des composants ElecWell, tandis que la durée d'insolation restera constante. Le tableau suivant (Tableau 3) met en avant les modifications finalement apportées pour la réduction du rayon du micropuits de $3 \mu\text{m}$ à $1,5 \mu\text{m}$.

Table 3 Mise à jour du protocole d'ouverture des micropuits pour la réduction de leur rayon vers 1,5 μm dans le cadre de la fabrication des composants ElecWell de seconde génération.

	Génération 1	Génération 2
Préparation plaquette	Nettoyage : acétone, isopropanol, eau dé-ionisée	Nettoyage : acétone, isopropanol, eau dé-ionisée, plasma O₂
	Traitement HMDS	Traitement HMDS
Enduction	13 μm AZ40XT à la tournette	13 μm AZ40XT à la tournette
	détourage	détourage
Insolation	20 secondes	25 secondes
	Mode de contact : vide	Mode de contact : vide Film bleu en face arrière
Durée du développement	90 secondes	240 secondes
Recette gravure	Huile Fomblin	Pâte thermique
	CF ₄ /Ar : 20 minutes SF ₆ : 3 minutes Cl ₂ : 12 minutes SF ₆ : 3 minutes CF ₄ /Ar : 16 minutes Temporisations : toutes les 10 minutes	Descumming : 30 secondes CF₄/Ar : 24 minutes SF ₆ : 3 minutes Cl ₂ : 12 minutes SF ₆ : 3 minutes CF₄/Ar : 17 minutes Temporisations : toutes les 5 minutes

Initialement, la préparation de la plaquette par un nettoyage basé sur une exposition au plasma oxygène était évitée par précaution, de peur de modifier la structure du platine déposé par la formation d'oxydes. Depuis, des études menées par l'équipe d'Arbault, ont permis de mettre en évidence les bénéfices d'un plasma O₂ sur les performances électrochimiques du platine ou noir de platine [3], [21]. Il a donc été décidé de réintroduire le plasma dans le protocole de nettoyage pré-enduction. La pâte thermique, plus visqueuse que l'huile Fomblin, a été utilisée pour compenser la non-planéité d'une plaquette contrainte¹². Suite à la gravure, l'épaisseur de résine mesurée s'est montrée plus importante qu'avec l'huile Fomblin : ~ 2,9 μm contre ~ 1,7 μm . C'est la raison pour laquelle la pâte thermique fut privilégiée pour la gravure sèche des plaquettes suivantes, contraintes ou non. On peut ensuite remarquer que le temps de gravure de la première couche de SiO₂ est supérieur à celui de la deuxième. Cela a pour but de s'assurer d'avoir gravé totalement la première couche d'oxyde avant d'envoyer les gaz spécifiques à la gravure des métaux, un décalage temporel risquant d'entraîner les mêmes conséquences qu'un sous-développement de résine (Figure 18A, Figure 19A). D'ailleurs, l'espace de temps durant lequel le plasma CF₄/Ar est actif alors qu'il n'y a plus de SiO₂ à graver, est susceptible d'être à l'origine de l'apparition de la marche constatée au niveau de la RNE après fabrication. Enfin, une étape de « descumming » est ajoutée en tout début de gravure. Cette étape consiste à effectuer un plasma oxygène de courte durée pour vaporiser les résidus de résines, donc réduire les risques de micro-masquages (Figure 19B) et améliorer la verticalité des flancs.

¹² L'épaisseur totale du SiO₂ déposé sur cette plaquette valait 6,3 μm au lieu de 5 μm .

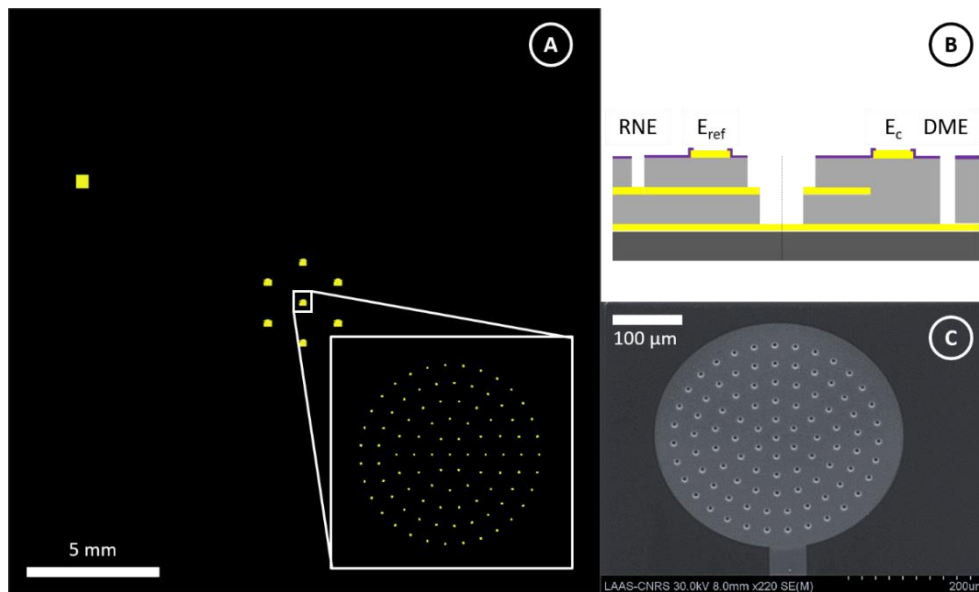


Figure 20 A : représentation du cinquième masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope électronique à balayage après gravure de l'empilement $\text{SiO}_2/\text{Ti}/\text{Pt}/\text{Ti}/\text{SiO}_2$.

L'autre nouveauté de cette seconde génération, est l'intégration d'une électrode disque encastrée constituée d'ITO. Plusieurs questions se sont donc posées vis-vis de sa réactivité au plasma utilisé pour la gravure de la couche inférieure de SiO_2 (le mélange CF_4/Ar) :

- L'ITO est-il gravé ?
- Est-ce que sa conductivité est modifiée suite à l'exposition au plasma ?
- Est-ce que sa transparence est modifiée suite à l'exposition au plasma ?

Une plaquette B33/ITO a servi de témoin. La moitié de sa surface a été exposée au plasma CF_4/Ar pendant cinq minutes, alors que la seconde moitié était protégée par un film de Kapton. Suite à la gravure, les deux zones ont été caractérisées, avec comme résultats :

- vitesse de gravure : $10 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$;
- conductivité : $R_{\square} = 10 \Omega/\square$ avant comme après exposition au plasma ;
- transparence : légère modification du spectre de transmission (Figure 21).

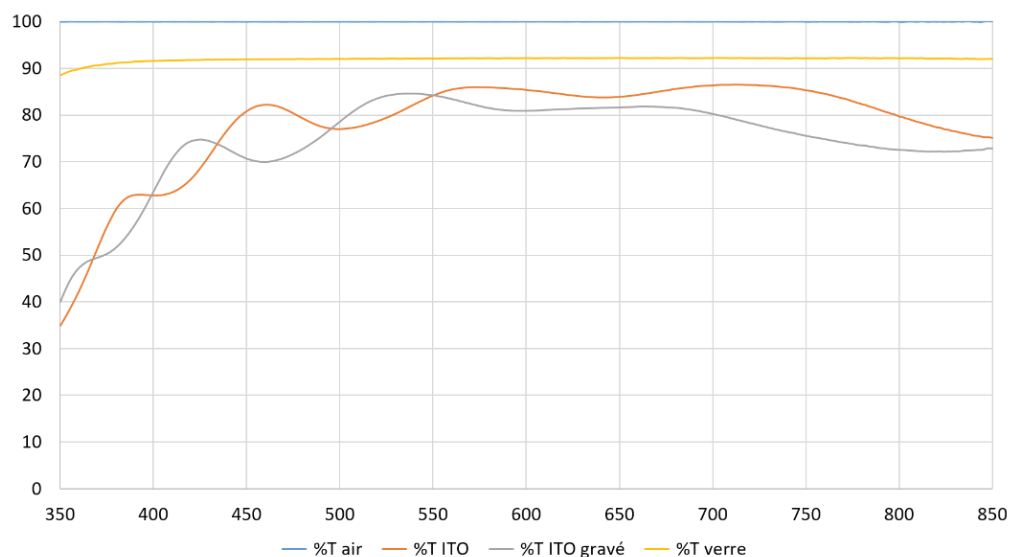


Figure 21 Spectres de transmission dans le visible de l'ITO avant (orange) et après (gris) exposition au plasma CF₄/A pendant cinq minutes.

La caractérisation MEB (Figure 20C) permet de vérifier l'ouverture des puits mais pas l'état du fond de gravure, ou alors avec des dispositifs sacrifiés en ce sens (Figure 19). Pour éviter de détruire des puces ayant nécessité six mois de travaux et un certain investissement financier, une autre approche a été privilégiée : la détermination de la surface active des DME par voie électrochimique. En effet, comme cela a été expliqué dans le chapitre précédent, le courant mesuré aux ultramicroélectrodes est directement proportionnel à la concentration en réactifs dissouts en solution mais aussi à la surface de l'électrode. Ainsi, connaissant précisément la concentration d'une espèce électroactive en solution, on peut aisément déduire la surface active d'une UME à partir de la valeur du courant limite mesuré. Cependant, avant de pouvoir passer à l'étape de caractérisation électrochimique, il est indispensable de faire le lien entre la puce et le potentiostat, c'est à dire de procéder à l'assemblage.

IV Etapes de fabrication hors salle blanche

IV.1 Assemblage

Après la découpe à la scie diamantée, l'étape d'assemblage consiste à associer un connecteur à la puce, tout en assurant l'étanchéité pour éviter l'apparition de courts-circuits en cours d'expériences en phase liquide. Le type de connecteur utilisé pour la première génération des capteurs ElecWell a été conservé (Premo-Flex™ FFC jumper, fabriqué par Molex). Celui-ci se présente sous la forme d'une nappe flexible avec dix contacts de 1 mm de largeur, séparés les uns des autres par une distance de 500 µm. Par comparaison avec la première génération, un seul connecteur est utilisé par puce. De plus, sa longueur passe de 5 cm à 15 cm pour faciliter la future mise en place du système complet sur un microscope. Quelle que soit la puce (A, B, C ou D), un seul contact, toujours positionné au même endroit, relie l'ensemble des DME. Ce contact sert donc de repère afin que la nappe soit toujours positionnée de la même manière. La prise de contact s'effectue à l'aide d'une colle contenant des particules d'argent (EPO-TEK® H20E). La colle est déposée au niveau de chaque contact de la puce par une approche similaire à la technique du jet d'encre (seringue manipulée par TRESKY® 3000). Ensuite, deux traits fins de colle UV (Permabond® UV625) sont déposés de part et d'autre des points de contacts pour assurer l'étanchéité. Enfin, le connecteur est précisément positionné sur la puce à l'aide d'une pince à vide sous observation au microscope, et les différentes colles sont réticulées par exposition aux UV ou par apport de chaleur (3h dans une étuve portée à 80°C). Pour connecter l'extrémité libre du connecteur, un boîtier a été fabriqué en interne. Celui-ci permet à l'utilisateur de choisir quels contacts connecter au potentiostat *via* des câbles utilisés en routine.

IV.2 Modification de la fluidique

Suite à plusieurs essais, il s'est avéré que la puce n'est pas tout à fait adaptée à la chambre fluidique (RC-21B) proposée par la société Warner instrument ; à cause de la présence du connecteur principalement. Une solution intégrant un joint torique contournant le connecteur a donc été développée (Figure 22) en interne par usinage de plaques de polyméthacrylate de méthyle, plus connu sous le nom

de PMMA ou Plexiglas. Développer une solution en interne prend du temps mais présente l'avantage de la versatilité. Ainsi plusieurs types de fluidiques ont été conçues et fabriquées, celles-ci présentent :

- une ou deux entrées, toujours une seule sortie ;
- une configuration « chambre ouverte » avec la possibilité de placer une lamelle de microscopie pour la fermer ;
- une configuration « chambre fermée » pour minimiser les risques de fuites.

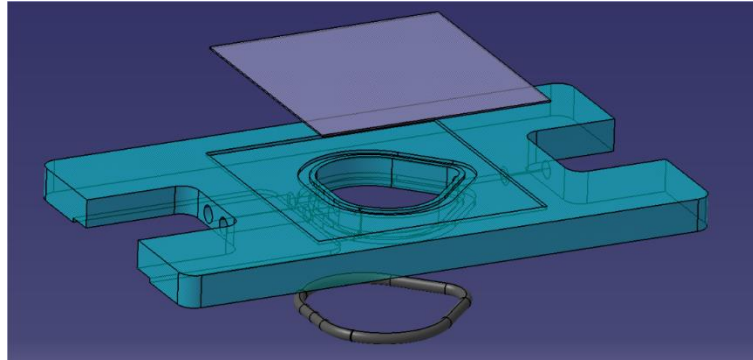


Figure 22 Représentation 3D de la fluidique développée au laboratoire (configuration chambre ouverte)

IV.3 Validation du système complet

La fluidique, fabriquée à partir d'une plaque de PMMA dont l'épaisseur est légèrement supérieure à celle de la fluidique d'origine, rend le système de serrage magnétique difficile d'utilisation. Il a donc été remplacé par un système de serrage à vis, moins pratique mais plus fiable. La plaque de PMMA servant à appliquer la pression est percée pour permettre d'approcher l'objectif du microscope de chaque côté de la puce. Le système complet a finalement été validé par le remplissage de la chambre avec des solutions colorées, soit à l'aide d'une seringue (mode statique, chambre ouverte ou fermée), soit en circulation continue à l'aide d'une pompe péristaltique (mode dynamique, chambre fermée). L'apparition de fuites est exceptionnelle. La figure suivante (Figure 23), montre le microdispositif ElecWell assemblé (Figure 23A-3), la fluidique associée (Figure 23A-4), ainsi que l'ensemble des composants constituant un système complet (Figure 23B) pour le couplage de l'analyse optique avec l'analyse électrochimique.

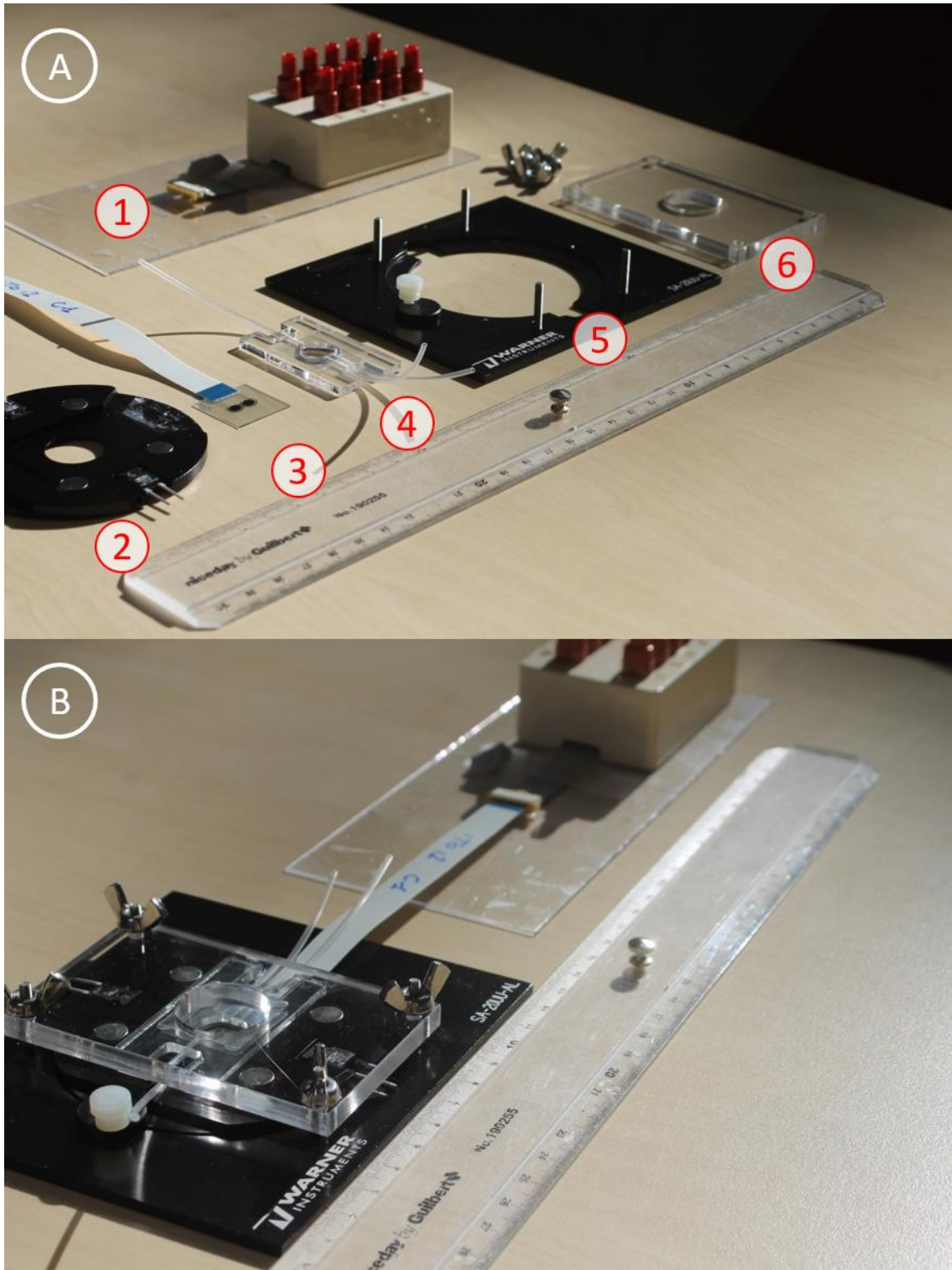


Figure 23 A : système ElecWell complet avant assemblage, avec : (1) boîtier permettant de relier la puce au potentiostat ; (2) plateforme de microscopie thermorégulée ; (3) puce ElecWell de type C ; (4) chambre fluïdique en PMMA ; (5) plateforme assurant la compatibilité avec plusieurs types de microscopes ; (6) plaque de PMMA permettant un serrage à vis du système assemblé. B : système ElecWell complet après assemblage.

Conclusion

Pour conclure, les travaux présentés dans ce quatrième chapitre répondent à cinq des huit exigences identifiées à l'issue du projet NANOMITO. Le dispositif ElecWell comporte désormais une cellule électrochimique à trois électrodes tout intégrée (exigence 1), ce qui permet la mise en place d'une chambre fluide fermée pour une meilleure manipulation des éléments biologiques et une meilleure maîtrise des concentrations en ajouts de substances agissant sur la fonction mitochondriale (exigence 2). La modification des dimensions de la puce offre la possibilité d'utiliser un système commercial, conçu pour garantir la compatibilité avec une large gamme de microscopes (exigence 3) et fournissant une solution pour la régulation de la température du fluide (exigence 6). Enfin, le rayon des micropuits est passé de 3 μm à 2 μm , entraînant une légère augmentation du taux de collecte, et surtout réduisant le nombre de mitochondries susceptibles d'entrer dans chaque micropuits (exigence 7). L'objectif de la réduction du rayon à 1,5 μm n'a pas été rempli mais on peut maintenant affirmer qu'il est réalisable en jouant sur le temps de développement de la résine (Figure 17). En tout, trois plaquettes ont subi l'étape de gravure RIE alors que trois autres, dont une avec absence d'ITO pour une meilleure transparence (Figure 20), sont encore en attente. Cela laisse entrevoir la possibilité de produire 27 composants supplémentaires tout en apportant quelques ajustements. Néanmoins, il reste à répondre à trois objectifs : favoriser le taux de remplissage, limiter la sédimentation de mitochondries potentiellement interférentes, et développer une solution pour encore améliorer la sensibilité de l'électrode de travail vis-à-vis de la détection de l'oxygène consommé, mais plus particulièrement de la production de peroxyde d'hydrogène. Le cinquième et dernier chapitre traitera ces aspects, après avoir validé expérimentalement les performances électrochimiques des composants réalisés (première et seconde générations confondues).

Bibliographie

- [1] F. Sékli Belaïdi *et al.*, “Integration of ring nanoelectrodes into microwells for the bioelectrochemical analysis in sub-picolitre volumes,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 232, pp. 345–356, Sep. 2016.
- [2] K. C. Tang *et al.*, “Evaluation of bonding between oxygen plasma treated polydimethyl siloxane and passivated silicon,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 34, pp. 155–161, Apr. 2006.
- [3] S. Ben-Amor, A. Devin, M. Rigoulet, N. Sojic, and S. Arbault, “Oxygen Plasma Treatment of Platinized Ultramicroelectrodes Increases Sensitivity for Hydrogen Peroxide Detection on Mitochondria,” *Electroanalysis*, vol. 25, no. 3, pp. 656–663, Mar. 2013.
- [4] Y. Temiz, A. Ferretti, Y. Leblebici, and C. Guiducci, “A comparative study on fabrication techniques for on-chip microelectrodes,” *Lab. Chip*, vol. 12, no. 22, p. 4920, 2012.
- [5] E. Vanhove, A. Tsopéla, L. Bouscayrol, A. Desmoulin, J. Launay, and P. Temple-Boyer, “Final capping passivation layers for long-life microsensors in real fluids,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 178, pp. 350–358, Mar. 2013.
- [6] K. V. Nemani, K. L. Moodie, J. B. Brennick, A. Su, and B. Gimi, “In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 7, pp. 4453–4459, Oct. 2013.
- [7] T. Minami, “Transparent conducting oxide semiconductors for transparent electrodes,” *Semicond. Sci. Technol.*, vol. 20, no. 4, pp. S35–S44, Apr. 2005.
- [8] K. Kisler *et al.*, “Transparent electrode materials for simultaneous amperometric detection of exocytosis and fluorescence microscopy,” *J. Biomater. Nanobiotechnology*, vol. 3, no. 2A, p. 243, 2012.
- [9] M. N. Dešić, M. M. Popović, M. D. Obradović, L. M. Vračar, and B. N. Grgur, “Study of gold-platinum and platinum-gold surface modification and its influence on hydrogen evolution and oxygen reduction,” *J. Serbian Chem. Soc.*, vol. 70, no. 2, pp. 231–242, 2005.
- [10] Y. Li, C. Sella, F. Lemaître, M. Guille Collignon, L. Thouin, and C. Amatore, “Highly Sensitive Platinum-Black Coated Platinum Electrodes for Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Nitrite in Microchannel,” *Electroanalysis*, vol. 25, no. 4, pp. 895–902, Apr. 2013.
- [11] S. Ben-Amor *et al.*, “Enhanced Detection of Hydrogen Peroxide with Platinized Microelectrode Arrays for Analyses of Mitochondria Activities,” *Electrochimica Acta*, vol. 126, pp. 171–178, Apr. 2014.
- [12] G. C. Fiaccabrino and M. Koudelka-Hep, “Thin-Film Microfabrication of Electrochemical Transducers,” *Electroanalysis*, vol. 10, no. 4, pp. 217–222, 1998.
- [13] G. Inzelt, A. Lewenstam, and F. Scholz, Eds., *Handbook of Reference Electrodes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

- [14] J. Ghilane, P. Hapiot, and A. J. Bard, "Metal/Polypyrrole Quasi-Reference Electrode for Voltammetry in Nonaqueous and Aqueous Solutions," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 19, pp. 6868–6872, Oct. 2006.
- [15] C. Duarte-Guevara *et al.*, "On-chip metal/polypyrrole quasi-reference electrodes for robust ISFET operation," *The Analyst*, vol. 140, no. 10, pp. 3630–3641, 2015.
- [16] M. R. Almofti, "Silver Ion Induces a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria and Release of Apoptogenic Cytochrome c," *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 134, no. 1, pp. 43–49, Jul. 2003.
- [17] M. J. Piao *et al.*, "Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis," *Toxicol. Lett.*, vol. 201, no. 1, pp. 92–100, Feb. 2011.
- [18] J. S. Teodoro *et al.*, "Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective," *Toxicol. In Vitro*, vol. 25, no. 3, pp. 664–670, Apr. 2011.
- [19] R. B.-K. Wakshlak, R. Pedahzur, and D. Avnir, "Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the 'zombies' effect," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, Aug. 2015.
- [20] R. Ghodssi and P. Lin, Eds., *MEMS Materials and Processes Handbook*, vol. 1. Boston, MA: Springer US, 2011.
- [21] V. Badets, J. Pandard, N. Sojic, and S. Arbault, "Deciphering the Platinized Surface Reactivity to Improve the Detection of Hydrogen Peroxide in Bioanalyses," *ChemElectroChem*, vol. 3, no. 12, pp. 2288–2296, Dec. 2016.

