



HAL
open science

Biocapteurs implantables pour un monitoring intracérébral minimalement invasif

Charles Chatard

► **To cite this version:**

Charles Chatard. Biocapteurs implantables pour un monitoring intracérébral minimalement invasif. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSEI086 . tel-02061836

HAL Id: tel-02061836

<https://theses.hal.science/tel-02061836>

Submitted on 8 Mar 2019

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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSEI086

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'institut national des sciences appliquées de Lyon

Ecole Doctorale EDA160
Electronique, Electrotechnique, Automatique

Spécialité/ discipline de doctorat :

Ingénierie pour le vivant

Soutenue publiquement le 23/11/2018, par :

Charles Chatard

**Biocapteurs implantables pour
un monitoring intracérébral
minimalement invasif**

Devant le jury composé de :

Jaffrezic Nicole	Directeur de recherches	ISA (Villeurbanne)	Présidente du jury
Arbault Stéphane	Directeur de recherches	ISM (Talence)	Rapporteur
Temple-Boyer Pierre	Directeur de recherches	LAAS (Toulouse)	Rapporteur
Guille-Colignon Manon	Maître de conférences	ENS (Paris)	Examinatrice
Barbier Daniel	Professeur d'université	INSA (Lyon)	Directeur de thèse
Marinesco Stéphane	Chargé de recherches	CRNL (Lyon)	Directeur de thèse
Sabac Andrei	Ingénieur de recherches	INSA, Lyon)	Invité
Jourlin Yves	Professeur d'université	LHC (St-Etienne)	Invité

© Chatard, 2018

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2016-2020

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	<u>CHIMIE DE LYON</u> http://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr INSA : R. GOURDON	M. Stéphane DANIELE Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon IRCELYON-UMR 5256 Équipe CDFA 2 Avenue Albert EINSTEIN 69 626 Villeurbanne CEDEX directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	<u>ÉLECTRONIQUE,</u> <u>ÉLECTROTECHNIQUE,</u> <u>AUTOMATIQUE</u> http://edeea.ec-lyon.fr Sec. : M.C. HAVGOUDOUKIAN ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI École Centrale de Lyon 36 Avenue Guy DE COLLONGUE 69 134 Écully Tél : 04.72.18.60.97 Fax 04.78.43.37.17 gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	<u>ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME,</u> <u>MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION</u> http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : H. CHARLES secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	M. Philippe NORMAND UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Université Claude Bernard Lyon 1 Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX philippe.normand@univ-lyon1.fr
EDISS	<u>INTERDISCIPLINAIRE</u> <u>SCIENCES-SANTÉ</u> http://www.ediss-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : M. LAGARDE secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	Mme Emmanuelle CANET-SOULAS INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 Avenue Jean CAPELLE INSA de Lyon 69 621 Villeurbanne Tél : 04.72.68.49.09 Fax : 04.72.68.49.16 emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	<u>INFORMATIQUE ET</u> <u>MATHÉMATIQUES</u> http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 Fax : 04.72.43.16.87 infomaths@univ-lyon1.fr	M. Luca ZAMBONI Bât. Braconnier 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.26.23.45.52 zamboni@maths.univ-lyon1.fr
Matériaux	<u>MATÉRIAUX DE LYON</u> http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Marion COMBE Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.87.12 Bât. Direction ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIÈRE INSA de Lyon MATEIS - Bât. Saint-Exupéry 7 Avenue Jean CAPELLE 69 621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.85.28 jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	<u>MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE,</u> <u>GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u> http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Marion COMBE Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.87.12 Bât. Direction mega@insa-lyon.fr	M. Jocelyn BONJOUR INSA de Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69 621 Villeurbanne CEDEX jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr
ScSo	<u>ScSo*</u> http://ed483.univ-lyon2.fr Sec. : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.72.76 viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr	M. Christian MONTES Université Lyon 2 86 Rue Pasteur 69 365 Lyon CEDEX 07 christian.montes@univ-lyon2.fr

Remerciements

Je souhaite en premier lieu exprimer ma sincère gratitude envers mes directeurs de thèse qui m'ont donné l'opportunité de réaliser cette expérience qu'est le doctorat. Je les remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir choisi pour réaliser ce projet. Ces trois années de travail sur un sujet aussi pluridisciplinaire ont constitué pour moi une occasion unique d'acquérir des connaissances dans des domaines nouveaux pour moi, comme l'expérimentation animale et les neurosciences.