Chapitre 5

Caractérisations Électrochimiques, Modifications des Propriétés des Surfaces, et Application à l'Analyse du Métabolisme de Mitochondries Isolées

Introduction

Les deux générations de capteurs sont impliquées dans les expériences qui suivront. Des électrodes externes (contre et référence) peuvent être utilisées dans certains cas pour la deuxième génération (fabrication d'une quasi-référence intégrée) ou systématiquement pour la première génération (caractérisations électrochimiques, électrodépôt de noir de platine et immobilisation d'anticorps). A l'exception des expériences impliquant des mitochondries, l'utilisation de la chambre fluide n'est pas nécessaire. Une goutte de la solution est déposée à la surface du dispositif posé à plat, et les électrodes externes sont introduites à l'intérieur.

I Caractérisation des performances électrochimiques

I.1 Voltamogramme du platine

Avant chaque utilisation d'une électrode en platine, il est préférable d'effectuer une étape appelée activation, consistant à effectuer une voltamétrie cyclique dans une solution d'acide sulfurique désaérée. L'activation remplit deux rôles : le premier est d'effectuer un nettoyage des impuretés de surface [1], le second est de vérifier les propriétés du platine [2], [3]. En effet, la forme du voltamogramme obtenu donne des indications précises sur le comportement électrochimique du matériau d'électrode, on parle alors de « signature électrochimique ».

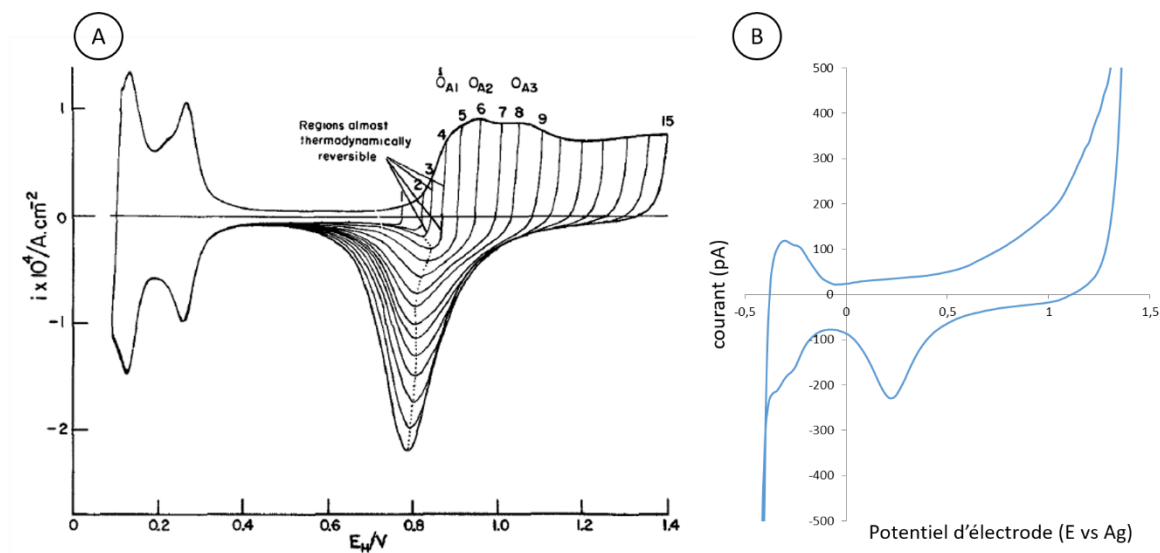
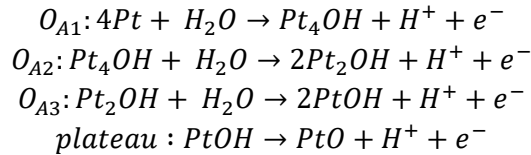
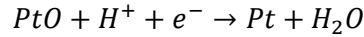


Figure 1 A : voltamogramme typique obtenu par polarisation d'une électrode de platine dans une solution d'acide sulfurique, d'après [2]. B : voltamogramme obtenu par polarisation d'une nanoélectrode encastrée dans une solution d'acide sulfurique (0,5 M).

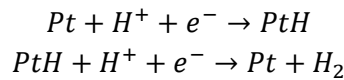
La figure 1A présente le voltamogramme de référence du platine polycristallin obtenu dans une solution aqueuse d'acide sulfurique (H_2SO_4) demi-molaire (0,5 M). L'augmentation progressive du potentiel vertex (borne supérieure de l'intervalle de balayage en potentiel), met en évidence la formation d'oxydes de platine à partir de 0,8 V vs ESH selon un mécanisme complexe impliquant trois étapes transitoires O_{A1} , O_{A2} et O_{A3} , telles que :



Lors du balayage retour, les oxydes formés sont réduits selon l'équation :



Enfin, on observe deux fois deux pics, correspondant à l'électrosorption des protons H^+ (issus des ions hydronium H_3O^+ présents en solution) suivie par leur électrodésorption entre 0 et 0,4 V vs ESH, selon les équations :



La figure 1B présente le voltamogramme obtenu suite à l'activation d'une nanoélectrode intégrée dans un micropuits. Sa forme indique que le matériau déposé en fine couche par PVD puis gravé par RIE, dispose de caractéristiques électrochimiques tout à fait comparables avec le matériau massif. On note la formation des oxydes de platine à partir d'environ 0,6V vs Ag. Le pic, coupé pour une meilleure visibilité, correspond au mur du solvant, c'est-à-dire à l'oxydation de l'eau débutant vers 1,1 V vs Ag. Les oxydes sont réduits autour de 0,25 V vs Ag tandis que l'activité des protons est détectée pour des polarisations négatives.

I.2 Détermination des surfaces actives

Le courant limite mesuré aux UME est directement proportionnel à la concentration de l'espèce électroactive réagissant à la surface de l'électrode (Chapitre 3). Il est aussi directement lié à l'aire de l'électrode. Ainsi, en se plaçant dans des conditions similaires à celles définies dans la simulation COMSOL, c'est-à-dire dans une aqueuse contenant du ferrocène-méthanol à une concentration de 1 mM et en absence de convection, on peut comparer le courant mesuré (Figure 2) avec celui simulé pour toutes les valeurs de rayons soient 4,5 μm , 3 μm et 1,5 μm . Si les courants sont égaux ou presque, alors cela signifie que le procédé technologique de fabrication s'est correctement déroulé, autrement dit que les surfaces actives définies sont bien celles attendues.

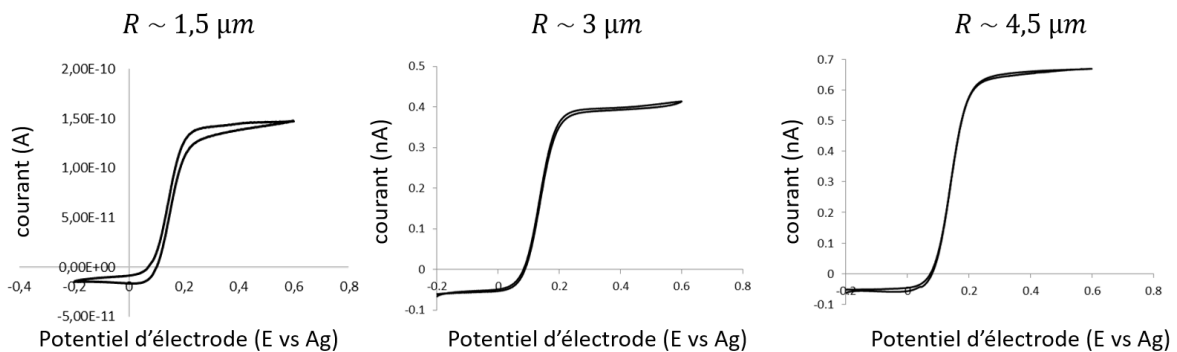


Figure 2 Voltammogrammes obtenus dans le cadre de l'oxydation du ferrocène-diméthanol (1 mM) à la surface de nanoélectrodes de platine encastrées pour trois valeurs de rayons : 1,5 μm ; 3 μm ; 4,5 μm .

Table 1 Comparaison des valeurs des courant limites mesurées, simulées et calculées.

Rayon interne (μm)	1,5	3	4,5
Courant limite mesuré (pA)	150	400	650
Courant limite simulé (pA)	180	390	622
Courant limite calculé (pA)	174	388	619

Les résultats de caractérisations électrochimiques des RNE adressables individuellement permettent de :

- valider le modèle théorique développé (Chapitre 3) ;
- valider le modèle de simulation (Chapitre 3) ;
- valider le procédé de fabrication en salle blanche (Chapitre 4).

On observe néanmoins que les courants mesurés (Tableau 1) sont inférieurs aux courants théoriques pour $R \sim 1,5 \mu\text{m}$, alors qu'ils leur sont supérieurs pour $R \sim 3 \mu\text{m}$ et $R \sim 4,5 \mu\text{m}$. Cela peut être attribué à la prise en compte de la valeur de la longueur de marche (L), fixée à 500 nm pour le calcul et la simulation quelle que soit la valeur du rayon interne.

Le même type de caractérisation a été réalisé pour les DMEs à base d'ITO (Figure 3). Concernant les puits de 3 μm de rayon, les résultats expérimentaux correspondent aux théoriques (Figure 3A). Concernant les puits de 1,5 μm de rayon, le courant mesuré est soit très inférieur (Figure 3C), soit très supérieur (Figure 3B), aux valeurs théoriques. Dans le premier cas cela signifie que les puits ne sont pas correctement ouverts jusqu'au fond, donc qu'il faut encore augmenter les temps de gravure. Dans le second cas, cela signifie que des matériaux déposés sur l'ITO (SiO_2 et Si_3N_4) se sont délamés, donc qu'il faut repenser le procédé de fabrication pour éviter que cela se reproduise, par exemple en gravant l'ITO suite à son dépôt pleine plaque pour définir les zones où seront fabriqués les micropuits avant d'effectuer le premier dépôt d'oxyde.

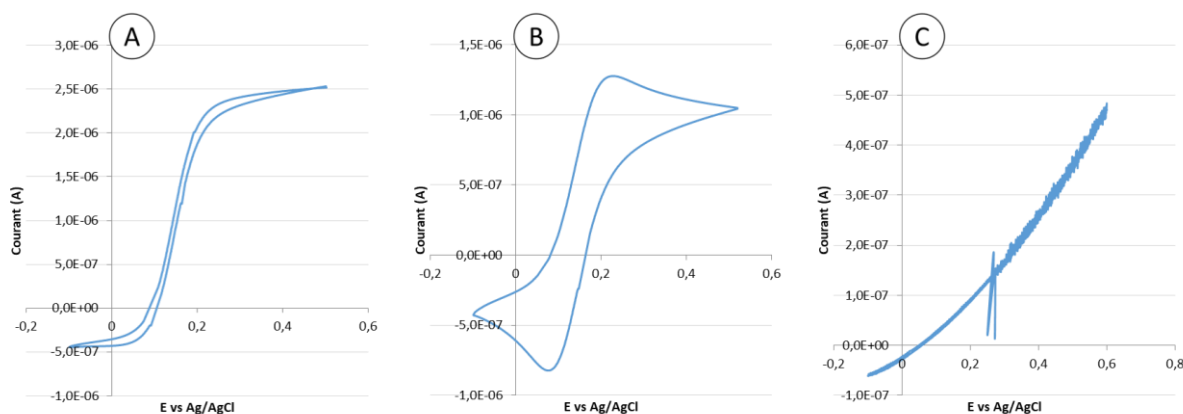


Figure 3 Voltammogrammes obtenus dans le cadre de l'oxydation du ferrocènediméthanol (1 mM) à la surface des microdisques encastrés à base d'ITO, pour deux valeurs de rayons : 1,5 μm et 3 μm . A : $R = 3 \mu\text{m}$; $N = 10000$. B : $R = 1,5 \mu\text{m}$; $N = 7$. C : $R = 1,5 \mu\text{m}$; $N = 20000$.

Table 2 Comparaison des valeurs des courant limites mesurées et calculées. « en CA » signifie que la valeur a été mesurée par chronoampérométrie.

	R = 1,5 μm N = 7	R = 1,5 μm N = 10000	R = 3 μm N = 10000
Courant limite mesuré	1 μA	240 nA (en CA)	2,50 μA
Courant limite calculé	720 pA	2,06 μA	2,62 μA

Bien que les dispositifs de seconde génération de $1,5 \mu\text{m}$ de rayon présentent des DME inutilisables pour la plupart, le fond des puits demeure transparent et les RNE répondent parfaitement. Finalement, ces dispositifs ne pourront être utilisés pour l'évaluation expérimentale du taux de collecte, mais ils restent adaptés à l'analyse de l'activité mitochondriale.

I.3 Influence de la distance centre-à-centre

L'influence de la distance centre-à-centre (d) a été évaluée avec les dispositifs de première génération contenant différents réseaux de 100 micropuits. Pour rappel, un régime de diffusion de type hémisphérique se traduit sur un voltamogramme par un plateau correspondant à la valeur du courant limite, tandis qu'un régime de diffusion linéaire se traduit par l'apparition d'un voltamogramme en « bec d'oiseau » car le courant décroît avec le temps.

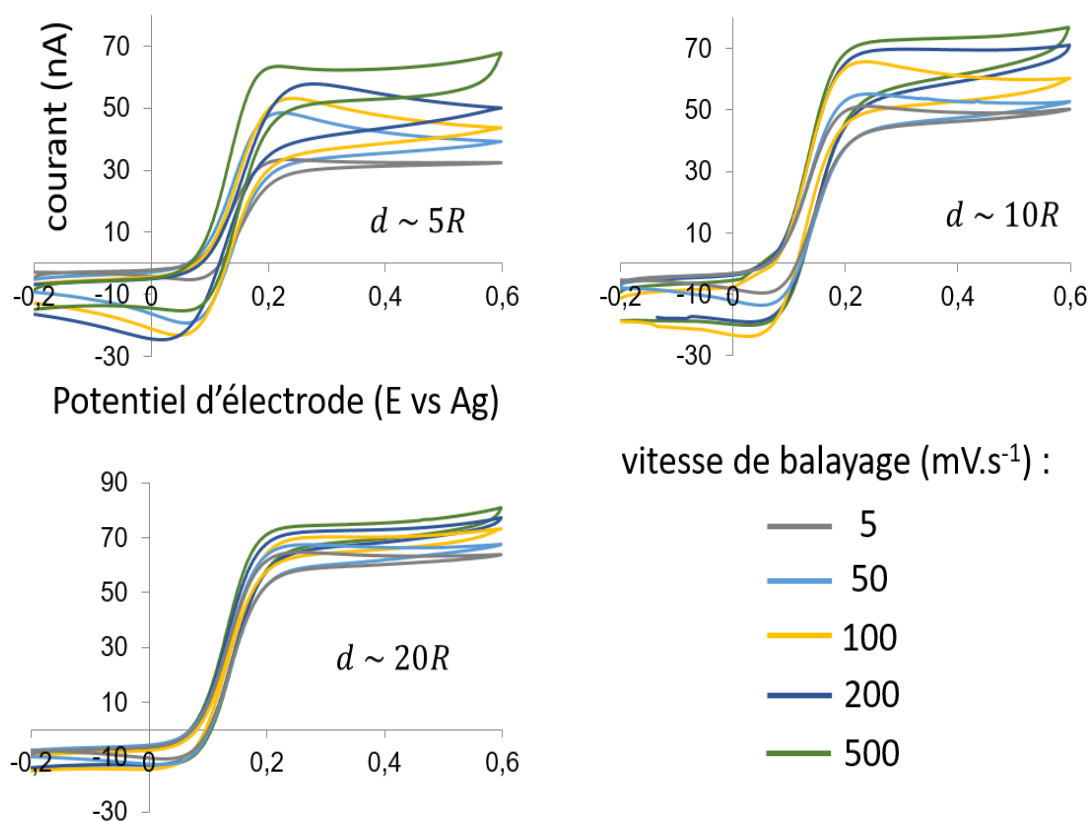


Figure 4 Etude des profils de diffusion associés à l'oxydation du ferrocène diméthanol à la surface de RNE intégrées dans des réseaux de micropuits ($R = 4,5 \mu\text{m}$) en fonction de la vitesse de balayage et de la distance centre-à-centre.

Les résultats expérimentaux (Figure 3) confirment d'une part, qu'une distance centre-à-centre supérieure ou égale à vingt fois la valeur du rayon du micropuits est obligatoire pour assurer un régime de diffusion de type hémisphérique, et d'autre part, que le modèle de simulation 3D est plus fidèle à la réalité que le modèle 2D.

I.4 Mode générateur-collecteur

Comme expliqué dans le chapitre 3, le mode générateur-collecteur permet de déterminer expérimentalement la valeur du taux de collecte. Le ferrocène, initialement seul présent en solution, est oxydé de manière permanente (par chronoampérométrie) au niveau du disque encastré pour produire l'ion ferricénium. L'application d'une voltamétrie cyclique plutôt qu'une chronoampérométrie au niveau de l'anneau permet en une seule et même expérience de déterminer en plus du taux de collecte τ , le facteur d'amplification A et la capacité de filtrage électrochimique de la structure. En effet, si le ferrocène est oxydé en même temps sur l'anneau (RNE) et sur disque (DME), on peut évaluer un paramètre que nous appellerons τ' , traduisant l'aptitude d'espèces électroactives à diffuser depuis la solution jusqu'au fond du puits, malgré la polarisation de l'électrode annulaire. Cette propriété de filtrage pourrait éventuellement être mise en œuvre dans le cadre de la détection d'une espèce chimique en solution en présence d'un interférent [4], [5]. Finalement, ces trois paramètres peuvent être définis tels que :

$$A = \frac{I_{DME|RNE_{red}}}{I_{DME|RNE}}; \tau = \frac{I_{RNE_{red}|DME}}{I_{DME|RNE_{red}}}; \tau' = \frac{I_{DME|RNE_{ox}}}{I_{DME|RNE}}$$

D'où :

$$A = \frac{\tau I_{RNE_{red}|DME}}{\tau' I_{DME|RNE_{ox}}}$$

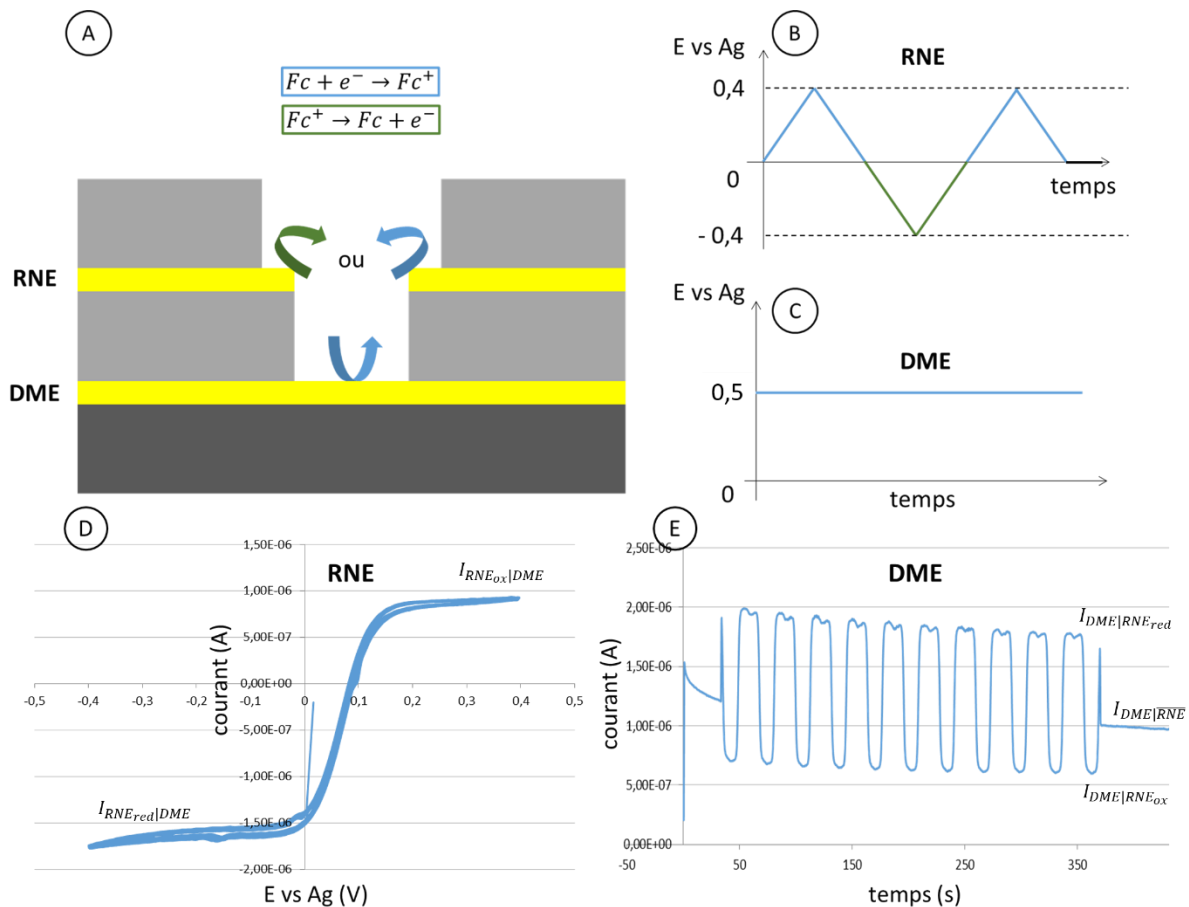


Figure 5 A : schéma décrivant les réactions électrochimiques impliquées. B : polarisation appliquée à la RNE. C : polarisation appliquée à la DME. D : courant mesuré à la RNE. E : courant mesuré à la DME.

La figure ci-dessus (Figure 4) présente un résultat obtenu avec une puce B de seconde génération ($R = 3 \mu\text{m}$; $N = 10\,000$) contenant des disques en ITO et des anneaux de platine. L'analyse des données aboutit sur :

Tableau 3 Comparaison des caractéristiques électrochimiques mesurées et simulées en mode générateur-collecteur

	A	τ	τ'
Expérience	1,67	0,91	0,57
Simulation	1,8	0,85	0,56

Les résultats des différentes caractérisations électrochimiques (première et deuxième génération) démontrent que les performances des composants réalisés sont en accord avec les études théoriques. La deuxième génération de puces ElecWell, avec une distance centre-à-centre fixée à 20R, assure un régime de diffusion de type hémisphérique lors des réactions aux électrodes, ce qui permet d'envisager l'analyse à l'échelle de la mitochondrie unique. De plus, le taux de collecte de 90% permet d'envisager la détection d'espèces électroactives libérées en faible quantité comme les ROS. Malgré tout, il reste à répondre à plusieurs exigences avant d'aller vers l'analyse du métabolisme mitochondrial, c'est ce dont va traiter la prochaine partie du chapitre.

II Modifications des propriétés des surfaces

II.1 Fabrication d'une UME de quasi-référence : électropolymérisation du pyrrole

Avec l'objectif d'obtenir des performances équivalentes à celles figurant dans la littérature [6], l'électropolymérisation du pyrrole est réalisée dans des conditions expérimentales strictement similaires. Le pyrrole est dilué dans un solvant organique : l'acétonitrile, pour obtenir une solution concentrée à 10 mM. Un électrolyte support : le tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF₆), est ajouté à une concentration de 0,1 M pour améliorer la conductivité de la solution et être incorporé dans le film de polypyrrole électroformé. L'électropolymérisation est effectuée par voltamétrie cyclique (Figure 5A), à une vitesse de balayage de 100 mV.s⁻¹ entre -0,6 V et 1,2 V par rapport à une électrode de pseudo-référence Ag/AgCl. Le dernier cycle est stoppé à 0,4 V vs Ag/AgCl pour obtenir un film à l'état oxydé Pt/PPy/PPy⁺PF₆⁻. Afin d'éviter de former un mur entourant les micropuits susceptible de gêner l'évacuation des mitochondries par rinçage, le nombre de cycles est limité à 10 contre 50, soit une épaisseur finale d'environ 10 μm au lieu d'environ 25 μm [7].

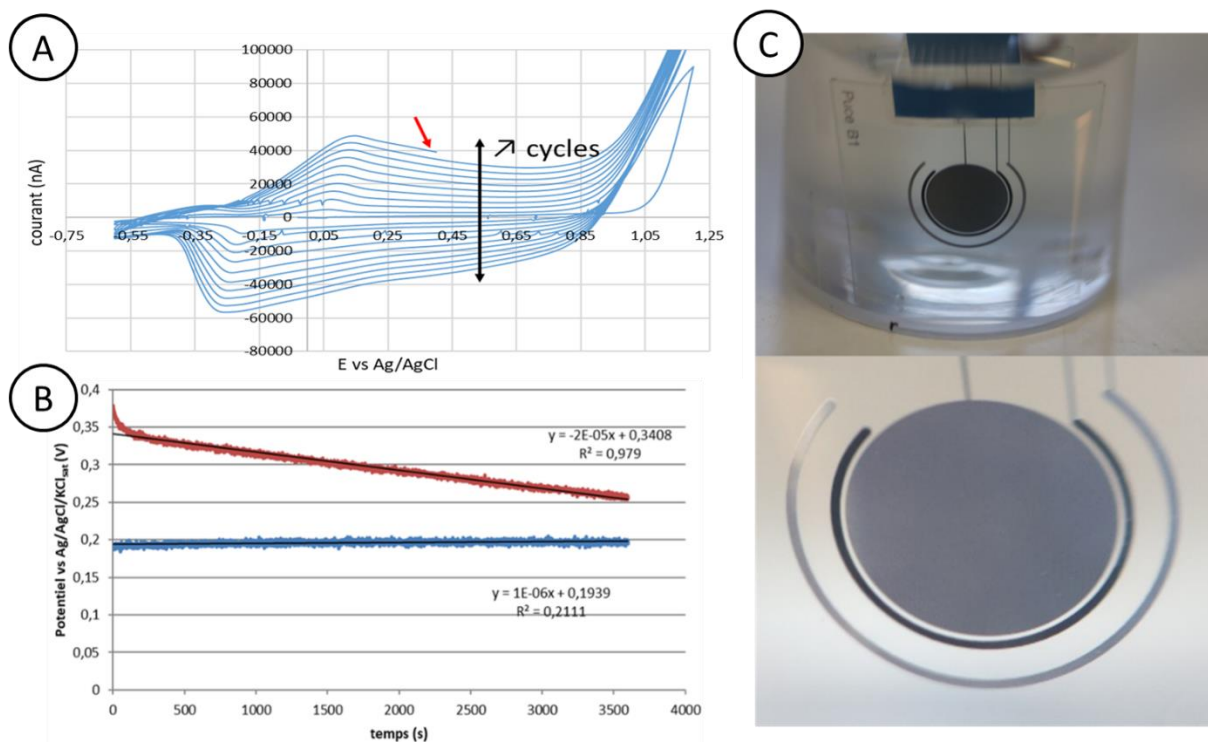


Figure 6 A : voltammogramme obtenu lors de l'électropolymérisation du pyrrole dans l'acétonitrile. La flèche rouge désigne la fin du dernier cycle. B : mesures simultanées des potentiels en circuit ouvert d'une électrode intégrée en platine (rouge) et d'une électrode Pt/PPy (bleu) pendant une heure par rapport à une électrode commerciale Ag/AgCl/KCl_{sat} dans une solution de KCl à 0,1 M. C : photographies de l'électrode de quasi-référence après électropolymérisation du pyrrole à la surface de la platine.

Suite à la polymérisation, un film noir est observable à la surface de l'électrode (Figure 5C). La stabilité de l'électrode de quasi-référence Pt/PPy est comparée simultanément à l'autre électrode surfacique en platine présente sur la puce. Leurs potentiels en circuit ouvert sont tous deux mesurés pendant une heure dans une solution aqueuse contenant du KCl à 0,1 M, par rapport à une électrode de référence commerciale de type Ag/AgCl/KCl_{sat} (Figure 5B). Les expériences impliquant des mitochondries isolées étant de l'ordre de la demi-heure. Une dérive de $-72 \text{ mV}\cdot\text{h}^{-1}$ est mesurée à l'électrode de platine contre $3,6 \text{ mV}\cdot\text{h}^{-1}$ pour l'électrode Pt/PPy. La stabilité de l'électrode est donc améliorée selon un facteur vingt suite à la formation de la couche de polypyrrole. Cette valeur de dérive est comparable à celle d'une électrode Ag/AgCl. Enfin, le potentiel d'équilibre mesuré vaut 200 mV vs Ag/AgCl/KCl_{sat}, il faudra tenir compte de cette valeur par la suite pour adapter les potentiels appliqués lors de dosages électrochimiques.

II.2 Modification de l'électrode de travail : électrodépôt de noir de platine

Le noir de platine est connu pour ses performances électrocatalytiques (abaissement des potentiels d'oxydations) vis-à-vis des espèces réactives oxygénées comme le peroxyde d'hydrogène. Une étude précédente, menée en collaboration avec l'équipe de Stéphane Arbault, a porté sur l'électrodéposition de noir de platine sur des UME disques planaires de rayon $10 \mu\text{m}$ [8]. La technique électrochimique de chronocoulométrie, consistant à appliquer un potentiel constant et à suivre l'évolution de la charge totale (correspondant à l'intégration du courant selon la durée) au cours du temps, permet de contrôler précisément l'épaisseur du dépôt, tandis que la formulation de la solution permet de jouer sur les

caractéristiques de porosité et d'adhérence [9]. La meilleure limite de détection (LOD) du peroxyde d'hydrogène a été obtenue pour une charge de $0,1 \mu\text{C} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. Dans ces conditions, une concentration en H_2O_2 de 10 nM a été détectée dans une solution saline de tampon phosphate (PBS).

Etant donné que les électrodes sont ici encastrées dans des micropuits, l'épaisseur du dépôt doit être particulièrement bien maîtrisée pour ne pas risquer de les boucher irréversiblement. De plus, même si la présence de la marche améliore la tenue mécanique du dépôt, celui-ci demeure fragile. La solution habituellement utilisée pour effectuer le dépôt est composée de 31,2 mM d'acide hexachloroplatinique et de 0,67 mM d'acétate de plomb dissout ou dilué dans du PBS. Dans notre contexte, la concentration en acétate de plomb est montée à 1,07 mM. Cela a comme effet d'améliorer la tenue mécanique du dépôt mais aussi de diminuer sa rugosité, donc le gain considérant le rapport surface/volume.

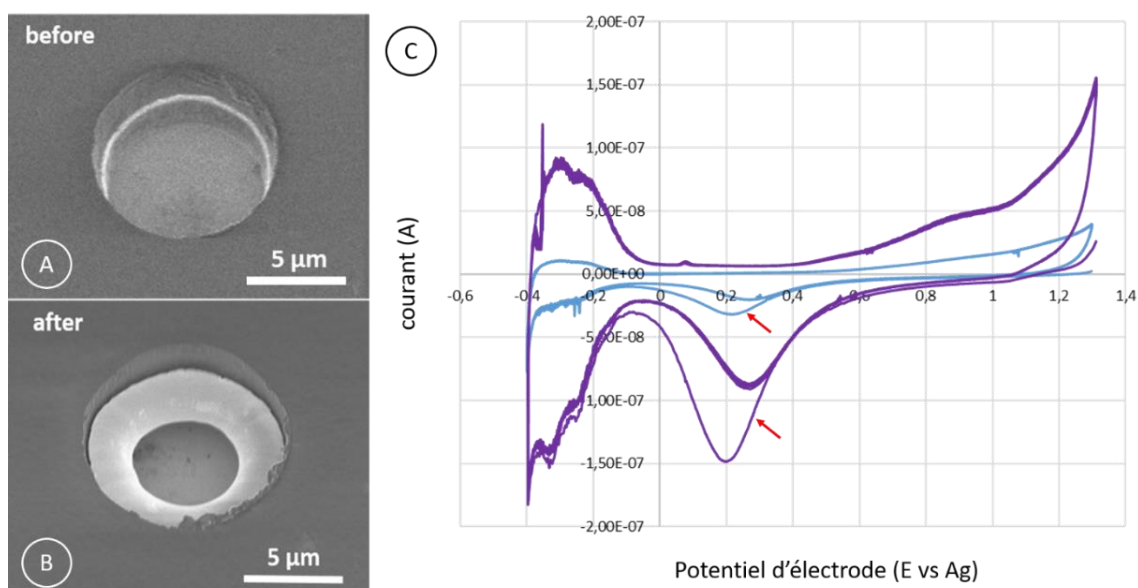


Figure 7 A : image MEB d'un micropuits avant électrodépôt de noir de platine. B : image MEB d'un micropuits après électrodépôt de noir de platine. C : Voltammogrammes obtenus dans une solution d'acide sulfurique 0,5 M avant (bleu) et après (violet) électrodépôt de noir de platine. Les flèches rouges indiquent le premier cycle.

La figure ci-dessus (Figure 6) montre un résultat obtenu pour un réseau de 100 micropuits de $4,5 \mu\text{m}$ de rayon et de distance centre-à-centre 20R obtenu avec la première génération des dispositifs ElecWell. Des images prises au microscope électronique à balayage montrent un puits avant (Figure 6A) et après (Figure 6B) électrodépôt de noir de platine. L'activation dans l'acide sulfurique (Figure 6C) met en évidence l'accroissement de la surface de l'électrode par l'augmentation du courant mesuré, mais aussi une signature électrochimique plus proche du platine massif (Figure 1A). En effet, le plateau correspondant à la formation des oxydes PtO est mieux défini, ce qui est aussi le cas des pics liés à l'électroactivité des protons.

II.3 Immobilisation d'anticorps

En vue d'immobiliser les mitochondries au fond des micropuits, une méthode consistant à immobiliser des anticorps spécifiques d'une protéine présente à la surface de la membrane externe mitochondriale a été développée. La protéine cible sélectionnée s'appelle VDAC pour voltage-dependent anion channel,

car elle est considérée comme la plus abondante [10]. VDAC est un port permettant l'entrée et la sortie de divers métabolites. Cibler ce port risque d'entraîner son inhibition [11], [12], donc de modifier l'activité métabolique des mitochondries analysées. Ce choix de cible n'est donc peut-être pas le plus judicieux. Néanmoins, le plus important ici est la validation de la méthode d'immobilisation, puisqu'elle reste adaptée à n'importe quel autre type d'anticorps.

Un anticorps prend la forme d'un Y et comporte trois sites de fixation. Les deux extrémités formées par le Y, sont deux points de fixation pour les cibles, alors que la base du Y peut servir à y fixer un anticorps qualifié de secondaire. Un anticorps secondaire est spécifique de l'hôte qui a servi à la production de l'anticorps primaire, qui est le plus souvent une souris, un rat ou un lapin. On parle d'isotypes. Les techniques classiques d'immunofluorescence s'effectuent en une ou deux étapes. Soit un anticorps primaire couplé à un élément fluorescent est directement mis en contact avec sa cible, soit un anticorps primaire non-marqué est mis en contact avec sa cible puis, dans un deuxième temps, un anticorps secondaire qui lui est couplé à un élément fluorescent, est ajouté pour se fixer à l'anticorps primaire. L'anti-VDAC dont nous disposons n'est pas fluorescent, un anticorps secondaire sera donc utilisé pour vérifier sa présence suite à l'électropolymérisation.

Emeline Descamps, membre de l'équipe MICA, a développé durant sa thèse une technique visant à immobiliser des sondes d'ADN [13], [14]. Nous avons travaillé ensemble afin d'adapter cette méthode à l'immobilisation d'anticorps. La solution utilisée est préparée à base de tampon phosphate 50 mM dans lequel est ajouté 50 mM de chlorure de sodium, 20 mM de pyrrole et 10% de glycérol. La variable est la concentration en anticorps. Plusieurs essais ont été réalisés en fonction des exemples disponibles dans la littérature [15]–[19] avant de converger, à l'instar de Moon et al. [17], sur la valeur de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. L'étape d'électropolymérisation est effectuée à l'aide d'un montage à deux électrodes. Un potentiel constant de 2,4 V vs Pt est appliqué pendant 250 ms. Au cours de la polymérisation, l'anticorps agit comme un contre-ion, c'est-à-dire qu'il est intégré au film se formant dans le but d'assurer son électroneutralité [19].

Après électropolymérisation, la puce est rincée abondamment (PBS et Tween® 20) et mise au contact d'une solution contenant de l'albumine de sérum de bœuf, connu sous le nom de BSA. La BSA, très répandue en laboratoires, permet de limiter les interactions non spécifiques du couple anticorps-antigène. Des contrôles, où le pyrrole est électropolymérisé en absence d'anti-VDAC, ont d'ailleurs montré qu'en absence de l'étape d'incubation à la BSA, l'anticorps secondaire vient se fixer par adsorption au film de polypyrrole (ce qui n'est pas le cas en présence de BSA). Cela constitue donc une manière alternative d'immobiliser des anticorps.

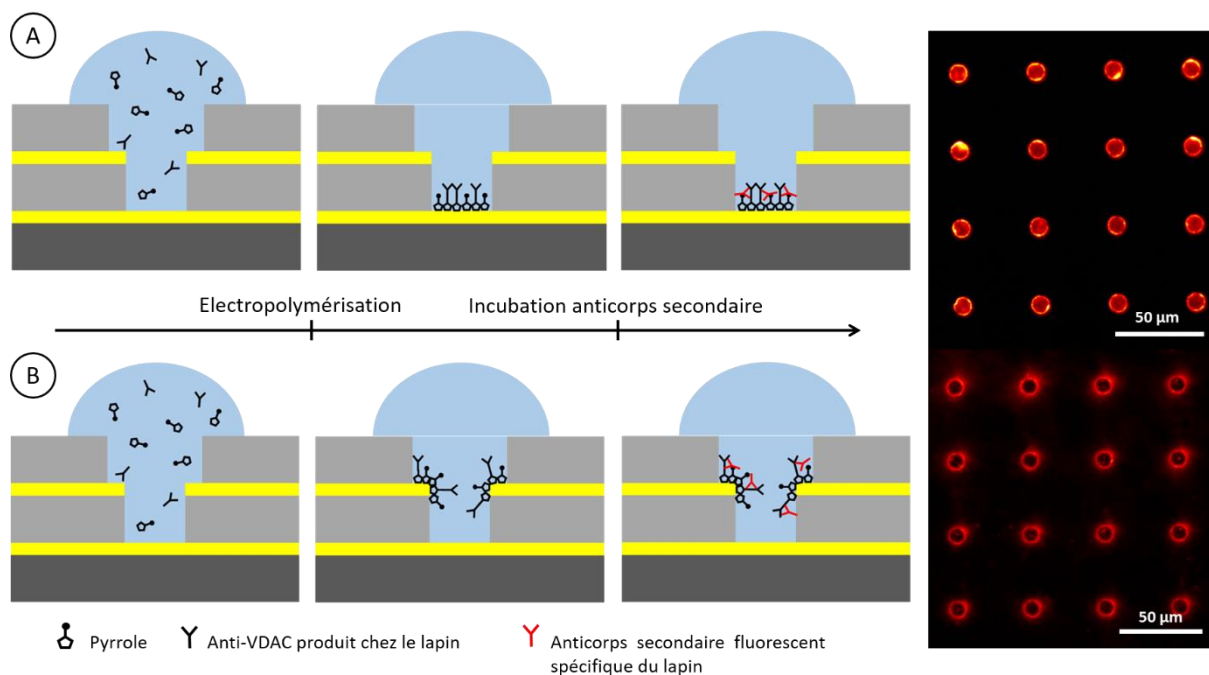


Figure 8 A : description des étapes réalisées pour la validation de l'immobilisation d'anti-VDAC à la DME et photographie obtenue par microscopie de fluorescence. B : description des étapes réalisées pour la validation de l'immobilisation d'anti-VDAC à la RNE et photographie obtenue par microscopie de fluorescence.

La figure ci-dessus (Figure 8) schématise le protocole réalisé afin d'immobiliser anti-VDAC à la DME (Figure 8A) ou à la RNE (Figure 8B). Les photos prises au microscope à fluorescence (à droite sur la figure) permettent de valider l'immobilisation localisée tout comme l'accessibilité des anticorps anti-VDAC, puisque les anticorps secondaires ne se fixent nulle part ailleurs (après étape d'incubation à la BSA). Par la suite, l'anticorps anti-VDAC est bien sûr destiné à être immobilisé à la DME, tandis que la RNE sera dédiée à la mesure électrochimique. On se réserve toutefois la possibilité d'immobiliser des enzymes (peroxydases ou superoxyde dismutase pour H_2O_2 et O_2^- respectivement) à la surface de la RNE par la même approche [20], [21]. Ces tests ont été réalisés avec la première génération des composants ElecWell disposant de DME en platine. Des essais supplémentaires ont donc été réalisés sur des lamelles verre/ITO pour s'assurer que la méthode utilisée reste efficace, ce qui est le cas.

Le premier objectif du développement de cette technique est l'immobilisation des mitochondries au fond des puits pour assurer leur bon positionnement, dont le taux de collecte est fonction, tout en permettant des rinçages plus efficaces afin d'évacuer celles restées en surface. Vu d'un autre angle, la DME forme dans ces conditions un véritable micro-biocapteur électrochimique, puisque le polypyrrole est un polymère conducteur. Nous verrons aussi prochainement que l'isolation des mitochondries est une étape relativement complexe, donc que la pureté de la préparation n'est pas toujours idéale. Les anticorps assurent la reconnaissance des mitochondries parmi l'ensemble de ce qui est susceptible d'être trouvé dans une préparation, comme des débris de membrane cellulaire ou d'autres organites. De plus, la formation du complexe anticorps-antigène est détectable par ampérométrie à la DME. On peut alors se permettre d'imaginer un système multiplexé, où le remplissage de chaque micropuits serait détecté sans assistance de l'optique grâce à la DME, puis sélectivement adressé pour une mesure via la RNE. Malgré tout, la limite de cette approche réside dans sa stabilité. En effet, pour réutiliser un immunocapteur, celui-ci doit subir une étape de régénération traduisant la séparation du couple antigène-anticorps [18]. Le nombre d'anticorps accessibles va alors décroître au fur et à mesure des utilisations.

Intéressons-nous désormais à la méthode mise en œuvre pour limiter l'adhérence des mitochondries potentiellement interférentes, en vue de rendre les rinçages plus efficaces.