Plus particulièrement, je désire grandement remercier mon directeur, Stéphane Marinesco, pour sa disponibilité et son attention à mon travail. Ses qualités pédagogiques comme scientifiques ont contribué de manière essentielle à la réussite de mon travail. J'ai pu énormément apprendre à ses côtés et ce fut un réel plaisir de travailler avec lui.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance envers mon directeur, Daniel Barbier. Son expérience scientifique, ses conseils et nos discussions m'ont permis de surmonter bien des obstacles auxquels j'ai été confronté.

Je tiens encore à remercier vivement mon co-directeur, Yves Jourlin, qui malgré le peu d'occasions que nous avons pu avoir de mettre en valeur la collaboration entre le laboratoire Hubert Curien et mes travaux a su se rendre disponible et me montrer son intérêt et sa motivation afin que je puisse concrétiser mes idées.

J'associe à ces remerciements mon co-directeur, Andrei Sabac, pour sa contribution et le temps qu'il a accordés à mes travaux par la fabrication en salle blanche et les dépôts qu'il a réalisés.

Je désire en outre remercier tous les membres de l'INL et du CRNL que j'ai eu la chance de fréquenter, et plus spécialement les autres doctorants, les membres du CRNL partageant les mêmes locaux à la faculté de médecine, les stagiaires, et bien entendu mes deux principales collègues qui m'ont supporté durant ces années, Anne Meiller et Clélia Allioux. Je tiens chaleureusement à les remercier pour leur précieuse aide lors de mes expérimentations et pour leur soutien.

Ad suas auxilia, consilia et relecturas Victoria praesertim gratias volo.

Résumé

Le fonctionnement du cerveau repose sur la libération de molécules telles que les neurotransmetteurs et les métabolites dans le milieu interstitiel. L'étude de ces molécules est donc primordiale afin de mieux comprendre leur rôle physiologique et pathologique. Pour cela, les biocapteurs enzymatiques implantables sont un outil prometteur de par leurs capacités de détection quantitative, en temps réel et dans les tissus profonds. En fonction des dimensions du biocapteur, l'impact de l'implantation peut avoir des conséquences considérables sur la composition chimique du fluide interstitiel. De plus, chaque implantation induit localement une réaction inflammatoire dite « réaction au corps étranger ». La réduction de ces réactions est indispensable afin d'obtenir des estimations plus précises de la concentration des molécules présentes. Dans ce sens, ce manuscrit exposera deux voies de réduction de l'impact lésionnel dû à l'implantation de biocapteurs. Tout d'abord, il sera présenté la miniaturisation de biocapteurs enzymatiques jusqu'à des diamètres externes inférieurs à 15 μm . Et il sera démontré *in vivo* que ces biocapteurs ultra miniaturisés ont le potentiel d'être implantés dans le cerveau sans induire de dommages détectables aux tissus et aux vaisseaux sanguins. Ensuite, le développement d'une microsonde fabriquée à l'aide des technologies MEMS couplant une détection électrochimique et optique sera introduit dans le cadre du suivi du fluide interstitiel péri- et intratumoral de glioblastomes modifiés pour émettre de la fluorescence. En intégrant deux types de détection sur une unique micro-aiguille, cette microsonde permet de réduire le nombre d'implantations. Ces deux voies de miniaturisation ouvrent la possibilité de suivre la composition chimique du fluide interstitiel de manière moins invasive, et donc de mieux préserver la physiologie des tissus étudiés dans le cerveau.