II.4 Couche anti-biofouling

Une grande variété de matériaux, organiques ou inorganiques, est susceptible d'être rendue superhydrophobe [22] par nanostructuration et/ou par l'auto-assemblage de monocouches (SAMs) de matériaux sélectionnés à cet effet. Une autre option consiste à utiliser des matériaux capables de répulsion stérique, comme le polyéthylène glycol (PEG) qui est sûrement le plus répandu. Le PEG forme des chaînes polymériques dont la longueur est de l'ordre de la dizaine de nanomètres agissant à l'image de ressorts en mouvement perpétuel (en solution), à l'origine de ses propriétés anti-biofouling [23]. Couplé à de la poly-L-lysine (PLL), un polymère cationique chargé positivement à pH 7, il forme le PLL-g-PEG, particulièrement adapté à la méthode du « microcontact printing » (μ CP) [24]–[26]. Le μ CP consiste à transférer une SAM sur un substrat donné par tamponnage. La fabrication du tampon est inspirée des techniques utilisées dans le domaine de la microfluidique : du PDMS est réticulé à la surface d'une plaquette structurée par photolithographie (gravure du silicium ou dépôt de SU-8). Dans notre contexte, le tampon est souhaité plat pour reporter une couche de PLL-g-PEG sur toute la surface des puces ElecWell, en évitant l'intérieur des micropuits. Suite à un nettoyage au plasma O_2 , une SAM d'un agent hydrophobe (le perfluorodécyltrichlorosilane ou FDTS) est formée par évaporation à la surface d'une plaquette en silicium non-structurée. Cette étape sert uniquement à faciliter le démoulage du tampon suite à la réticulation du PDMS. Une fois découpé au scalpel, le tampon comme la puce ElecWell subissent à leur tour un plasma O_2 . En plus de nettoyer, le plasma génère en surface des terminaisons hydroxyles (OH^-) négativement chargées. Le terme activation est parfois utilisé dans ce cadre aussi. A la sortie du plasma, le tampon est mis en contact avec une solution de PBS contenant du PLL-g-PEG à concentration 1 mg/ml, ce qui va permettre la liaison entre les groupement hydroxyles et la PLL. Le tampon est ensuite séché sous un flux d'azote et mis en contact pendant deux minutes avec la puce pré-activée. Le transfert de la mono-couche PLL-g-PEG va alors s'opérer. Enfin, le bon déroulement de l'opération est vérifié par l'angle de contact mesuré entre une goutte d'eau statique et la puce fonctionnalisée (Figure 9C). Il est, pour des raisons évidentes, préférable de réaliser l'ensemble de ce protocole en salle blanche afin d'obtenir un résultat optimal.

Dans le but d'évaluer les performances anti-biofouling, des mitochondries isolées à partir d'une culture cellulaire leucémique (lignée MOLM14), sont marquées par la sonde fluorescente MitoTracker® green (MTG). Une goutte de 100 μ l de la préparation est déposée à la pipette à la surface de deux puces : l'une fonctionnalisée, l'autre non, puis cinq minutes sont dédiées à la sédimentation des mitochondries. La solution est ensuite aspirée à la pipette et une première observation de la face avant de la puce est effectuée au microscope confocal (Figure 9A). Un tel microscope possède l'avantage par rapport aux microscopes de fluorescence conventionnels, de proposer une fonction « mosaïque » permettant d'observer une large surface. Le nombre de particules (mitochondries uniques ou agrégats) observables à la longueur d'onde d'excitation du MTG est dénombré avant et après rinçage (Figure 9B). Le rinçage consiste à effectuer trois allers-retours avec une pipette contenant une solution de PBS, dont l'embout et le contenu sont renouvelés à chaque fois. Le comptage automatique est réalisé à l'aide d'une fonction du logiciel libre de traitement d'images FIJI, une version avancée du logiciel imageJ. L'exécution d'un algorithme permet de détecter les contours des formes à partir d'une image en noir et blanc, tandis qu'un

second les dénombre. On constate alors une réduction importante du nombre de particules observables avant comme après rinçage, attribuable à la fonctionnalisation au PLL-g-PEG.

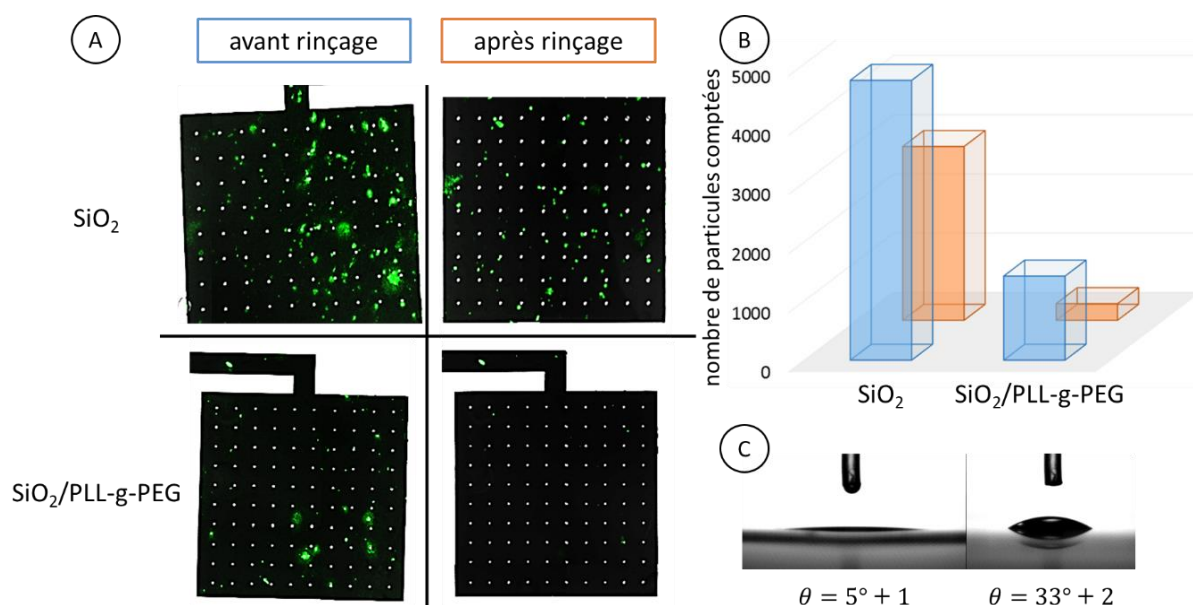


Figure 9 A : Superposition d'images capturées au microscope confocal d'un réseau de micropuits (lumière blanche) avec des mitochondries à sa surface (longueur d'onde d'excitation du MTG) avant et après rinçage, en présence ou en absence d'une couche de PLL-g-PEG déposée par μ CP. B : Nombre de particules détectées par traitement d'image (surface totale : 18,75 mm²) avant et après rinçage, en présence ou en absence d'une couche de PLL-g-PEG déposée par μ CP. C : mesures des angles de contact de gouttes d'eau déionisée déposées à la surface du verre (à gauche) ou du verre après dépôt de PLL-g-PEG par μ CP.

On peut d'ores et déjà s'attendre à ce que le dépôt de PLL-g-PEG sur les électrodes surfaciques nuise à leur conductivité. Fort heureusement, des méthodes existent pour sa désorption par application d'un potentiel aux électrodes [27], [28]. Cette méthode désignée LAEPT (pour « locally addressable electrochemical patterning technique ») et découverte sur le tard, pourrait d'ailleurs permettre de déposer le PLL-g-PEG par incubation plutôt que par μ CP, assurant de cette façon la présence de l'agent « anti-biofouling » sur les flancs des micropuits.

Les expériences présentées dans cette deuxième partie concernant l'immobilisation d'anticorps et le dépôt d'une couche de PLL-g-PEG ont été réalisées avec la première génération de composants ElecWell, avant la fabrication de la seconde. Pour des raisons évidentes, l'immobilisation d'anticorps à la DME par piégeage dans une matrice de polypyrrole nuit à l'observation au microscope de fluorescence par la face arrière. Cette étape de fonctionnalisation ne sera donc pas forcément mise en œuvre lors des expériences impliquant les mitochondries, mais elle constitue une option pour favoriser le remplissage des micropuits, et surtout, pour le détecter par voie électrochimiques plutôt qu'optique. De même, le dépôt de PLL-g-PEG par μ CP restera dans un premier temps optionnel, même si sa mise en œuvre est bien plus simple.

III Application finale : analyse de l'activité métabolique de mitochondries isolées

III.1 Méthodes d'isolation

L'isolation des mitochondries est effectuée à partir d'une population cellulaire issue d'une culture. La qualité des mitochondries isolées est donc directement liée à la qualité de la culture cellulaire, dont les principes doivent être évoqués. Une grande diversité de lignées cellulaires est commercialisée sous la forme de solutions congelées. Contrairement à la grande majorité des cellules, dont le nombre de divisions cellulaires est pré-déterminé (s'en suit l'apoptose), les cellules issues de lignées voient ce nombre tendre vers l'infini. Ceci peut être tout à fait normal s'il s'agit de lignées d'origine cancéreuse, ou provoqué artificiellement lorsque les lignées sont originaires de cellules saines. Suite à leur réception, les cellules peuvent être conservées sur le long terme ou directement mises en culture. La mise en culture consiste à décongeler les cellules, les diluer dans un milieu spécifique (dans notre cas le MEM α pour « minimum essential medium ») comportant l'ensemble des nutriments nécessaires à leur croissance, puis à les placer dans un incubateur stérile et ventilé, dont la température est régulée à 37°C. Le milieu de culture, dont le volume reste constant, est progressivement vidé de ses nutriments alors que le nombre de cellules consommatrices augmente continuellement suivant un rythme qui leur est propre. La figure suivante (Figure 10) schématise l'évolution du nombre de cellules au cours du temps si rien n'est fait.

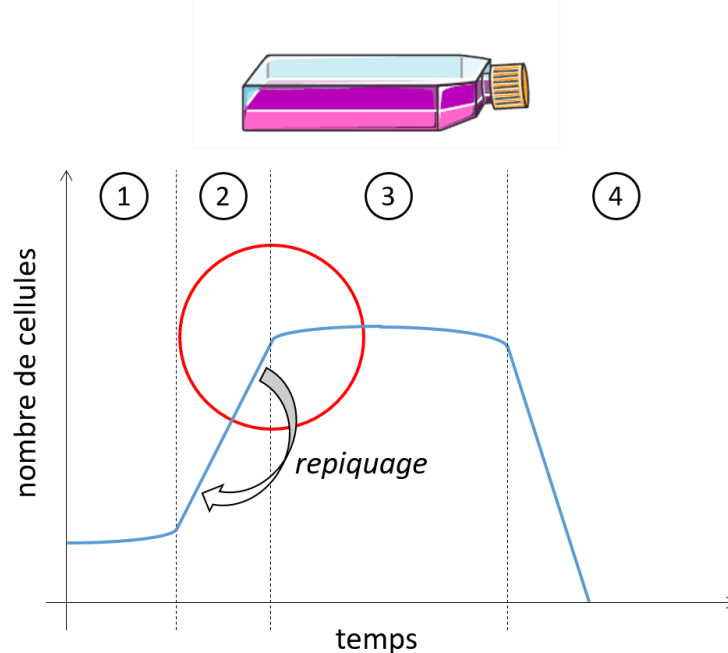


Figure 10 Représentation des différentes phases de l'évolution de la croissance d'une culture cellulaire au cours du temps. 1 : phase de latence. 2 : phase exponentielle. 3 : phase stationnaire. 4 : sénescence.

La première phase est celle de latence où le nombre de cellules reste à peu de chose près constant. Quand elles vont commencer à se diviser, leur nombre total va augmenter selon une tendance exponentielle, ce qui constitue la deuxième phase. A cause du manque d'espace et de nutriments, la division cellulaire va s'arrêter d'elle-même, les cellules entrent alors dans la phase stationnaire (phase 3). Enfin, l'épuisement du milieu va entraîner la mort des cellules, c'est la phase de sénescence (phase 4). Une culture cellulaire est bien faite si les cellules sont maintenues en phase exponentielle. Une étape désignée par les termes

passage ou repiquage, consiste à prélever régulièrement (lorsqu'on atteint la zone entourée en rouge sur la figure 10) une certaine quantité de cellules, puis à la diluer à une concentration donnée dans un milieu neuf. Pour des raisons de reproductibilité des expériences, le nombre de passage maximal est fixé à dix dans l'équipe RESISTAML. Après dix passages, les cultures cellulaires sont jetées et un nouvel aliquot du stock initial est sorti du congélateur. Enfin, l'isolation des mitochondries doit s'effectuer préférentiellement pendant la phase exponentielle de la croissance cellulaire.

Le protocole d'isolation des mitochondries à partir de cellules de lignée MOLM14 a été développé par Estelle Saland de l'équipe RESISTAML. Comme vu dans le premier chapitre, une cellule eucaryote contient une grande variété d'organites qui interagissent les uns avec les autres, comme les mitochondries avec le réticulum endoplasmique ou les microtubules constituant le cytosquelette. La première étape de l'isolation repose sur l'utilisation d'un « douce », un outil prenant la forme d'un piston s'insérant dans un capillaire en verre et portant le nom de son inventeur (Alexander Douce). Le douce permet de briser la membrane plasmique cellulaire par une action exclusivement mécanique, l'usage d'agents chimiques risquant d'agir aussi sur les membranes des organites intracellulaires. Une première étape de centrifugation (Figure 11A) permet de séparer les cellules non-lysées et les noyaux de tous les autres constituants cellulaires, tandis qu'une seconde à vitesse plus élevée, permet de séparer les mitochondries de la grande majorité des autres constituants cellulaires. Enfin, une étape éventuelle (car nécessitant une ultracentrifugeuse) d'ultracentrifugation est effectuée dans un gradient de Percoll® pour encore améliorer la pureté de la préparation mitochondriale¹³.

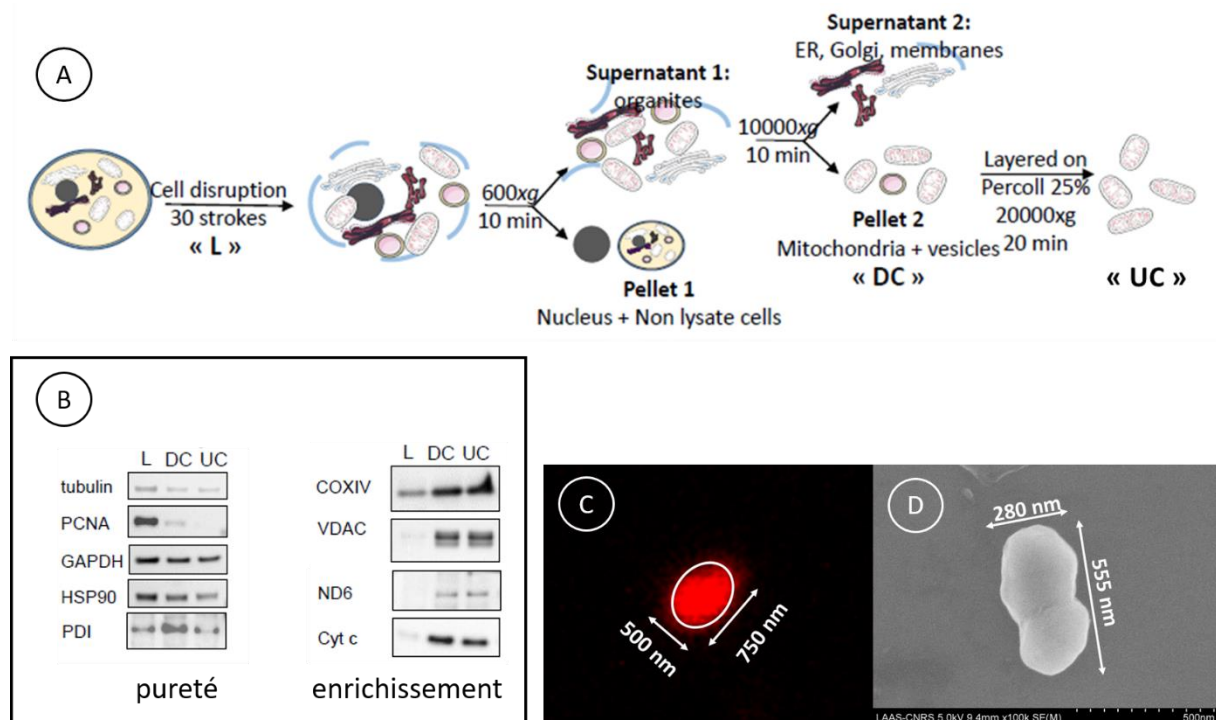


Figure 11 A : Description des différentes étapes nécessaires à l'isolation de mitochondries à partir d'une culture cellulaire. B : Western Blot réalisé pour vérifier la qualité de la préparation de la solution mitochondriale MOLM14. C : photographie prise au microscope confocal d'une mitochondrie unique marquée par la sonde fluorescente MitoTracker Red. D : image MEB d'une mitochondrie unique.

¹³ La technique MACS (pour magnetic activated cell sorting) peut éventuellement être mise en œuvre à la place de l'étape d'ultracentrifugation pour améliorer la pureté de la préparation [29]. Celle-ci consiste à mettre la solution en présence de complexes anticorps-billes magnétiques, puis de la faire passer dans une colonne entourée d'aimants puissants. Les mitochondries vont alors rester dans la colonne, contrairement à tout le reste.

Afin de déterminer sa pureté, un extrait de la préparation est utilisé pour un Western Blot. Cette technique très répandue dans les laboratoires de biologie, consiste à faire migrer des protéines dénaturées par électrophorèse. Il en résulte des bandes, dont la position (ou distance parcourue) indique la taille des protéines, et dont l'intensité donne une information sur leurs concentrations. Enfin, des anticorps spécifiques permettent leur identification. Le résultat (Figure 11B) montre que les composants cytoplasmiques (tubuline pour le cytosquelette ; PCNA pour le noyau ; GAPDH et HSP90 pour des enzymes cytoplasmiques ; PDI pour le réticulum endoplasmique) sont dans l'ensemble en concentrations très inférieures dans les portions mitochondriales « DC » et « UC » que dans le lysat cellulaire total « L ». A l'inverse, les composants mitochondriaux sont enrichis (COXIV pour le complexe IV ; VDAC pour VDAC ; ND6 pour le complexe I ; Cyt c pour le cytochrome c). Enfin, des observations optiques sont effectuées au microscope confocal (Figure 11C) et au MEB (Figure 11D) afin de s'assurer définitivement que les dimensions des mitochondries isolées à partir des cellules MOLM14 sont bien adaptées à celles des micropuits fabriqués.

Vérifier la pureté de la préparation n'est pas suffisant, il faut aussi s'assurer de la viabilité des mitochondries suite à leur isolation. Pour ce faire deux techniques sont privilégiées : la mesure de la consommation d'oxygène par une électrode de Clark en chambre d'oxygraphie, ou l'observation au spectrophotomètre voire directement au microscope à fluorescence, des variations du potentiel membranaire en fonction d'ajouts d'activateurs ou d'inhibiteurs spécifiques. Enfin, la concentration en mitochondries des préparations obtenues est évaluée par un test de Bradford. Ce test consiste à déterminer par colorimétrie la concentration en protéine d'une solution pour un volume donné. Comme le colorant utilisé est susceptible de marquer d'autres protéines que les mitochondries, le résultat obtenu par ce test risque d'être faussé si la préparation est impure.

III.2 Remplissage des micropuits

La première méthode mise en œuvre dans le but de remplir les micropuits repose sur la sédimentation. Cinq cents microlitres d'une solution où les mitochondries sont présentes en forte concentration (1 mg/ml) sont insérés dans la chambre fluide et vingt minutes d'attente sont effectuées pour les laisser sédimenter. Une observation au microscope est réalisée par la suite afin d'évaluer le taux de remplissage des puits par les mitochondries¹⁴. Si celui-ci est jugé trop faible, on recommence. Cette méthode présente comme avantage sa simplicité de mise en œuvre. En revanche, elle est chronophage et ne permet pas d'obtenir un taux de remplissage supérieur à 20 %.

La seconde piste explorée repose sur les méthodes d'assemblage de nanoparticules dispersées en solution : l'assemblage convectif et l'assemblage capillaire. Le premier désigne une technique basée sur l'évaporation d'un solvant déplacé à la surface d'un matériau hydrophile ($\theta < 20^\circ$) comme le SiO₂, structuré ou non (Figure 12A). Le second décrit l'arrangement de nanoparticules lors du déplacement d'une goutte à la surface d'un matériau hydrophobe ($20^\circ < \theta < 65^\circ$) structuré (Figure 12B), comme les puces ElecWell suite au dépôt de PLL-g-PEG par μ CP. Malaquin et al. [31] ont précisément décrit les différents phénomènes physiques impliqués, qui sont essentiellement : la concentration en particules, la température (ambiante et du substrat), l'hygrométrie, la taille et l'orientation des motifs présents sur le substrat, et la vitesse de déplacement de la goutte (de l'ordre du micromètre par seconde).

¹⁴ Cinq images sont capturées selon des positions choisies au hasard. Environ trente micropuits sont visibles par image. Leur remplissage (une ou plusieurs mitochondries) est détecté manuellement, mais la procédure peut être automatisée [30].

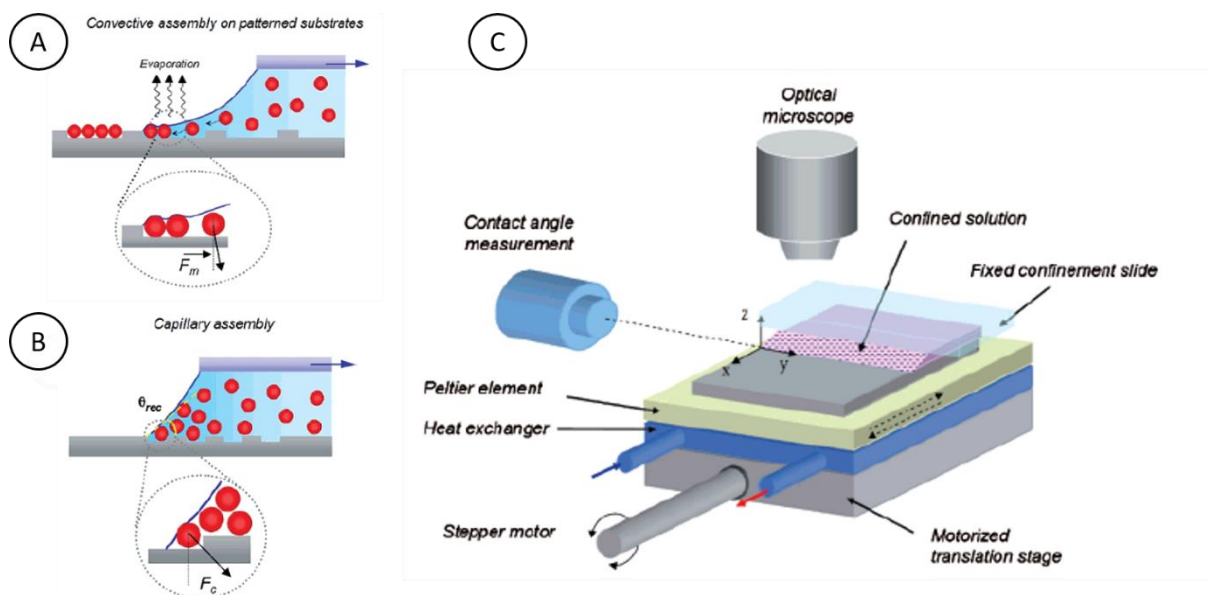


Figure 12 A : description du principe d'assemblage convectif de nanoparticules à la surface d'un substrat hydrophile structuré, d'après [31]. B : description du principe d'assemblage capillaire de nanoparticules à la surface d'un substrat hydrophobe structuré. C : outil nécessaire à leur mise en œuvre automatisée.

Ne disposant pas d'un système automatisé comme celui décrit Figure 12C, nous avons essayé cette méthode manuellement. Une goutte de la solution mitochondriale est déposée sur la puce, devant le réseau de micropuits, puis elle est déplacée à l'aide d'une lamelle en verre (disposée parallèlement à la puce) vers l'autre côté de la puce. Trois allers-retours sont effectués, puis le taux de remplissage est évalué au microscope. Avec cette approche 15 à 20% des puits sont remplis par une ou plusieurs mitochondries, alors qu'un essai réalisé exactement dans les mêmes conditions avec des billes de polystyrène de 100 nm de diamètre, fait monter ce nombre à 60%. D'ailleurs, les travaux de Malaquin et al. montrent que le remplissage de cavités par des nano-billes de polystyrène peut passer de 0 à 99% en faisant varier la température de seulement 5°C. Finalement, l'assemblage capillaire est une solution à fort potentiel, mais sa mise en œuvre efficace nécessite d'une part l'acquisition d'un outil sophistiqué, et d'autre part un travail conséquent sur l'optimisation de l'ensemble des paramètres. Nous nous sommes donc orientés vers une méthode moins subtile mais largement disponible : la centrifugation.

La pertinence de cette approche a été évaluée dans un premier temps avec des composants non-assemblés et un support fabriqué à base de PDMS, permettant de positionner correctement la puce et la goutte de solution mitochondriale dans la centrifugeuse. Si la concentration en mitochondries est maintenue à 1 mg/ml, le taux de remplissage obtenu suite à deux minutes de centrifugation à 300 tours par minute (noté rpm pour « rounds per minute »), est en moyenne de 90 %. Forts de ce succès, nous avons conçu et fabriqué un support compatible avec la fluidique de la puce ElecWell, afin de pouvoir réaliser cette même étape avec des composants assemblés (Figure 13).

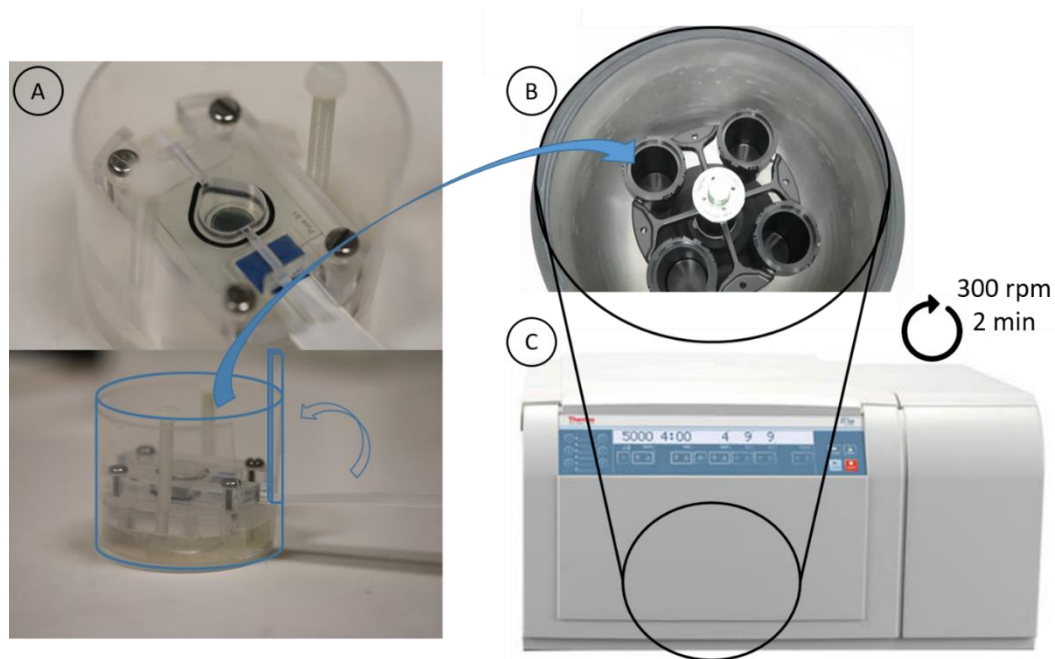


Figure 13 A : Photographie de la pièce réalisée pour rendre les puces ElecWell assemblées compatibles avec l'étape de centrifugation. B : vue de l'intérieur de la centrifugeuse. C : exemple de centrifugeuse compatible.

Disposant de moyens efficaces pour isoler les mitochondries et les positionner au fond des micropuits, nous pouvons désormais passer à l'analyse de leur activité métabolique.

III.3 Mesures optiques et électrochimiques

Les expériences présentées dans cette partie ont été réalisées à l'institut des sciences moléculaires (ISM) de Bordeaux sous la direction de Stéphane Arbault, avec son étudiant en thèse Camille Colin, biologiste de formation initiale et spécialisé dans les techniques de microscopie. L'ISM, ou plus précisément le laboratoire des nanosystèmes analytiques (NsysA), dispose au sein d'une de ses plateformes de l'ensemble des éléments nécessaires à l'analyse optique et électrochimique des métabolismes mitochondriaux, soit : une grande cage de Faraday, un microscope de fluorescence relié à un PC, un potentiostat relié à un autre PC, un incubateur, un poste de sécurité biologique (hotte stérile), et une centrifugeuse. De plus, en raison de leur durée de vie et donc pour des questions de logistique essentiellement, les mitochondries utilisées nous ont été fournies par l'équipe de Philippe Diolez de l'institut de rythmologie et modélisation cardiaque (IHU Lyric) de Bordeaux. Ces mitochondries, isolées à partir de cardiomyocytes, sont réputées pour être particulièrement actives métaboliquement. En d'autres termes, à nombre égal, les mitochondries d'origine cardiaque consomment plus d'oxygène que des mitochondries d'origine leucémique. Elles sont donc mieux adaptées si l'expérience vise davantage la validation du système ElecWell que l'analyse de la fonction mitochondriale, ce qui est le cas ici. La figure suivante (Figure 14) décrit schématiquement la configuration expérimentale mise en œuvre.

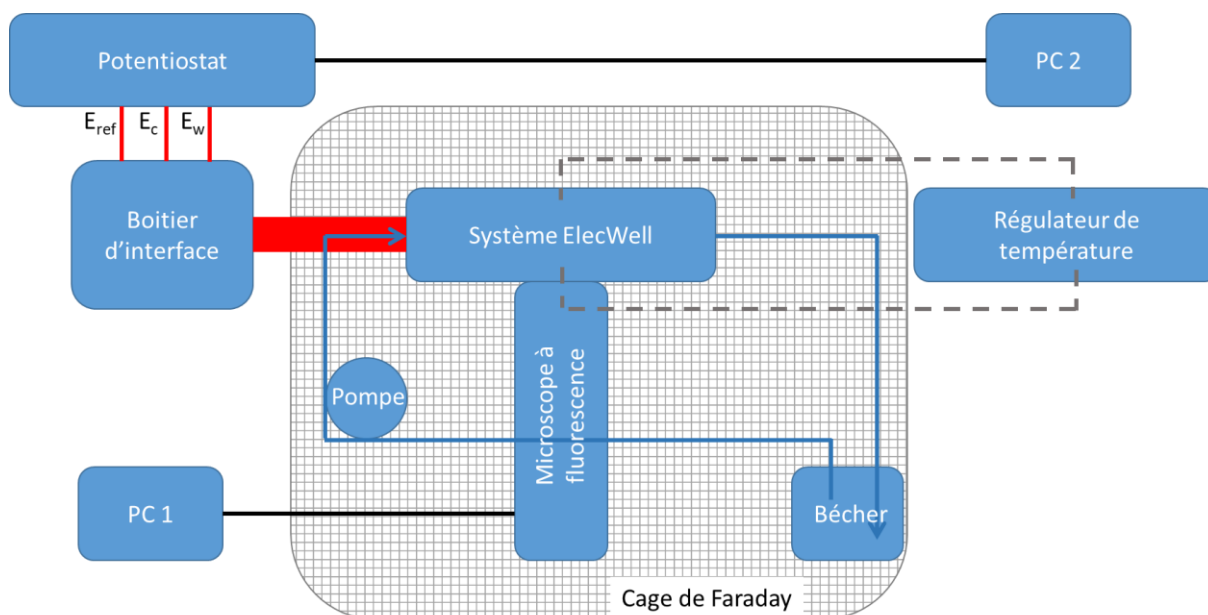


Figure 14 Schéma descriptif de la configuration expérimentale

Le système ElecWell déposé sur le microscope, est relié électriquement au potentiostat par l'intermédiaire du boîtier prévu à cet effet, et s'inscrit dans un circuit fluide ouvert au niveau d'un béccher. Ouvrir le circuit permet d'alimenter la solution en oxygène par diffusion depuis l'air, donc d'effectuer des mesures de longue durée (environ une demi-heure). Par ailleurs, l'ajout d'activateurs ou d'inhibiteurs de la fonction mitochondriale directement dans la chambre fluide (à deux entrées) à l'aide d'une seringue est source de bulles, dont la présence n'est absolument pas désirée. Les ajouts se font donc dans le béccher, pendant qu'une pompe péristaltique assure la circulation continue du fluide dans le circuit. Lors des expériences présentées ici, le système de régulation de température n'a pas été mis en place, c'est pourquoi le schéma montre des liens en pointillés.

Les résultats de simulations et de caractérisations électrochimiques précédemment obtenus ont montré qu'en chronoampérométrie l'état stationnaire est rapidement obtenu, donc que le puits est rapidement vidé de son contenu (considérant l'espèce réagissant à la RNE). Si l'espèce considérée est le dioxygène, le risque est l'asphyxie des mitochondries. De plus, on a vu dans le chapitre 2, que le produit de sa réduction à la surface d'une électrode de platine peut engendrer de fortes variations locales de pH (par la production d'ions hydroxydes OH^-), ou la production de ROS. Pour ces différentes raisons, nous nous sommes orientés vers une mesure par voltamétrie cyclique à une vitesse relativement élevée de $4 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ et avec des temporisations de trente secondes entre chaque cycle. La figure suivante contient une photographie de l'intérieur de la cage de Faraday (Figure 15A) et le blanc obtenu dans la configuration qui vient d'être décrite (Figure 15C). Soixante-trois cycles sont représentés, on remarque des variations lors du tracé des trois premiers cycles, puis le signal se stabilise. Le blanc permet de s'assurer qu'aucune variation de courant n'est détectée en absence de mitochondries, autrement dit que la concentration en oxygène demeure constante.

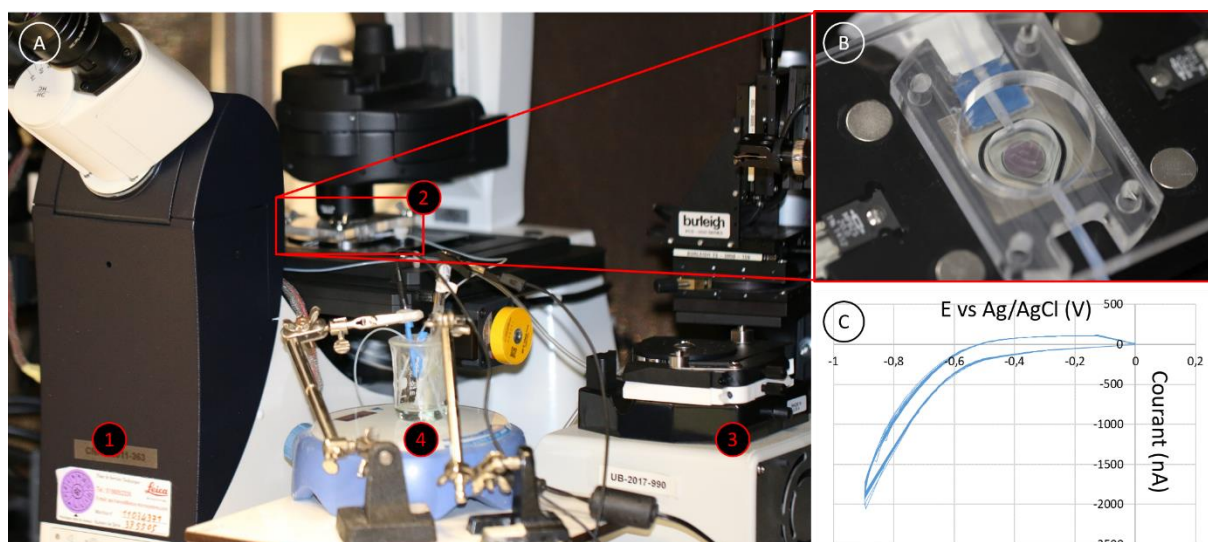


Figure 15 A : Photographie de la configuration expérimentale à l'intérieur de la cage de Faraday. B : Zoom sur le système ElecWell déposé sur le microscope, connecté fluidiquement et électriquement. C : Voltammogramme réalisé en absence de mitochondries mais dans le même milieu, à $4 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ avec 30 secondes de temporisation entre chaque cycle.

Avant chaque mesure électrochimique, un contrôle de viabilité est effectué par voie optique. La sonde fluorescente TMRM (pour Tetramethylrhodamine Methyl Ester Perchlorate), marqueur du potentiel membranaire, est introduite dans la préparation mitochondriale (100 nM), puis une goutte du mélange est déposée sur une lamelle de microscopie. Dans un premier temps, on compare le nombre de mitochondries visibles à la lumière blanche par rapport à celles visibles à la longueur d'onde d'excitation du TMRM. Cela donne rapidement une idée de la viabilité, car seul les mitochondries actives présentent un potentiel membranaire. Ensuite, différentes substances sont ajoutées à la pipette dans la goutte afin de vérifier leurs réponses. La figure suivante (Figure 16) présente une étape intermédiaire supplémentaire, dont le but est de s'assurer que nous sommes en mesure de détecter des variations de fluorescence dans les micropuits. En effet, pour rappel les composants ElecWell sont fabriqués à partir de plaquettes en verre de $500 \mu\text{m}$ d'épaisseur, avec une couche d'ITO d'environ 370 nm , tandis que les lamelles de microscopie dont l'épaisseur est comprise entre 130 et 170 nm n'ont pas d'ITO.

La figure 16 présente une puce ElecWell de seconde génération de type B ($R = 3 \mu\text{m}$; $N = 10\,000$) avec un taux de remplissage des micropuits proche de 100 %. Dans un premier temps, un mélange de glutamate et de malate est introduit dans la chambre pour fournir un substrat énergétique à la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (ETC). L'ajout d'ADP provoque un gain d'activité de l'ETC se traduisant par un abaissement du potentiel membranaire, donc du niveau de fluorescence du TMRM. Enfin, l'ajout d'atractyloside (ATR), un inhibiteur de l'ADP/ATP translocase, bloque l'entrée d'ADP depuis le cytoplasme vers la matrice mitochondriale, tout comme le passage de l'ATP dans le sens inverse, ce qui se traduit par une baisse d'activité de l'ETC et une augmentation du potentiel membranaire. Les barres d'erreurs présentes sur le graphique (Figure 16C) sont liées au fait que chaque mitochondrie est considérée individuellement, la courbe rouge représentant la valeur moyenne. La méthode de traitement d'image a été mise au point par Camille Colin à l'aide du logiciel libre imageJ. Finalement, cette expérience permet de valider l'ensemble de la configuration expérimentale et de passer aux analyses électrochimiques.

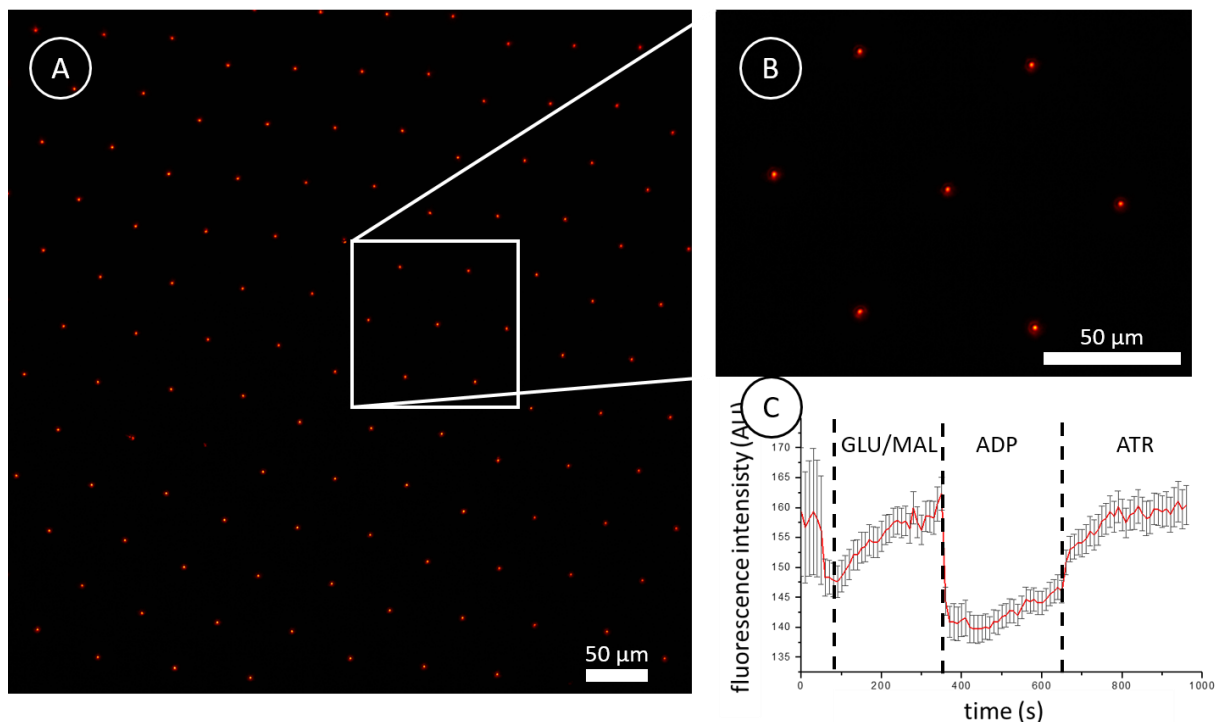


Figure 16 Photographie réalisée au microscope de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation de la sonde TMRM. B : Zoom sur une maille du réseau de micropuits avec 100% de taux de remplissage. C : Mesure des variations du potentiel membranaire mitochondrial après ajouts de glutamate/malate, d'ADP et d'ATR.

Les premiers essais de mesures par voie électrochimique ont remis en cause l'usage des électrodes surfaciques intégrées. En effet, nous avons pu constater que suite à l'étape de centrifugation, un film de mitochondries se forme à la surface des électrodes planaires, ce qui s'oppose à la circulation du courant (contre-réaction à la contre-électrode). Il existe sûrement des moyens inspirés de la LAEPT pour régler ce problème, néanmoins nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser des électrodes externes. Un fil d'argent chloré est introduit (pseudo référence Ag/AgCl) à l'entrée de la chambre (chambre fluide à deux entrées) alors qu'une tige de platine (contre-électrode) est introduite dans le tube à la sortie de la chambre grâce à un connecteur fluide en forme de Y. De la graisse de silicone sert à assurer l'étanchéité de l'ensemble. La figure suivante (Figure 17) expose les résultats obtenus. La figure 17A montre le type de voltamogramme obtenu. On constate que comparée au blanc (Figure 15C), la vague correspondant à la réduction de l'oxygène se rapproche progressivement de zéro, donc que la concentration en oxygène dissout diminue au cours du temps, donc que les mitochondries respirent¹⁵. Par la suite, les données sont traitées. A chaque cycle, la valeur du courant à -0,8 V vs Ag/AgCl (cycle aller) est extraite, puis une courbe (Figures 17B) exprimant la valeur du courant en fonction des cycles est construite. On obtient ainsi une courbe à l'image des variations de la concentration en oxygène dissout au cours du temps (1 cycle équivaut à 30,45 secondes). Enfin, à chaque ajout de substances agissant sur l'activité métabolique, la pente correspondante est extraite, ce qui correspond au flux de consommation d'oxygène des mitochondries, habituellement désigné par OCR pour « oxygen consumption rate », et représenté figure 17C.

¹⁵ La vitesse de diffusion de l'oxygène depuis l'air vers la solution (bêcher ouvert) étant plus lente que la consommation d'oxygène associée à l'activité des mitochondries.

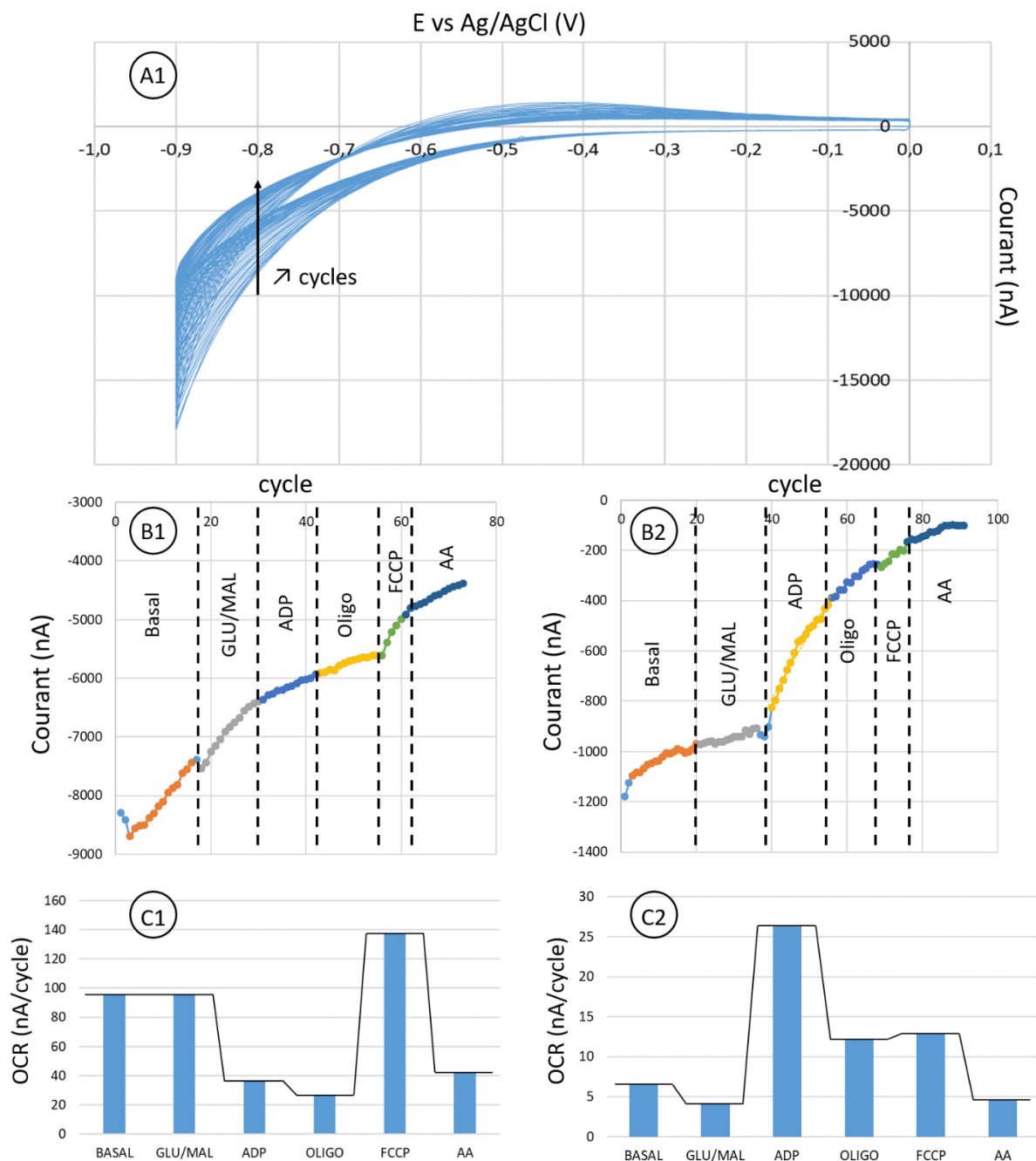


Figure 17 A : suivi par voltamétrie cyclique de la consommation d'oxygène au cours du temps par les mitochondries. B : courbes reconstruites à partir du voltammogramme, la valeur du courant mesuré à $-0,8$ V vs Ag/AgCl est exprimée en fonction des cycles. C : histogrammes correspondant au flux de consommation d'oxygène par les mitochondries (OCR) en fonction des différents ajouts de substrats et inhibiteurs.