Mots-clés : *biocompatibilité, miniaturisation, électrochimie, enzyme, optique, fluorescence, biocapteur, microsonde, MEMS, in vivo, rat.*

Table des matières

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	I
RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
INTRODUCTION.....	17
CHAPITRE I - ANALYSE NEUROCHIMIQUE DU MILIEU INTERSTITIEL DU CERVEAU.....	23
I. Neurochimie du cerveau	25
1. Le milieu interstitiel	25
2. Mécanismes de diffusion des molécules au sein du fluide interstitiel	27
II. Méthodes pour l'analyse du milieu interstitiel	29
1. Tomographie par émission de positron	30
2. Protéines rapporteuses fluorescentes	31
3. Microdialyse.....	32
4. Techniques électrochimiques	34
4.1. Microélectrodes sélectives aux ions.....	36
4.2. Détection directe.....	36
4.3. Détection enzymatique	38
III. Biocapteurs enzymatiques	39
1. Principe de transduction de l'activité enzymatique en courant électrique.....	39
2. Générations de biocapteurs.....	40
2.1. Première génération	40
1.2.a Couche sélective	42
1.2.b Médiateurs électrochimiques.....	43
2.2. Seconde génération.....	43

2.3.	Troisième génération	44
3.	Cinétique enzymatique	46
4.	Immobilisation de l'enzyme	48
4.1.	La réticulation	50
4.2.	Piégeage enzymatique	51
IV.	Les différents types de microélectrodes, et leur conception	53
1.	Dispositif à détection unique	53
2.	Dispositif à détection multiple	55
3.	Les technologies MEMS	55
3.1.	La structuration	56
3.2.	Le dépôt de matériaux	57
3.3.	La gravure	59
4.	L'application aux biocapteurs	61
V.	Biocompatibilité	62
1.	Libération de médicaments à l'aide de couche polymère	64
2.	Biocompatibilité de la surface externe du biocapteur	65
3.	Importance de la dimension du biocapteur	65
VI.	Exemples de contributions des biocapteurs aux neurosciences	67
1.	Métabolisme énergétique, le glucose et le lactate	68
2.	Neurotransmetteurs excitateurs, le glutamate et la D-sérine	70
3.	L'acétylcholine et la choline	71
4.	Transmission purinergique, l'adénosine et l'ATP	73
VII.	Axes et stratégie expérimentaux	74
CHAPITRE II - DÉVELOPPEMENT DE BIOCAPTEURS ENZYMATIQUES ULTRA-MINIATURISÉS ET ÉVALUATION DE L'IMPACT DE LA MINIATURISATION SUR LA MESURE <i>IN VIVO</i>		77
I.	Introduction	79
II.	Matériels et méthodes	81
1.	Techniques de métallisation	81
2.	Fabrication des biocapteurs	82
3.	Techniques de calibration et d'acquisition, <i>in vivo</i>	84
4.	Protocoles <i>in vivo</i>	86
5.	Statistiques	92

III. Fabrication et caractéristiques des biocapteurs.....	92
1. Fonctionnalisation de fibres de carbone	92
2. Paramètres de métallisation par pulvérisation : Influence sur les propriétés électrochimiques	95
3. Propriétés électrochimiques.....	100
4. Obtention de biocapteurs par immobilisation d'enzymes.....	101
IV. Impact de la miniaturisation, <i>in vivo</i>	103
1. Impact de l'implantation.....	103
2. L'oxygène	106
3. Le glucose.....	107
4. Le lactate.....	110
5. La D-sérine et le glutamate	111
V. Discussion et conclusion	114
CHAPITRE III - ASSOCIATION DE BIOCAPTEURS ÉLECTROCHIMIQUES ET OPTIQUES POUR L'ANALYSE DU MILIEU NEUROCHIMIQUE DE GLIOBLASTOMES.....	121
I. Introduction	123
II. Matériels et méthodes	125
1. Les cellules tumorales fluorescentes	125
1.1. La fluorescence.....	125
1.2. Photo-blanchiment.....	127
1.3. Protéine fluorescente verte (GFP) et fluorescéine (FITC).....	128
1.4. Fluorescence endogène.....	129
2. Le système optique	130
2.1. Signal d'excitation	130
2.2. Détection de la fluorescence.....	131
2.3. Fibre optique	132
3. Mesures électrochimiques.....	132
III. La microsonde	133
1. Spécifications	133
1.1. Propagation de la lumière dans les tissus	133
1.2. Effets photoélectriques	134
2. Conception de la microsonde	135
3. Fabrication	137

IV. Caractérisation du système	140
1. Détection enzymatique du lactate au moyen de microélectrodes planes en platine	141
1.1. Détection du H ₂ O ₂	142
2. Biofonctionnalisation	146
3. Localisation par fluorescence de cellules tumorales modifiées.....	148
3.1. Échauffement des tissus.....	148
3.2. Performance de la détection de fluorescence	150
3.3. Modèle <i>in vitro</i> de la localisation par fluorescence de cellules tumorales	151
4. Perturbation de la mesure enzymatique par l'excitation optique.....	153
V. Conclusion et perspectives	157
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	161
BIBLIOGRAPHIE	167
ANNEXES.....	I

Liste des figures et des tableaux

Chapitre I

Figure I-1. Image en microscopie électronique en transmission de la matière grise du cerveau.	26
Figure I-2. Exemple d'un spectre RMN in vivo.	30
Figure I-3. La microdialyse.....	34
Figure I-4. Représentations schématiques de l'évolution des biocapteurs.	45
Figure I-5. Représentation graphique de la cinétique de Michaelis-Menten.	48
Figure I-6. Exemple d'un biocapteur à détection unique.	55
Figure I-7. Représentation schématique des dépôts physiques.....	58
Figure I-8. Vue d'ensemble d'un biocapteur à plusieurs électrodes.	62
Figure I-9. Représentation temporelle de la réaction à un corps étranger en réponse à l'implantation d'un biocapteur.	63
Figure I-10. Microsonde SU-8 avec des canaux microfluidiques pour la libération de médicaments.	64
Figure I-11. Impact de l'implantation en fonction de la dimension des biocapteurs.....	67
Figure I-12. Exemple de détection de la glycémie cérébrale et du lactate.	69
Figure I-13. Exemple de détection de la choline dans le cerveau.....	72
Tableau I-1. Molécules électroactives redox et de leur potentiel d'oxydation respectif.	42
Tableau I-2. Techniques d'immobilisation d'enzyme.	49

Chapitre II

Figure II-1. Décomposition schématique d'un biocapteur fabriqué à la main.	83
Figure II-2. Exemple d'étalonnage <i>in vitro</i> d'une microélectrode au H ₂ O ₂	85
Figure II-3. Réduction de l'O ₂ sur une fibre de carbone platinée.	86
Figure II-4. Procédure d'insertion du cathéter.	88
Figure II-5. Procédure de craniotomie.	89
Figure II-6. Comparaison entre différentes métallisations et effets de la PPD sur la sensibilité au H ₂ O ₂	94
Figure II-7. Images au microscope électronique à balayage de dépôts PVD de Pt.	95

Figure II-8. Comparaison de la sensibilité au H ₂ O ₂ par rapport aux conditions de dépôt par pulvérisation.....	98
Figure II-9. Images au microscope électronique à balayage de dépôts par pulvérisation en fonction de la pression.	98
Figure II-10. Images au microscope électronique à balayage de microélectrodes après plusieurs oxydations de H ₂ O ₂	99
Figure II-11. Propriétés électrochimiques d'une fibre de carbone platinée.	101
Figure II-12. Biofonctionnalisation et calibration.	103
Figure II-13. Évaluation de l'impact physiologique de l'implantation d'un biocapteur.	105
Figure II-14. Mesures de la PO ₂ <i>in vivo</i>	107
Figure II-15. Mesures du glucose <i>in vivo</i>	109
Figure II-16. Mesures du lactate <i>in vivo</i>	110
Figure II-17. Mesures de la D-sérine <i>in vivo</i>	112
Figure II-18. Mesures <i>in vivo</i> de la D-sérine et du glutamate lors de SD.....	113
Tableau II-1. Récapitulatif conditions de dépôts	81