Lorsque la mesure démarre, les mitochondries sont déjà au fonds des puits, on observe donc une respiration qualifiée de basale. On ajoute ensuite un mélange de glutamate et de malate, des substrats énergétiques, sensés provoquer une légère augmentation de la respiration. Ensuite de l'ADP est ajouté en solution, ce qui doit permettre à la chaîne mitochondriale de fonctionner à vitesse maximale. L'oligomycine est un inhibiteur de l'ATP synthase, dont l'action doit provoquer un fort ralentissement de la respiration, pour revenir à un niveau égal ou inférieur au basal. Le FCCP fait partie de la catégorie des découpleurs, dont l'action consiste à entrainer la fuite des protons depuis la matrice vers l'espace inter-membranaire. Pour tenter de compenser cette fuite, la chaîne va fonctionner à un rythme

particulièrement élevé, qui peut être comparable voire même supérieur à celui provoqué par ajout d'ADP. Enfin, de l'antimycine A, un inhibiteur du complexe III, est ajouté en solution pour provoquer l'arrêt de la respiration. Pour que chacune de ces substances ait un effet optimal, leurs concentrations finales, en fonction du nombre de mitochondries, doivent être parfaitement maîtrisées et optimisées, ce qui n'est pas encore le cas ici. Même si elles ne sont pas forcément en accord avec la théorie, on constate toutefois des variations plus ou moins importantes de l'OCR en fonction des ajouts. Ceci démontre que le signal est lié à l'activité mitochondriale. Plus de temps est nécessaire pour définir un protocole expérimental robuste, dont dépend la répétabilité des résultats. A titre de comparaison, la figure suivante (figure 18) présente un résultat obtenu avec l'outil SeaHorse, pour des mitochondries issues de cellules de muscles squelettiques de souris [32]. Le mélange glutamate/malate est ici ajouté avant le début de l'expérience. Ensuite, des activateurs ou inhibiteurs de l'ETC sont ajoutés selon une séquence strictement similaire à celle réalisée lors de nos expériences. On constate que le résultat présenté figure 17C2 est comparable avec celui présenté ci-dessous.

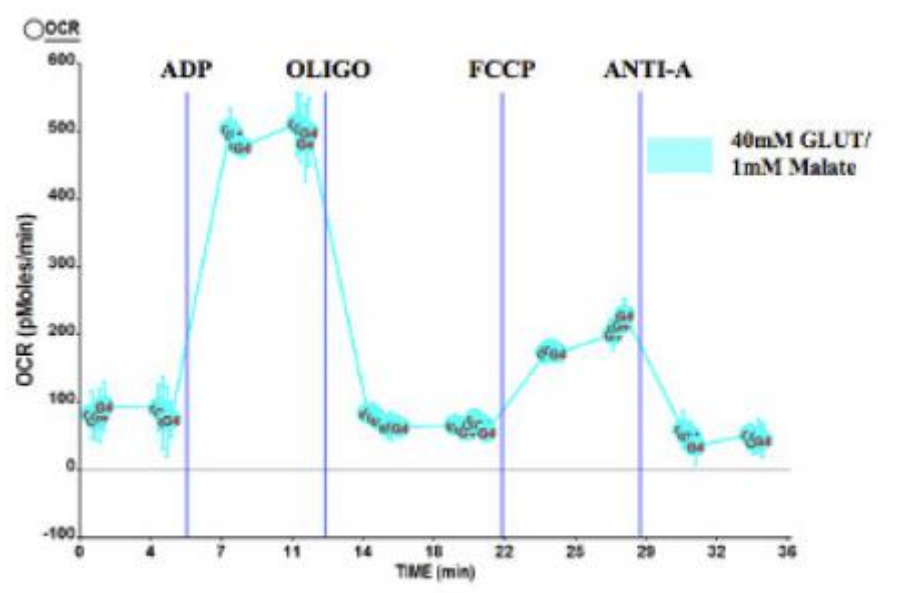


Figure 18 Mesure de l'OCR de mitochondries isolées à partir de muscles squelettiques de souris avec l'outil SeaHorse, d'après [32].

Conclusion

Tout d'abord, les différentes caractérisations nous ont permis de vérifier, qu'à l'exception des DME en ITO intégrées dans des puits de 1,5 μm de rayon, les performances électrochimiques des microdispositifs fabriqués sont en accord avec la théorie (exigence 7). Le régime de diffusion de type hémisphérique est assuré, avec un taux de collecte de l'ordre de 90%.

Ensuite, différentes méthodes visant la modification des états de surfaces ont été développées et validées. Plusieurs d'entre elles sont basées sur l'électropolymérisation du pyrrole. La formation d'un film PPy/PPy⁺PF₆⁻ à la surface du platine, conduit à la réalisation d'une électrode de quasi-référence, dont la stabilité est comparable aux pseudo-références Ag/AgCl classiques. Par ailleurs, son électropolymérisation à partir d'une solution aqueuse contenant des anticorps mène à leur immobilisation localisée à la DME, c'est-à-dire au fond des puits (exigence 4). La même méthode est

applicable à l'immobilisation d'enzymes, susceptibles d'augmenter la sensibilité et la sélectivité de l'électrode de travail vis-à-vis des espèces réactives oxygénées. Plutôt que d'immobiliser des enzymes dont l'activité baisse au cours du temps, on peut choisir d'électrodéposer du noir de platine à la surface de RNE (exigence 8). Des résultats encourageants ont été obtenus dans ce contexte. Le risque cette fois est d'obtenir un dépôt particulièrement fragile, ou pire, de boucher irréversiblement les micropuits. Enfin, pour favoriser le positionnement des mitochondries et l'évacuation par rinçage de celles potentiellement interférentes, du PLL-g-PEG a été déposé à la surface des dispositifs par tamponnage (exigences 4 et 5).

Après avoir essayé différentes approches, celle de la centrifugation s'est montrée la plus efficace concernant le remplissage des micropuits par des mitochondries. Nous avons obtenu un taux de remplissage proche de 100% à partir d'une solution mitochondriale concentrée à 1 mg/ml. La compatibilité du système ElecWell avec un système commercial a été vérifiée et validée. Il s'intègre dans une configuration expérimentale relativement complexe, puisqu'elle comprend la gestion des fluides, l'observation par microscopie de fluorescence, et le raccordement à un potentiostat. Les premiers résultats obtenus avec des mitochondries d'origine cardiaque sont encourageants. Des tendances se dégagent en fonction des différents ajouts en substrats et inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Néanmoins, un travail conséquent doit être mis en œuvre pour optimiser le protocole expérimental et obtenir des résultats de manière répétable. Une fois celui-ci accompli, nous pourrions soit nous orienter vers l'analyse de mitochondries moins actives comme celles d'origine leucémique, soit réduire le nombre de mitochondries cardiaques analysées (les dispositifs adaptés étant déjà disponibles). Pour finir, nous pourrions nous orienter vers la détection d'autres métabolites divers et variés, en commençant par le peroxyde d'hydrogène.

Bibliographie

- [1] D. A. J. Rand and R. Woods, "A study of the dissolution of platinum, palladium, rhodium and gold electrodes in 1 M sulphuric acid by cyclic voltammetry," *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 35, no. 1, pp. 209–218, 1972.
- [2] B. V. Tilak, B. E. Conway, and H. Angerstein-Kozłowska, "The real condition of oxidized Pt electrodes: Part III. Kinetic theory of formation and reduction of surface oxides," *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 48, no. 1, pp. 1–23, 1973.
- [3] H. Angerstein-Kozłowska, B. E. Conway, and W. B. A. Sharp, "The real condition of electrochemically oxidized platinum surfaces: Part I. Resolution of component processes," *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 43, no. 1, pp. 9–36, 1973.
- [4] F. Sékli Belaidi *et al.*, "Integration of ring nanoelectrodes into microwells for the bioelectrochemical analysis in sub-picolitre volumes," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 232, pp. 345–356, Sep. 2016.
- [5] A. Oleinick, F. Zhu, J. Yan, B. Mao, I. Svir, and C. Amatore, "Theoretical Investigation of Generator-Collector Microwell Arrays for Improving Electroanalytical Selectivity: Application to Selective Dopamine Detection in the Presence of Ascorbic Acid," *ChemPhysChem*, vol. 14, no. 9, pp. 1887–1898, Jun. 2013.
- [6] J. Ghilane, P. Hapiot, and A. J. Bard, "Metal/Polypyrrole Quasi-Reference Electrode for Voltammetry in Nonaqueous and Aqueous Solutions," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 19, pp. 6868–6872, Oct. 2006.
- [7] C. Duarte-Guevara *et al.*, "On-chip metal/polypyrrole quasi-reference electrodes for robust ISFET operation," *The Analyst*, vol. 140, no. 10, pp. 3630–3641, 2015.
- [8] S. Ben-Amor *et al.*, "Enhanced Detection of Hydrogen Peroxide with Platinized Microelectrode Arrays for Analyses of Mitochondria Activities," *Electrochimica Acta*, vol. 126, pp. 171–178, Apr. 2014.
- [9] Salem Ben-amor, "Capteurs électrochimiques pour la caractérisation du métabolisme oxydatif mitochondrial," PhD Thesis, Université Bordeaux 1, 2013.
- [10] R. P. Gonçalves, N. Buzhysnysky, and S. Scheuring, "Mini review on the structure and supramolecular assembly of VDAC," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 40, no. 3, pp. 133–138, Jun. 2008.
- [11] F. Elinder *et al.*, "Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic stimuli," *Cell Death Differ.*, vol. 12, no. 8, pp. 1134–1140, 2005.

- [12] S. Shimizu, Y. Matsuoka, Y. Shinohara, Y. Yoneda, and Y. Tsujimoto, "Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells," *J. Cell Biol.*, vol. 152, no. 2, pp. 237–250, 2001.
- [13] F. Deiss, S. Laurent, E. Descamps, T. Livache, and N. Sojic, "Opto-electrochemical nanosensor array for remote DNA detection," *The Analyst*, vol. 136, no. 2, pp. 327–331, 2011.
- [14] E. Descamps *et al.*, "Functionalization of optical nanotip arrays with an electrochemical microcantilever for multiplexed DNA detection," *Lab. Chip*, vol. 13, no. 15, p. 2956, 2013.
- [15] S. Bender and O. A. Sadik, "Direct electrochemical immunosensor for polychlorinated biphenyls," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 32, no. 6, pp. 788–797, 1998.
- [16] L. Grosjean *et al.*, "A polypyrrole protein microarray for antibody–antigen interaction studies using a label-free detection process," *Anal. Biochem.*, vol. 347, no. 2, pp. 193–200, Dec. 2005.
- [17] J.-M. Moon, Y. Hui Kim, and Y. Cho, "A nanowire-based label-free immunosensor: Direct incorporation of a PSA antibody in electropolymerized polypyrrole," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 57, pp. 157–161, Jul. 2014.
- [18] A. Ramanaviciene and A. Ramanavicius, "Application of Polypyrrole for the Creation of Immunosensors," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 32, no. 3, pp. 245–252, Jul. 2002.
- [19] O. A. Sadik, M. J. John, G. G. Wallace, D. Barnett, C. Clarke, and D. G. Laing, "Pulsed amperometric detection of thaumatin using antibody-containing poly (pyrrole) electrodes," *Analyst*, vol. 119, no. 9, pp. 1997–2000, 1994.
- [20] S. S. Razola, B. L. Ruiz, N. M. Diez, H. B. Mark, and J. M. Kauffmann, "Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 17, no. 11, pp. 921–928, 2002.
- [21] S. Descroix and F. Bedoui, "Evaluation of the Selectivity of Overoxidized Polypyrrole/Superoxide Dismutase Based Microsensor for the Electrochemical Measurement of Superoxide Anion in Solution," *Electroanalysis*, vol. 13, no. 7, pp. 524–528, 2001.
- [22] E. J. Falde, S. T. Yohe, Y. L. Colson, and M. W. Grinstaff, "Superhydrophobic materials for biomedical applications," *Biomaterials*, vol. 104, pp. 87–103, Oct. 2016.
- [23] M. Heuberger, T. Drobek, and N. D. Spencer, "Interaction Forces and Morphology of a Protein-Resistant Poly(ethylene glycol) Layer," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 1, pp. 495–504, Jan. 2005.
- [24] G. Csucs, R. Michel, J. W. Lussi, M. Textor, and G. Danuser, "Microcontact printing of novel copolymers in combination with proteins for cell-biological applications," *Biomaterials*, vol. 24, no. 10, pp. 1713–1720, May 2003.
- [25] J. Fink *et al.*, "Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques," *Lab Chip*, vol. 7, no. 6, pp. 672–680, 2007.
- [26] V. Saravia *et al.*, "Bacterial protein patterning by micro-contact printing of PLL-g-PEG," *J. Biotechnol.*, vol. 130, no. 3, pp. 247–252, Jun. 2007.

- [27] C. S. Tang, P. Schmutz, S. Petronis, M. Textor, B. Keller, and J. Vörös, “Locally Addressable Electrochemical Patterning Technique (LAEPT) applied to poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) adlayers on titanium and silicon oxide surfaces,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 91, no. 3, pp. 285–295, Aug. 2005.
- [28] S. Shah, H. Zhu, J. Yan, S. Verkhoturov, and A. Revzin, “Designing Electroactive Biointerface for Spatiotemporal Control of Cell Attachment and Release,” 2008, pp. 17–25.
- [29] H.-T. Hornig-Do, G. Günther, M. Bust, P. Lehnartz, A. Bosio, and R. J. Wiesner, “Isolation of functional pure mitochondria by superparamagnetic microbeads,” *Anal. Biochem.*, vol. 389, no. 1, pp. 1–5, Jun. 2009.
- [30] N. Kachouie, L. Kang, and A. Khademhosseini, “Arraycount, an algorithm for automatic cell counting in microwell arrays,” *BioTechniques*, vol. 47, no. 3, pp. x–xvi, Sep. 2009.
- [31] L. Malaquin, T. Kraus, H. Schmid, E. Delamarche, and H. Wolf, “Controlled Particle Placement through Convective and Capillary Assembly,” *Langmuir*, vol. 23, no. 23, pp. 11513–11521, Nov. 2007.
- [32] N. E. Boutagy, G. W. Rogers, E. S. Payne, M. M. Ali, M. W. Hulver, and M. I. Frisard, “Using Isolated Mitochondria from Minimal Quantities of Mouse Skeletal Muscle for High throughput Microplate Respiratory Measurements,” *J. Vis. Exp.*, no. 104, Oct. 2015.

Conclusion générale

Les leucémies aiguës sont classées par le centre international de la recherche sur le cancer (CIRC) au 20^{ème} rang en terme d'incidence, mais au 16^{ème} en terme de mortalité. Des cellules résistantes rendent les traitements inefficaces en provoquant la rechute, traduisant la réapparition des blastes en grande quantité dans la moelle osseuse et le sang. On sait désormais que ces cellules sont résistantes parce qu'elles bénéficient d'un statut énergétique et métabolique particulier, leur permettant de surmonter l'agression que représente le traitement de chimiothérapie. Il a aussi été montré qu'en ciblant la mitochondrie, on peut modifier le statut énergétique des cellules leucémiques et sensibiliser celles qui étaient alors jusque-là résistantes. Que les cellules soient saines ou tumorales, il existe une hétérogénéité cellulaire. De même, il existe une hétérogénéité mitochondriale au sein de la cellule unique. Si l'on souhaite être en mesure de maîtriser parfaitement les mécanismes liant métabolisme et chimiorésistance, il est nécessaire de développer des outils d'analyse à plusieurs échelles : population cellulaire, cellule unique, population de mitochondries isolées, et mitochondrie unique. Sur la base de ce constat et avec cette double perspective de recherche fondamentale et médicale, le projet MITAML vise le développement d'un microdispositif permettant l'analyse parallélisée de l'activité métabolique de mitochondries isolées.

Après avoir fait l'état de l'art des technologies disponibles, nous avons choisi de nous orienter vers la fabrication de micropuits aux fonds transparents instrumentés d'électrodes, offrant une analyse couplée par voies optique et électrochimique. Un modèle théorique permettant de prédire la valeur du courant limite mesurée a été développé dans le cadre de la polarisation d'une électrode de travail annulaire placée dans un double encastrement. Les paramètres géométriques de la structure ont par la suite été optimisés dans une simulation. En plaçant l'électrode annulaire à mi-hauteur dans un puits de 5 μm de profondeur, le taux de collecte obtenu varie entre 80% et 90% quand le rayon du micropuits varie entre 4,5 μm et 1,5 μm . De plus, pour éviter le recouvrement des couches de diffusion et assurer un fonctionnement indépendant, il faut séparer les puits les uns des autres d'une distance valant au moins vingt fois la valeur du rayon.

Un procédé technologique basé sur la gravure d'un empilement de matériaux a été développé et validé. Des puits de 4,5 μm et 3 μm de rayon, intégrant une électrode annulaire et une électrode disque toutes deux constituées de platine, ont été fabriqués dans le cadre du projet NANOMITO (2012-2015). Le projet suivant, le projet MITAML (2015-2018), a permis le développement de la seconde génération des dispositifs ElecWell. Celle-ci comprend deux électrodes planaires supplémentaires, constituant ainsi une cellule électrochimique autonome. L'électrode disque précédemment constituée de platine et cette fois constituée d'ITO, un matériau transparent. Les dimensions des puces ont été adaptées à une solution commerciale permettant la gestion des fluides ainsi que la thermorégulation, tout en assurant la compatibilité du système complet avec des observations par microscopie (*via* la face arrière des dispositifs). Enfin, le rayon des micropuits a été réduit à 1,5 μm pour limiter le nombre de mitochondries susceptibles d'y entrer, sachant que leur diamètre moyen est légèrement inférieur au micromètre.

En parallèle de ce travail, plusieurs techniques ont été développées avec l'objectif d'améliorer les performances du capteur (stabilité, sensibilité et sélectivité), et la manipulation des éléments biologiques, c'est-à-dire le positionnement des mitochondries par rapport à l'électrode de travail. Pour commencer, le pyrrole a été utilisé pour fabriquer une microélectrode de quasi-référence tout solide.

Son électropolymérisation à la surface d'une électrode de platine entraîne la stabilisation du potentiel mesuré en circuit ouvert. Comparées à des pseudo-références classiques en Ag/AgCl, celles en Pt/PPy ne présentent aucun risque de dissolution, ni d'exposition des mitochondries à l'argent qui est un matériau bactéricide. Pour gagner en sensibilité, nous avons exploré la piste de l'électro-dépôt de noir de platine, dont les propriétés sont particulièrement adaptées à la détection du peroxyde d'hydrogène. Une autre option est l'immobilisation d'enzymes au sein d'une matrice formée par un polymère conducteur comme le polypyrrole. Cette piste a été explorée indirectement dans le cadre d'une autre problématique, celle de l'immobilisation localisée d'anticorps. L'électropolymérisation du pyrrole en présence d'anticorps permet leur immobilisation à la surface de l'électrode de travail, autrement dit sur toute la surface formant le fond du puits, ou au niveau de l'anneau de platine situé à mi-hauteur. Si les anticorps sont spécifiques d'une protéine de la membrane externe mitochondriale, alors ils agiront comme une colle, avec le grand avantage de la reconnaissance spécifique. Enfin, pour favoriser le guidage des mitochondries vers les puits et l'évacuation de celles restant en surface, un matériau hydrophobe, le PLL-g-PEG, peut être reporté sur la puce par tamponnage.

Après avoir essayé différentes approches comme la sédimentation et l'assemblage par capillarité, le moyen le plus efficace pour remplir les micropuits s'est avéré être une étape de centrifugation. Nous avons donc conçu et fabriqué un système fluide permettant de réaliser cette étape malgré la présence de la connectique sur la puce. La première génération de capteurs a permis de détecter la respiration de mitochondries isolées à partir de levure, sachant que le taux de remplissage était alors de 20%. La seconde génération a quant à elle permis de détecter la respiration de mitochondries isolées à partir de cardiomyocytes, avec cette fois un taux de remplissage oscillant autour de 90%. Dans les deux cas, des réseaux de 10^4 puits ont été utilisés. On constate des variations du flux de consommation d'oxygène en fonction d'ajouts de substrats et inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, donc que le signal est bien à attribuer aux mitochondries.