Chapitre III

Figure III-1. Concept physique du principe de fluorescence.	127
Figure III-2. Représentation graphique du photo-blanchiment.....	128
Figure III-3. Comparaison des spectres d'absorption et d'émission de la GFP et de la FITC.	129
Figure III-4. Photographie du système optique à l'intérieur de la boîte noire.	132
Figure III-5. Exemple de perturbations photoélectriques.	135
Figure III-6. Schéma 3D de la microsonde.	137
Figure III-7. Protocole de fabrication de la microsonde.	138
Figure III-8. Microsondes fabriquées.	139
Figure III-9. Photographies des différentes étapes du montage d'une microsonde.	140
Figure III-10. Schéma récapitulatif du principe de la mesure opto-électrochimique de notre système.....	141
Figure III-11. Comparaison de la sensibilité au H ₂ O ₂ des microélectrodes après avoir subi certains traitements.	143
Figure III-12. Exemples de cycles par voltamétrie.....	144

Figure III-13. Exemple d'étalonnage d'une microélectrode biofonctionnalisée.	147
Figure III-14. Modèles de changements de température d'un corps biologique induits par de la lumière.	149
Figure III-15. Simulation de l'effet de la puissance d'excitation sur l'augmentation de la température d'une zone de cerveau exposée par une fibre optique.	150
Figure III-16. Détection <i>in vitro</i> de fluorescence provenant de glioblastomes dans une solution d'aCSF.	151
Figure III-17. Modèle d'étalonnage <i>in vitro</i> du capteur de position des glioblastomes. ...	152
Figure III-18. Exemples de perturbations par l'excitation optique sur des dispositifs conventionnels.	155
Figure III-19. Perturbations opto-électrique sur une microsonde <i>in vitro</i>	156

Liste des abréviations

5-HIAA	Acide 5-hydroxyndolacétique
5-HT	Sérotonine
Al ₂ O ₃	Alumine
ALD	Dépôt de couches minces atomiques
Ar	Argon
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BHE	Barrière hématoencéphalique
BSA	Sérum d'albumine bovine
Cr	Chrome
CSD	Vague de dépolarisation corticale
DAAO	D-amino oxydase
DET	Transfert direct d'électron
DOPAC	Acide dihydroxyphénylacétique
DRIE	Gravure ionique réactive profonde
EIS	Spectroscopie d'impédance électrochimique
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FiO ₂	Fraction inspirée en oxygène
FITC	Fluorescéine
FMN	Flavine mononucléotide
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster
GFP	Protéine fluorescente verte
GNP	Nanoparticule d'or
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HEK	Cellule rénale embryonnaire humaine
kCl	Chlorure de potassium
MEB	Microscope électronique à balayage
MEMS	Microsystème électromécanique
NA	Ouverture numérique
NAA	N-acétyl aspartate
NAD(P)	Nicotinamide adénosine dinucléotide (Phosphate)
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Oxyde nitrique
NTC	Nanotube de carbone
PBS	Tampon phosphate salin
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEGDE	Ether poly(éthylène glycol)diglycidyl
PHEMA	Poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle)
PO ₂	Pression partielle d'oxygène
PPD	Poly-phényldiamine
Pt	Platine
PVD	Dépôt physique par phase vapeur
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SD	Vague de dépolarisation
Si	Silicium
TEP	Tomographie par émission de positron
Ti	Titane
TMOS	Tétraméthoxysilane
TTX	Tétradotoxine

*« Je n'ai pas de talent particuliers. Je suis juste passionnément curieux. » -Albert Einstein
(1879 -1955)*