Il demeure toutefois nécessaire de répéter les expériences jusqu'à obtenir un protocole expérimental robuste assurant la répétabilité des résultats. Dans les faits, ceci constitue un obstacle particulièrement difficile à franchir car la répétabilité des résultats ne dépend pas seulement du capteur et de la configuration expérimentale, elle dépend aussi de la préparation mitochondriale. Avec le vivant, le nombre de variables explose. Idéalement, il faudrait que la préparation mitochondriale soit toujours issue de la même source et que le protocole d'isolation soit toujours réalisé strictement de la même manière. De plus, on travaille avec des mitochondries « fraîches », c'est-à-dire qu'elles sont analysées juste après leur isolation, sans aucune étape de congélation. Les conditions de transport et de stockage sont alors essentielles. Plutôt que de vouloir obtenir au plus vite des résultats d'intérêt, dans le cadre du traitement de la leucémie aiguë myéloïde ou dans un autre, il vaudrait peut-être mieux se focaliser dans un premier temps sur un type de mitochondries largement étudié et largement accessible, comme celles issues de levure. Ce n'est qu'après avoir obtenu des résultats de manière répétable, que nous pourrions : soit choisir de changer de mitochondries, soit choisir de détecter autre chose que l'oxygène, soit choisir de réduire la taille des réseaux utilisés pour passer de 10^4 , à 10^2 , et finalement s'orienter vers l'analyse de l'activité métabolique à l'échelle de la mitochondrie unique.

Pour conclure, la technologie ElecWell ayant fait l'objet d'un brevet (soumis le 07/07/2017, référencé BCT170120HOH) manque encore de maturité mais présente un énorme potentiel, dont la plus grande reconnaissance est probablement une présentation au format « Keynote » lors de la conférence Biosensors 2016.

Perspectives

Compte tenu du temps et des moyens humains limités, certaines pistes d'amélioration identifiées n'ont pu être développées au cours des travaux de thèse. Ces différentes pistes sont évoquées ici, tout comme d'autres, dont la réalisation est davantage soumise au doute, mais c'est tout l'intérêt d'une perspective.

Détection électrochimique d'espèces autres que l'oxygène

Le platine nu, à l'image de l'électrode de Clark, est très bien adapté à la mesure de l'oxygène dissout. En revanche, pour s'orienter vers la détection d'autres espèces électroactives, il est souvent nécessaire de modifier la surface de l'électrode, soit pour faciliter le transfert électronique entre l'espèce d'intérêt et le matériau d'électrode, soit pour assurer la sélectivité ou au moins limiter l'influence des interférents.

Nous avons déjà largement évoqué la solution du noir de platine dans le cadre de la détection du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) mais il est aussi adapté à la détection d'espèces appartenant à la famille des espèces réactives azotées [1] comme l'oxyde nitrique ($NO\cdot$), l'ion nitrite (NO_2^-), ou l'ion peroxy nitrite ($ONOO^-$). La détection de quinones à la surface du platine nanostructuré a elle aussi été rapportée [2].

L'immobilisation d'enzymes, par piégeage par électropolymérisation ou autre, est une approche alternative pour améliorer la sensibilité et la sélectivité d'un capteur vis-à-vis d'une espèce spécifique. La glucose oxydase est très largement utilisée pour les capteurs à glucose. On pourrait aussi détecter le lactate grâce à l'enzyme lactate déshydrogénase. La catalase ou les différentes peroxydases sont adaptées à la détection d' H_2O_2 . La superoxyde dismutase est quant à elle adaptée à la détection de l'anion superoxyde, mais compte tenu de son caractère hautement réactif, il semble plus prudent de se concentrer sur la détection d' H_2O_2 . Pour conclure sur cette option, si une enzyme existe, alors il est envisageable de détecter par voie électrochimique l'espèce qui lui est associée.

Une dernière approche pourrait consister à immobiliser à la surface de l'électrode de travail des éléments reconnaissants comme des anticorps, des aptamères [3], ou encore des polymères à empreintes moléculaires [4]. Il devient alors possible d'évaluer par ampérométrie la quantité d'espèces se fixant à la surface de l'électrode de travail par interaction spécifique.

Détection optique de paramètres autres que le potentiel membranaire

Au cours des expériences réalisées jusqu'ici, nous nous sommes intéressés à détecter par voie optique seulement deux paramètres : l'autofluorescence de la nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH), et le potentiel membranaire mitochondrial. Pourtant de nombreuses autres sondes sont disponibles ; que l'on peut d'ailleurs utiliser conjointement tant que les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission restent suffisamment éloignées les unes des autres. Citons quelques exemples : l'ion calcium (Ca^{2+}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la température interne [5]... Si l'on considère un seul et même élément (ex : H_2O_2), il pourrait être intéressant de comparer les résultats obtenus par voie

optique avec ceux obtenus par voie électrochimique. Autrement dit, l'outil ElecWell peut éventuellement servir à caractériser une sonde fluorescente en cours de développement.

Génération localisée d'espèces agissant sur le métabolisme

Il est possible d'électrogénérer la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) [6]. On pourrait alors imaginer produire de manière contrôlée des ROS au niveau des électrodes disques encastrée.

En absence de mitochondries cela permettrait de déterminer le taux de collecte par une approche alternative, sans avoir besoin d'utiliser le ferrocène comme modèle. De plus, en considérant une espèce dont l'oxydation n'est pas réversible, le dispositif ElecWell fonctionnerait en mode générateur-collecteur au sens strict du terme, c'est-à-dire sans effet « redox cycling ».

En présence de mitochondries, nous pourrions nous intéresser aux conséquences de l'élévation de la concentration en ROS sur leurs statuts énergétiques.

Manipulation des éléments biologiques

Pour s'affranchir de l'étape de centrifugation, il pourrait être intéressant de travailler davantage la méthode d'assemblage par capillarité, sachant que la machine permettant son automatisation est disponible dans les locaux du LAAS-CNRS (équipe ELiA).

Une autre piste est l'électrophorèse. En effet, les mitochondries étant chargées (potentiel membranaire), il doit être possible de provoquer leur mouvement par l'application d'un champ électrique. Pour ce faire, il suffirait alors d'utiliser la chambre fluide comprenant un couvercle constitué d'une lamelle de verre, et de remplacer cette lamelle par une autre recouverte d'ITO. En appliquant une différence de potentiel entre le couvercle d'ITO et les électrodes disques encastrées, les mitochondries devraient en toute logique être guidées vers le fond des micropuits [7].

Nous avons évoqué précédemment la possibilité d'isoler les mitochondries par la méthode MACS (pour « magnetic activated cell sorting ») basée sur l'usage d'anticorps greffés à la surface de nanobilles magnétiques. On pourrait alors profiter de la présence de ces billes pour guider les mitochondries vers le fond des puits par l'application d'un champ magnétique [8]. Pour ce faire, on pourrait par exemple électrodéposer un matériau ferromagnétique (aimant permanent) à la surface des DMEs [9], ou encore tenter de remplacer les DMEs par des microbobines (électroaimants).

Analyser le contenu mitochondrial d'une cellule unique

En poussant encore un peu plus ce raisonnement basé sur la technologie MACS, on pourrait imaginer une puce microfluidique permettant d'isoler le contenu mitochondrial d'une cellule unique. Des travaux rapportent la fabrication d'une telle puce appliquée au tri cellulaire [10]. On pourrait alors placer ce « Mini-MACS » à l'entrée du dispositif ElecWell et remplir les micropuits par guidage magnétique ou électrophorétique.

Repenser le procédé de fabrication

La résolution des motifs définis lors de l'étape de photolithographie précédant l'étape finale de gravure ionique réactive dépend directement de l'épaisseur de résine déposée. Cette épaisseur doit être suffisamment importante pour permettre une gravure de longue durée, compte-tenu de la sélectivité des plasmas gazeux utilisés. L'utilisation d'un masque constitué d'un métal inattaquable par les plasmas à la place de la résine est une piste à explorer pour s'affranchir de ces limitations.

Une seconde piste consisterait à repenser le procédé de fabrication dans son ensemble, en vue de supprimer l'étape finale de gravure ionique réactive pour aboutir à un procédé simplifié, comportant moins de risques d'échecs et entraînant une réduction importante des coûts. L'idée est de s'inspirer directement de la technique du lift-off. On partirait d'un substrat verre/ITO sur lequel on définirait des cylindres de résine correctement espacés par photolithographie, cylindres dont le diamètre serait celui des futurs micropuits, et dont la hauteur totale devrait être supérieure à celle des futurs micropuits. On pourrait ensuite procéder aux dépôts des différentes couches, soient $\text{SiO}_2/\text{Ti}/\text{Pt}/\text{Ti}/\text{SiO}_2$, pour finir par le retrait des cylindres de résine en plongeant la plaquette dans un bain adapté. De manière générale, les résines utilisées ne résistent pas aux protocoles de nettoyages réalisés avant chaque dépôt. Le principal obstacle à la réalisation de cette idée est donc l'identification d'une résine adaptée.

Analyser un autre élément que des mitochondries

A partir du moment où les dimensions de l'élément d'intérêt (biologique ou non), permettent son positionnement au fond des micropuits, le dispositif ElecWell est adapté à son analyse. C'est par exemple le cas des chloroplastes, de nombreux microbes (bactéries, champignons, levures, phyto- et zoo- plancton...) et virus.

Transfert de la technologie vers l'analyse de la cellule unique

Une perspective évidente est celle du transfert de la technologie ElecWell vers l'analyse de la cellule unique. Etant donné que le diamètre d'une cellule unique vaut approximativement $25\ \mu\text{m}$, il faudrait revoir la sélection des matériaux pour autoriser un tel rapport de forme (H/R). Contrairement au dioxyde de silicium utilisé actuellement comme diélectrique, les matériaux organiques (SU-8, parylène, polyimide...) semblent adaptés. Une autre solution envisageable est de graver directement le substrat, c'est-à-dire la plaquette de verre borosilicate de $500\ \mu\text{m}$ d'épaisseur. Dans tous les cas, la modification du rapport de forme entraînerait une perte de confinement du micropuits, donc une baisse significative de la valeur du taux de collecte.

Influences d'une action mécanique sur le statut métabolique

De plus en plus d'études s'intéressent au microenvironnement cellulaire (ex : moelle osseuse) et à l'influence des forces mécaniques sur le développement cellulaire (croissance et différenciation). On pourrait tirer profit de la structure du micropuits [11] pour appliquer passivement des contraintes mécaniques sur un élément biologique en cours de croissance (ou élongation), et observer leur influence sur son statut énergétique.

Intégrer plusieurs anneaux par micropuits

Bien que ne disposant pas actuellement de moyens techniques pour réaliser cette idée (si ce n'est la piste des cylindres de résine), intégrer deux, voire davantage d'anneaux au sein d'un seul et même micropuits offrirait de nombreux avantages. Un anneau pourrait par exemple détecter le glucose tandis qu'une autre détecterait le lactate ou le peroxyde d'hydrogène. De plus, si la réaction d'oxydoréduction se déroulant à l'électrode est réversible, on pourrait profiter de l'effet « redox-cycling » pour amplifier le signal mesuré et s'orienter vers la détection d'espèces produites en quantités extrêmement faibles.

Analyse à l'échelle individuelle

Des puces ElecWell visant l'analyse de la mitochondrie unique ont été fabriquées. Cependant, elles permettent d'analyser individuellement jusqu'à seulement sept mitochondries, ce qui n'est d'un point de vue biologique, absolument pas représentatif. Pour parvenir à statuer sur l'hétérogénéité mitochondriale il est nécessaire d'être en mesure d'analyser individuellement des mitochondries uniques en grand nombre. Une première solution est le multiplexage, consistant à adresser un puits l'un après l'autre durant un bref instant [12], ce qui est d'ailleurs tout à fait envisageable compte tenu du temps de réponse des ultramicroélectrodes. Mais le Graal consisterait plutôt à disposer d'une électronique de mesure par puits, rendant chacun d'entre eux parfaitement autonome. Si cette électronique pouvait être intégrée à la puce ElecWell, ce serait encore mieux. Les travaux de Sunitha Ayers et al. [13]–[15] se sont focalisés sur cette problématique et rapportent des résultats très prometteurs.

Bibliographie

- [1] C. Amatore *et al.*, “Monitoring in Real Time with a Microelectrode the Release of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by a Single Macrophage Stimulated by its Membrane Mechanical Depolarization,” *ChemBioChem*, vol. 7, no. 4, pp. 653–661, Apr. 2006.
- [2] M. A. Ghanem, “Electrocatalytic activity and simultaneous determination of catechol and hydroquinone at mesoporous platinum electrode,” *Electrochem. Commun.*, vol. 9, no. 10, pp. 2501–2506, Oct. 2007.
- [3] B. J. Sanghavi, S. Sitaula, M. H. Griep, S. P. Karna, M. F. Ali, and N. S. Swami, “Real-Time Electrochemical Monitoring of Adenosine Triphosphate in the Picomolar to Micromolar Range Using Graphene-Modified Electrodes,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 17, pp. 8158–8165, Sep. 2013.
- [4] A. Ramanaviciene and A. Ramanavicius, “Molecularly imprinted polypyrrole-based synthetic receptor for direct detection of bovine leukemia virus glycoproteins,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 6, pp. 1076–1082, Dec. 2004.
- [5] D. Chrétien *et al.*, “Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C,” *PLOS Biol.*, vol. 16, no. 1, p. e2003992, Jan. 2018.
- [6] S. Dongmo, J. Leyk, C. Dosche, C. Richter-Landsberg, U. Wollenberger, and G. Wittstock, “Electrogeneration of O₂·⁻ and H₂O₂ Using Polymer-modified Microelectrodes in the Environment of Living Cells,” *Electroanalysis*, vol. 28, no. 10, pp. 2400–2407, Oct. 2016.
- [7] C.-Y. Chang, Y. Takahashi, T. Murata, H. Shiku, H.-C. Chang, and T. Matsue, “Entrapment and measurement of a biologically functionalized microbead with a microwell electrode,” *Lab. Chip*, vol. 9, no. 9, p. 1185, 2009.
- [8] H. Kuramitz, “Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 394, no. 1, pp. 61–69, May 2009.
- [9] D. P. Arnold and Naigang Wang, “Permanent Magnets for MEMS,” *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 18, no. 6, pp. 1255–1266, Dec. 2009.
- [10] O. Osman *et al.*, “Microfluidic immunomagnetic cell separation using integrated permanent micromagnets,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 5, p. 054115, 2013.
- [11] N. Minc, A. Boudaoud, and F. Chang, “Mechanical Forces of Fission Yeast Growth,” *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 13, pp. 1096–1101, Jul. 2009.
- [12] K. Ino, W. Saito, M. Koide, T. Umemura, H. Shiku, and T. Matsue, “Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection,” *Lab. Chip*, vol. 11, no. 3, pp. 385–388, 2011.
- [13] S. Ayers, K. D. Gillis, M. Lindau, and B. A. Minch, “Design of a CMOS Potentiostat Circuit for Electrochemical Detector Arrays,” *IEEE Trans. Circuits Syst. Regul. Pap.*, vol. 54, no. 4, pp. 736–744, Apr. 2007.

- [14] S. Ayers, K. Berberian, K. D. Gillis, M. Lindau, and B. A. Minch, "Post-CMOS Fabrication of Working Electrodes for On-Chip Recordings of Transmitter Release," *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 4, no. 2, pp. 86–92, Apr. 2010.
- [15] B. N. Kim, A. D. Herbst, S. J. Kim, B. A. Minch, and M. Lindau, "Parallel recording of neurotransmitters release from chromaffin cells using a 10×10 CMOS IC potentiostat array with on-chip working electrodes," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 41, pp. 736–744, Mar. 2013.

Valorisation

Conférences internationales

Oraux

- **International society of electrochemistry 2015 (ISE)**
Arrays of microwells equipped with recessed ring nanoelectrode and a disc microelectrode for nanoelectrochemical investigations
F. Sekli-Belaïdi, W. Tiddi, M. Polverel, **G. Lemerrier**, V.S. Vajrala, D. Zigah, N. Sojic, J. Launay, P. Temple-Boyer, S. Arbault

- **Biosensors 2016: Keynote presentation**
Investigations of nanoring electrodes integrated into microwell arrays for the analysis of isolated mitochondria at the microscale
F. Sekli-Belaïdi, **G. Lemerrier**, V.S. Vajrala, D. Zigah, N. Sojic, J. Launay, P. Temple-Boyer, S. Arbault

- **Nanotechnology materials and devices conference 2016 (NMDC)**
Ring nanoelectrodes integrated into microwell arrays for the analysis of mitochondria isolated from leukemic cells
G. Lemerrier, F. Sekli-Belaïdi, V.S. Vajrala, S. Arbault, J.E. Sarry, J. Launay, and P. Temple-Boyer

Article associé publié dans : Nanotechnology Materials and Devices Conference (NMDC), 2016 IEEE

- **EUROSENSORS 2017**
Toward the analysis of mitochondria isolated from leukemic cells with electrochemically instrumented microwell arrays
G. Lemerrier, F. Sekli-Belaïdi, V.S. Vajrala, E. Descamps, J. Foncy, S. Arbault, J.E. Sarry, P. Temple-Boyer, J. Launay

Article associé publié dans : Proceedings, Volume 1, Eurosensors 2017

- **23rd Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE, 2018)**
Microwell Array Integrating Ring Nanoelectrodes for the Monitoring of Bioenergetic Responses from Single Mitochondria
V.S.R. Vajrala, F. Sekli Belaïdi, **G. Lemerrier**, C. Colin, D. Zigah, N. Sojic, P. Temple-Boyer, J. Launay and S. Arbault

Posters

- **Transducers 2015**
Integration of ring nanoelectrodes into microwell for the bioelectrochemical analysis in sub-picoliter volumes
F. Sekli Belaïdi, W. Tiddi, M. Polverel, **G. Lemerrier**, A. Lecestre, P. Dubreuil, J. Launay and P. Temple-Boyer

- **Transducers 2017**
Toward the analysis of mitochondria isolated from leukemic cells with electrochemically instrumented microwell arrays
G. Lemerrier, F. Sekli-Belaïdi, V.S. Vajrala, E. Descamps, N. Sojic, S. Arbault, J.E. Sarry, P. Temple-Boyer, J. Launay

Article associé publié dans : Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS), 2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)

- **Biosensors 2018**
Microsystems for the electrochemical and optical monitoring of bioenergetic activities of isolated mitochondria
G. Lemerrier, C. Colin, F. Sékli Belaïdi, V.S. Vajrala, X. Dollat, N. Sojic, P. Diolez, J.E. Sarry, J. Launay, P. Temple-Boyer and S. Arbault

Publications

- **Sensors and Actuators B: Chemical (2016)**
Integration of ring nanoelectrodes into microwells for the bioelectrochemical analysis in sub-picolitre volumes
F. Sékli Belaïdi, E. Vanhove, W. Tiddi, M. Polverel, **G. Lemerrier**, A. Lecestre, J. Launay, P. Temple-Boyer

- Soumis : **Biosensors & Bioelectronics (2018)**
Microwell Arrays integrating Nanoelectrodes for Coupled Opto-electrochemical Monitorings of Single Mitochondria
Venkata Suresh VAJRALA, Fadhila Sekli BELAIDI, **Gabriel LEMERCIER**, Dodzi ZIGAH, Neso SOJIC, Pierre TEMPLE-BOYER, Jérôme LAUNAY and Stéphane ARBAULT

Brevet

- **Transducer for the monitoring of metabolic status of a biological entity**

Date de dépôt : 07/07/2017

Numéro de soumission : 1000412776

P. Temple-Boyer, **G. Lemerrier**, F. Sekli-Belaïdi, J. Launay, E. Vanhove, S. Arbault, J.E. Sarry

Tables des figures

Chapitre 1

<i>Figure 1 Relocalisation de la moelle osseuse au cours de la croissance chez l'homme.</i>	12
<i>Figure 2 Hématopoïèse : cascade de différenciations de la cellule souche hématopoïétique.</i>	14
<i>Figure 3 A : Mise sur le marché de nouvelles molécules pour le traitements d'hémopathies malignes. B : Projection du marché des LAM d'ici 2020, d'après [14].</i>	18
<i>Figure 4 Définition de l'effet Warburg, d'après [17].</i>	19
<i>Figure 5 Les trois principales voies métaboliques pour la production d'ATP, d'après [19].</i>	20
<i>Figure 6 Modèle de xénogreffe appliqué pour l'étude de la chimiorésistance.</i>	21
<i>Figure 7 Sensibilité à la cytarabine de différentes lignées de cellules leucémiques en fonction de leur statut OXPHOS in vivo.</i>	22
<i>Figure 8 Schéma illustrant la prédiction de la réponse à la chimiothérapie en fonction du statut énergétique des cellules identifiées au moment du diagnostic de la LAM.</i>	22
<i>Figure 9 Utilisation des différents substrats énergétiques par des cellules MOLM14 en présence ou en absence d'araC et inhibition de la phosphorylation oxydative par la tigecycline.</i>	23
<i>Figure 10 Viabilité cellulaire et proportion de cellules en phase apoptotique sous l'effet de l'utilisation de l'araC seule et en combinaison avec la tigecycline.</i>	24
<i>Figure 11 Deux hypothèses sur l'origine de la mitochondrie et de la cellule eucaryote, d'après [31].</i>	25
<i>Figure 12 Evolution conjointe de la mitochondrie et de la cellule eucaryote.</i>	25
<i>Figure 13 Représentation usuelle d'une mitochondrie.</i>	26
<i>Figure 14 Microscopie 4pi : visualisation du réseau mitochondrial d'une cellule unique, d'après [37]. Mise en évidence du dynamisme du réseau par l'ajout d'inhibiteurs de la fonction mitochondriale. N indique le noyau.</i> 26	
<i>Figure 15 A : Image de microscopie électronique montrant l'association d'un Nebenkern (flèche entière) et de son axonème (flèche coupée), d'après [40]. La barre d'échelle représente 200 nm. B : évolution conjointe du noyau et du Nebenkern d'un spermatozoïde de drosophile. Le Nebenkern se divise en deux puis s'allonge de part et d'autre de l'axonème lors de sa formation, d'après [41]. C : Image de microscopie électronique d'une coupe d'un cœur d'une souris adulte, d'après [42].</i>	27
<i>Figure 16 A : image d'une cellule entière générée par IA-SEM (pour « ion-abrasion scanning electron microscopy »). Les mitochondries sont représentées en rouge, le réticulum endoplasmique en vert, d'après [49]. B : image de microscopie confocale 3D STORM, les mitochondries sont représentées en rose et les microtubules en vert, d'après [51]. La barre d'échelle représente 3 µm.</i>	28
<i>Figure 17 A : observation au microscope électronique de mitochondries isolées par centrifugations différentielles, d'après [53]. B : observation d'une mitochondrie par microscopie à force atomique, d'après [54].</i>	29

<i>Figure 18 La chaîne de transport d'électrons mitochondriale et ses cinq complexes.</i>	<i>30</i>
<i>Figure 19 A : Sites de production de l'anion superoxyde au niveau de l'ETC d'après [58]. B : Les conséquences de la production de ROS d'origine mitochondriale, d'après [57].....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 20 Signalisation cellulaire en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène, d'après [65].</i>	<i>32</i>
<i>Figure 21 Observation par microscopie confocale de l'hétérogénéité mitochondriale. A : fluorescence fonction du potentiel membranaire. B : fluorescence fonction de la production de ROS. C : images superposées. Adapté d'après [71] et [72].</i>	<i>33</i>
<i>Table 1 Classification franco-américano-britannique (FAB) des LAM.</i>	<i>15</i>
<i>Table 2 Projection sur l'année 2011 de l'incidence des leucémies aiguës et de la mortalité chez l'homme et la femme, en France d'après l'institut de veille sanitaire (InVS) et l'institut national du cancer (InCA).</i>	<i>16</i>

Chapitre 2

<i>Figure 1 Schéma descriptif de l'électrode de Clark et les réactions associées à la réduction de l'oxygène sur une électrode en platine, source : Wikipédia (https://en.wikipedia.org/wiki/Clark_electrode).</i>	<i>43</i>
<i>Figure 2 Description de la chambre d'oxygraphie proposées par la société Hansatech, source : http://www.hansatech-instruments.com.</i>	<i>44</i>
<i>Figure 3 Description de l'Oroboros, source : http://www.orooboros.at</i>	<i>44</i>
<i>Figure 4 Description du principe de la technologie SeaHorse commercialisée par Agilent. On y voit un puits et ses fibres optiques associées. Source : vidéo promotionnelle (https://www.youtube.com/watch?v=5ETh3VBaX3Q)</i>	<i>45</i>
<i>Figure 5 Diagramme présentant les méthodes actuelles de détection des ROS, d'après [9].</i>	<i>48</i>
<i>Figure 6 Schémas de principe des sondes fluorescentes de types "oxidant-sensitive" (a) et "non-redox" (b). Structures chimiques des sondes "oxidant-sensitive" les plus communément utilisées selon leur état de fluorescence (c), d'après [11].</i>	<i>49</i>
<i>Figure 7 Principales voies de réaction de la sonde fluorescente réduite dichlorodihydrofluorescéine pour la détection de ROS intracellulaires, d'après [12]. La voie de production de ROS liée à la présence de la sonde est notée en bleu.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 8 Principales voies de réaction de la sonde chimiluminescente Luminol, d'après [12]. La voie de production de ROS liée à la présence de la sonde est notée en bleu.</i>	<i>51</i>
<i>Figure 9 Justification de l'intérêt de l'analyse à l'échelle d'une cellule unique, d'après [23].</i>	<i>54</i>
<i>Figure 10 Principe de mesure par la méthode "artificial synapse", d'après [6].</i>	<i>55</i>
<i>Figure 11 A : exemple d'électrode miniaturisée pour la détection de métabolites intracellulaire. B : détection électrochimique intra- et extra- cellulaire en simultané, d'après [31].</i>	<i>55</i>
<i>Figure 12 A : Exemple d'une micro-cellule électrochimique planaire à trois électrodes, d'après [32]. B : "micro-oxygraph", chambre d'oxygraphie miniaturisée, d'après [48]. C : Lab on Chip pour la détection de polluants dans les eaux de rivières par l'analyse de l'activité photosynthétique d'algues, d'après [47].</i>	<i>56</i>

Figure 13 : A : micropuits avec disque intégré, d'après [60]. B : micropuits avec disque intégré et électrode surfacique, d'après [71]. (C) : micropuits avec disque et anneau intégrés, d'après [70]. D : micropuits avec disque et anneau intégrés, et électrode surfacique, d'après [55]. E : micropuits avec deux anneau encastrés, d'après [74].
..... 57

Figure 14 Deux exemples de biocapteurs pour la détection de l'anion superoxyde, d'après [76]. A : immobilisation du cytochrome c à la surface de l'électrode. B : immobilisation de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) à la surface de l'électrode..... 60

Table 1 Comparaison des différentes solutions disponibles sur le marché pour la mesure de la consommation d'oxygène associée au métabolisme cellulaire, d'après [5]. 46

Table 2 Spécificité, localisation cellulaire, longueurs d'ondes associées, avantages et limitations, des principales sondes utilisées pour la détection de la production cellulaire de ROS, d'après [17]. 53

Table 3 Etat de l'art des micropuits instrumentés..... 59

Table 4 Avantages et inconvénients des méthodes optiques et électrochimiques dans le cadre de l'étude de la fonction mitochondriale 61

Chapitre 3

Figure 1 A : réaction électrochimique à l'interface électrode/solution. B : réaction chimique impliquant deux couples oxydant/réducteur. 73

Figure 2 Notions d'équilibre électrochimique et de potentiel d'électrode. A : oxydation provoquée par l'abaissement du niveau de Fermi de l'électrode. B : Equilibre électrochimique : les niveaux de Fermi sont égaux. C : réduction provoquée par l'élévation du niveau de Fermi de l'électrode. 74

Figure 3 Profils de concentration de l'espèce réagissant à l'électrode en régime stationnaire (1) et en régime transitoire (2). 77

Figure 4 La cellule électrochimique : principe d'un montage à deux électrodes. 78

Figure 5 La cellule électrochimique : un montage à deux ou trois électrodes..... 79

Figure 6 Régimes de diffusion et voltammogrammes associés, en fonction des dimensions de l'électrode travail. 82

Figure 7 Chevauchements entre les couches de diffusion des espèces émises par une entité biologique unique et les couches de détection relatives à la polarisation d'une UME, dans les trois configurations proposées par la littérature. 83

Figure 8 Comparaison des régimes diffusionnels entre un microdisque planaire (A) et un microdisque encastré (B).
..... 84

Figure 9 Considération d'un microdisque au sein d'un double encastrement. 85

Figure 10 Considération d'un anneau encastré..... 86

Figure 11 Considération d'un anneau encastré au sein d'un double encastrement en régime transitoire (A) et en régime permanent (B). 86

Figure 12 Définition de la géométrie et du maillage dans le cadre de la simulation des phénomènes de diffusion dans un demi-micropuits 2D.	87
Figure 13 Profils de concentrations en régime permanent pour trois valeurs de rayons : 1,5 ; 3 et 4,5 μm	88
Figure 14 Optimisation de la géométrie du micropuit instrumenté.	89
Figure 15 Nouvelle définition de la géométrie et du maillage après prise en compte de la présence d'une marche au niveau de l'électrode annulaire.	90
Figure 16 Variations de la valeur du taux de collecte en fonction de A : la hauteur (H), B : le rayon (R), C : l'épaisseur de l'électrode annulaire (e), D : l'emplacement de l'électrode annulaire (H_2).	91
Figure 17 Variations de la valeur du taux de collecte en fonction de la longueur de la marche pour trois valeurs de rayon : 1,5 μm (bleu), 3 μm (orange), 4,5 μm (gris).	91
Figure 18 Voltammogrammes obtenus par simulation de l'oxydation du ferrocènediméthanol (1 mM) à la surface de l'électrode annulaire pour trois valeurs de rayon : 4,5 μm (rouge), 3 μm (vert), 1,5 μm (bleu).	92
Figure 19 A : schéma descriptif du mode GC, B : profil 2D de la concentration de Fc en mode GC, C profil 2D de la concentration de Fc^+ en mode GC.	93
Figure 20 A : oxydation de Fc à la DME, B : oxydation de Fc à la DME et réduction de Fc^+ à la RNE (mode GC), C : réduction de Fc^+ à la RNE, pour $R = 4,5 \mu\text{m}$	94
Figure 21 Influence de la distance inter-électrodes considérant des UME disques planaires.	95
Figure 22 Influences de la distance centre-à-centre (d) et de la vitesse de balayage (V_b) sur les régimes diffusionnels considérant des UME disques encastrés d'une profondeur constante H.	96
Figure 23 Prise en compte de la distance centre-à-centre par l'intermédiaire du paramètre R_0 dans un modèle de simulation 2D selon la configuration du réseau : matricielle (A), ou concentrique (B).	96
Figure 24 Schéma de l'évolution de la couche de diffusion au cours du temps selon le modèle de simulation considéré (A) : modèle 3D, (B) : modèle 2D.	97
Figure 25 Voltammogrammes issus de la simulation des modèles 2D et 3D. Evaluation des régimes diffusionnels en fonction de la distance centre-à-centre (d) pour des vitesses de balayages comprises entre $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	98
Figure 26 Vue 3D et coupe 2D représentation la concentration en ferrocènediméthanol dans le cadre de son oxydation à la surface de l'électrode annulaire, pour deux valeurs de distance centre-à-centre : 5R et 20R.	99
Table 1 Comparaison des valeurs obtenues par calcul et par simulation.	88
Table 2 Validation du modèle de simulation 2D.	89
Table 3 Valeurs des courant limite obtenues par calcul et par simulation pour l'oxydation du FcMeOH à 1 mM.	92
Table 4 Courants obtenus, facteur d'amplification et taux de collecte, pour trois valeurs de rayon.	94

Chapitre 4

Figure 1 Conception de la première génération des dispositifs ElecWell.	104
--	-----

<i>Figure 2 Paramètres géométriques et matériaux utilisés dans le cadre de la fabrication de la première génération des dispositifs ElecWell.</i>	105
<i>Figure 4 Usage des dispositifs de génération 1 pour l'analyse couplée optique/électrochimie de l'activité métabolique de mitochondries isolées à partir de levures. A : puce ElecWell de génération 1 assemblée. B : report d'une cuve fluïdique en PDMS sur la puce. C : montage expérimental sur microscope de florescence avec deux électrodes externes plongées dans la cuve fluïdique. D : mitochondries isolées observées par l'autofluorescence du NADH (vue face arrière).</i>	106
<i>Figure 5 Détection par voie électrochimique de la respiration mitochondriale en fonction d'ajouts de substrats et inhibiteurs de l'ETC. A : Exemple de résultat brut obtenu par voltamétrie cyclique. B : courbe refétant la variation de le concentration en oxygène dissout au cours du temps (un cycle correspond à 20,4s) $N = 10^6$. C : courbe refétant la variation de le concentration en oxygène dissout au cours du temps (un cycle correspond à 20,4s) $N = 10^4$.</i>	107
<i>Figure 5 Vue d'artiste du système ElecWell de seconde génération.</i>	108
<i>Figure 6 Définition de la structure des micropuits de deuxième génération</i>	109
<i>Figure 7 Spectres de transmission dans le visible d'une couche d'ITO d'environ 175 nm et d'une couche cuivre/or 2 nm / 15 nm, d'après [8].</i>	111
<i>Figure 8 Mesure du potentiel en circuit ouvert (OCP) en fonction du temps et de l'acidité dans une solution de KCl 10 mM, d'après [15]. (a) OCP vs Ag/AgCl. Les bandes représentent trois expériences. Leurs épaisseurs représente la répétabilité, leurs fluctuations la stabilité. (b) Stabilité, exprimée comme la différence entre OCP_{max} et OCP_{min}. (c) : la dérive du potentiel au cours du temps. (d) OCP en fonction du pH. (e) expression de la sensibilité au pH.</i>	113
<i>Figure 9 A : description schématique d'une enceinte de PECVD. B : description schématique d'une enceinte PVD par pulvérisation cathodique, d'après [20].</i>	115
<i>Figure 10 A : description schématique d'une étape de « lift-off ». B : description schématique d'une étape de gravure.</i>	116
<i>Figure 11 Vue obtenue par superposition des cinq masques de photolithographie. Le trait plein représente les bords d'une plaquette quatre pouces, tandis que les lignes pointillées représentent les lignes de découpe. Les marques d'alignements sont aussi visibles de chaque côté de la plaquette.</i>	117
<i>Figure 12 A : représentation du premier masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope optique après lift-off.</i>	118
<i>Figure 13 A : représentation du second masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope optique après lift-off.</i>	119
<i>Figure 14 A : représentation du troisième masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope électronique à balayage après gravure RIE du Si_3N_4.</i>	119

<i>Figure 15 A : Représentation du quatrième masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope optique après gravure humide du SiO₂.</i>	120
<i>Figure 16 Mesure de l'évolution des épaisseurs de résine (rouge) et de l'empilement de matériaux à graver (bleu) au cours de la gravure RIE.</i>	121
<i>Figure 17 Ouvertures de résine susceptibles d'être obtenues après développement.</i>	122
<i>Figure 18 A : résultat de gravure RIE obtenu dans le cadre de la fabrication des composants ElecWell de première génération (R = 1,5 μm). B : résultat de gravure RIE obtenu dans le cadre de la modification du protocole de photolithographie pour les composants de deuxième génération (R = 1,5 μm). L'image est prise avec une inclinaison de 30°. La flèche rouge indique un phénomène de micro-masquage, lié à la présence de résidus de résine en début de gravure.</i>	123
<i>Figure 19 A : représentation du cinquième masque de photolithographie utilisé pour la réalisation de la puce D. B : suivi schématique du procédé de fabrication des puces ElecWell. C : photo prise au microscope électronique à balayage après gravure de l'empilement SiO₂/Ti/Pt/Ti/SiO₂.</i>	125
<i>Figure 20 Spectres de transmission dans le visible de l'ITO avant (orange) et après (gris) exposition au plasma CF₄/A pendant cinq minutes.</i>	126
<i>Figure 21 Représentation 3D de la fluidique développée au laboratoire (configuration chambre ouverte).....</i>	127
<i>Figure 22 A : système ElecWell complet avant assemblage, avec : (1) boîtier permettant de relier la puce au potentiostat ; (2) plateforme de microscopie thermorégulée ; (3) puce ElecWell de type C ; (4) chambre fluidique en PMMA ; (5) plateforme assurant la compatibilité avec plusieurs types de microscopes ; (6) plaque de PMMA permettant un serrage à vis du système assemblé. B : système ElecWell complet après assemblage.</i>	128
<i>Table 1 Caractéristiques des matériaux isolants les plus couramment utilisés en microfabrication, d'après [4].</i>	110
<i>Table 2 Plasmas associés aux matériaux à graver ; vitesses de gravures et sélectivités.</i>	121
<i>Table 3 Mise à jour du protocole d'ouverture des micropuits pour la réduction de leur rayon vers 1,5 μm dans le cadre de la fabrication des composants ElecWell de seconde génération.</i>	124

Chapitre 5

<i>Figure 1 A : voltamogramme typique obtenu par polarisation d'une électrode de platine dans une solution d'acide sulfurique, d'après [2]. B : voltamogramme obtenu par polarisation d'une nanoélectrode encastrée dans une solution d'acide sulfurique (0,5 M).</i>	134
<i>Figure 2 Voltamogrammes obtenus dans le cadre de l'oxydation du ferrocènediméthanol (1 mM) à la surface de nanoélectrodes de platine encastrée pour trois valeurs de rayons : 1,5 μm ; 3 μm ; 4,5 μm.</i>	135

Figure 3 Voltammogrammes obtenus dans le cadre de l'oxydation du ferrocène diméthanol (1 mM) à la surface des microdisques encastrés à base d'ITO, pour deux valeurs de rayons : 1,5 μm et 3 μm . A : R = 3 μm ; N = 10000. B : R = 1,5 μm ; N = 7. C : R = 1,5 μm ; N = 20000.	136
Figure 4 Etude des profils de diffusion associés à l'oxydation du ferrocène diméthanol à la surface de RNE intégrées dans des réseaux de micropuits (R = 4,5 μm) en fonction de la vitesse de balayage et de la distance centre-à-centre.	137
Figure 5 A : schéma décrivant les réactions électrochimiques impliquées. B : polarisation appliquée à la RNE. C : polarisation appliquée à la DME. D : courant mesuré à la RNE. E : courant mesuré à la DME.	138
Figure 6 A : voltammogramme obtenu lors de l'électropolymérisation du pyrrole dans l'acétonitrile. La flèche rouge désigne le premier cycle. B : mesures simultanées des potentiels en circuit ouvert d'une électrode intégrée en platine (rouge) et d'une électrode Pt/PPy (bleu) pendant une heure par rapport à une électrode commerciale Ag/AgCl/KCl _{sat} dans une solution de KCl à 0,1 M. C : photographies de l'électrode de quasi-référence après électropolymérisation du pyrrole à la surface du platine.	140
Figure 7 A : image MEB d'un micropuits avant électrodépôt de noir de platine. B : image MEB d'un micropuits après électrodépôt de noir de platine. C : Voltammogrammes obtenus dans une solution d'acide sulfurique 0,5 M avant (bleu) et après (violet) électrodépôt de noir de platine. Les flèches rouges indiquent le premier cycle.	141
Figure 8 A : description des étapes réalisées pour la validation de l'immobilisation d'anti-VDAC à la DME et photographie obtenue par microscopie de fluorescence. B : description des étapes réalisées pour la validation de l'immobilisation d'anti-VDAC à la RNE et photographie obtenue par microscopie de fluorescence.	143
Figure 9 A : Superposition d'images capturées au microscope confocal d'un réseau de micropuits (lumière blanche) avec des mitochondries à sa surface (longueur d'onde d'excitation du MTG) avant et après rinçage, en présence ou en absence d'une couche de PLL-g-PEG déposée par μCP . B : Nombre de particules détectées par traitement d'image (surface totale : 18,75 mm ²) avant et après rinçage, en présence ou en absence d'une couche de PLL-g-PEG déposée par μCP . C : mesures des angles de contact de gouttes d'eau déionisée déposées à la surface du verre (à gauche) ou du verre après dépôt de PLL-g-PEG par μCP	145
Figure 10 Représentation des différentes phases de l'évolution de la croissance d'une culture cellulaire au cours du temps. 1 : phase de latence. 2 : phase exponentielle. 3 : phase stationnaire. 4 : sénescence.	146
Figure 11 A : Description des différentes étapes nécessaires à l'isolation de mitochondries à partir d'une culture cellulaire. B : Western Blot réalisé pour vérifier la qualité de la préparation de la solution mitochondriale MOLM14. C : photographie prise au microscope confocal d'une mitochondrie unique marquée par la sonde fluorescente MitoTracker Red. D : image MEB d'une mitochondrie unique.	147
Figure 12 A : description du principe d'assemblage convectif de nanoparticules à la surface d'un substrat hydrophile structuré, d'après [31]. B : description du principe d'assemblage capillaire de nanoparticules à la surface d'un substrat hydrophobe structuré. C : outil nécessaire à leur mise en œuvre automatisée.	149
Figure 13 A : Photographie de la pièce réalisée pour rendre les puces ElecWell assemblées compatibles avec l'étape de centrifugation.	150
Figure 14 Schéma descriptif de la configuration expérimentale.	151

<i>Figure 15 A : Photographie de la configuration expérimentale à l'intérieur de la cage de Faraday. B : Zoom sur le système ElecWell déposé sur le microscope, connecté fluidiquement et électriquement. C : Voltamogramme réalisé en absence de mitochondries mais dans le même milieu, à 4 V.s^{-1} avec 30 secondes de temporisation entre chaque cycle.</i>	152
<i>Figure 16 Photographie réalisée au microscope de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation de la sonde TMRM. B : Zoom sur une maille du réseau de micropuits avec 100% de taux de remplissage. C : Mesure des variations du potentiel membranaire mitochondrial après ajouts de glutamate/malate, d'ADP et d'ATR.</i>	153
<i>Figure 17 A : suivi par voltamétrie cyclique de la consommation d'oxygène au cours du temps par les mitochondries. B : courbes reconstruites à partir du voltamogramme, la valeur du courant mesuré à $-0,8 \text{ V}$ vs Ag/AgCl est exprimée en fonction des cycles. C : histogrammes correspondants au flux de consommation d'oxygène par les mitochondries (OCR) en fonction des différents ajouts de substrats et inhibiteurs.</i>	154
<i>Figure 18 Mesure de l'OCR de mitochondries isolées à partir de muscles squelettiques de souris avec l'outil SeaHorse, d'après [32].</i>	155
<i>Table 1 Comparaison des valeurs des courant limites mesurées, simulées et calculées.</i>	136
<i>Table 2 Comparaison des valeurs des courant limites mesurées et calculées. « en CA » signifie que la valeur a été mesurée par chronoampérométrie.</i>	136
<i>Table 3 Comparaison des caractéristiques électrochimiques mesurées et simulées en mode générateur-collecteur</i>	139

Résumés

Français

La mitochondrie est restée longtemps cantonnée au rôle de centrale énergétique cellulaire. On sait désormais qu'elle est aussi la principale source d'espèces réactives oxygénées, impliquées dans le stress oxydant et la signalisation inter-cellulaire. Le dérèglement de l'activité mitochondriale est ainsi susceptible d'être la cause de l'apparition et de la progression de maladies associées au vieillissement, comme le cancer et les maladies neurodégénératives. Dans le cadre de la leucémie aiguë myéloïde, des études menées par l'équipe dirigée par Jean-Emmanuel Sarry du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, ont montré qu'il est possible de sensibiliser les cellules jusqu'alors résistantes à la chimiothérapie, en ciblant préalablement la fonction mitochondriale. C'est dans ce contexte que s'inscrit le sujet de cette thèse, portant sur la conception et la réalisation de micro-capteurs électrochimiques dédiées à l'analyse du métabolisme mitochondrial, à l'échelle de la mitochondrie isolée. La fabrication des microsystèmes s'est déroulée dans la salle blanche du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes de Toulouse, sous l'encadrement des chercheurs Jérôme Launay et Pierre Temple-Boyer, spécialisés dans la conception de capteurs pour la détection d'espèces en phase liquide. Finalement, un système complet assurant le couplage à la microscopie et à la gestion des fluides a été fabriqué, validé, et breveté. Les résultats obtenus nous permettent d'envisager l'analyse à l'échelle de la mitochondrie unique par une approche parallélisée, ce qui n'a encore jamais été réalisé.

English

The role of mitochondria have been restricted to oxidative phosphorylation for a long time. Now it is clear that they are also the main sources of reactive oxygen species, implied in oxidative stress and cell-to-cell signaling. Thus, mitochondrial malfunction is potentially the cause of the appearance and the progression of diseases linked to ageing like cancers and neurodegenerative troubles. In the frame of acute myeloid leukemia, studies governed by Jean-Emmanuel Sarry of the Cancer Research Center of Toulouse, showed that it is possible to improve the efficacy of current chemotherapies by targeting mitochondria's function. In this context, the objective of the thesis presented here consist in the design and the manufacturing of electrochemical micro-sensors, dedicated to the analysis of the metabolic activity of isolated mitochondria. The manufacturing occurred in the clean room facilities of the Laboratory for Analysis and Architecture of Systems of Toulouse under the supervision of Jérôme Launay and Pierre Temple-Boyer, researchers specialized in the development of solutions aiming the detection of species diluted in solution. Finally, a complete system ensuring the coupling with microscopy and fluidics have been realized, validated, and patented. The results obtained allow us to consider the analysis at the scale of the single mitochondrion with a parallelized approach, thing that have never been made.