Introduction

Communément, lorsque l'on parle de communication dans le cerveau, on visualise l'activité électrique de ce dernier : un influx électrique se déplaçant d'un endroit à un autre, communiquant l'information. En réalité, le fonctionnement du cerveau repose sur la combinaison de ces signaux électriques (*id est* potentiels d'action) et d'autres chimiques. A la suite de la réception d'un signal par une dendrite, ce signal est conduit jusqu'au corps cellulaire du neurone puis il est redirigé par l'axone jusqu'à sa terminaison où se trouve des vésicules contenant des composés chimiques (*id est* des neurotransmetteurs). Ceux-ci sont libérés à la suite de l'arrivée de ce potentiel d'action au sein de l'espace synaptique (de l'ordre d'une dizaine de nanomètres) entre ce neurone dit présynaptique et un autre neurone postsynaptique. Là, ces molécules diffusent vers les récepteurs de la dendrite postsynaptique induisant ou non, selon que les neurotransmetteurs libérés sont excitateurs ou inhibiteurs, un potentiel d'action sur ce dernier. L'activité des neurones est donc largement déterminée par l'équilibre entre ces mécanismes d'excitation et d'inhibition. L'ensemble de l'espace entre les cellules du cerveau et les capillaires sanguins est rempli par le fluide interstitiel, et c'est dans ce fluide que l'ensemble des échanges chimiques se produit. Il contient donc des neurotransmetteurs mais aussi des métabolites énergétiques qui sont indispensables à la survie et à l'activité des neurones. De ce fait, l'étude de sa composition permet d'obtenir des informations essentielles sur le fonctionnement physiologique et pathologique du cerveau. Diverses techniques non-invasives ont été développées pour suivre les concentrations des neurotransmetteurs et métabolites dans le cerveau mais elles présentent différents problèmes. Par exemple, la tomographie par émission de positrons, ou encore les rapporteurs fluorescents permettent de suivre de manière non invasive la composition neurochimique du cerveau mais ces mesures ne sont que qualitatives et ne donnent pas de valeurs quantitatives de la concentration d'un composé chimique. Un autre exemple, les techniques par résonance magnétique comme l'IRM ou la RMN ne fournissent que des mesures de concentration volumiques. Que ce soit pour une meilleure compréhension fondamentale du fonctionnement du cerveau ou pour développer des traitements, il est important de réaliser des mesures quantitatives et précises de ces concentrations. Pour cela, les biocapteurs enzymatiques implantables représentent une voie prometteuse et qui a déjà prouvé son potentiel en recherche pré clinique pour comprendre le fonctionnement biochimique du cerveau. Ils permettent de suivre en temps réel la concentration d'un neurotransmetteur ou d'un métabolite donné dans n'importe quelle zone du cerveau.

Toutefois, leur mise en place provoque des dommages tissulaires et vasculaires dus à la déformation mécanique provoquée au moment de l'implantation. Ces détériorations conduisent à une réaction inflammatoire qui en plus de modifier la composition chimique du milieu interstitiel, mènera avec le temps à un encrassement biologique (biofouling) du biocapteur limitant la sensibilité des mesures, et à un isolement du dispositif par rapport au milieu ambiant. Il apparaît nécessaire d'atténuer l'impact physiologique de l'implantation de biocapteurs par la réduction de ces réactions. La biocompatibilité de la surface en contact avec les tissus, l'injection d'un traitement médicamenteux localisé, la miniaturisation des dispositifs implantés, ou encore la réduction du nombre d'implantations sont des axes de recherche allant dans ce sens.

L'objectif principal des travaux de thèse qui vont suivre a été de développer des dispositifs implantables réduisant l'impact lésionnel sur les tissus du cerveau lors d'une implantation, d'évaluer les conséquences de cette réduction et ainsi de démontrer la nécessité de concevoir de nouveaux biocapteurs ultra miniaturisés respectant au maximum la physiologie du lieu d'implantation. Cette réduction de l'impact induit par l'implantation entraînera une amélioration de la mesure neurochimique. Deux voies ont été explorées, la miniaturisation de biocapteurs avec des diamètres inférieurs à 15 μm et la réduction du nombre d'implantations par l'intégration de biocapteurs optique et électrochimique sur un unique support. Cependant, elles présentent des enjeux technologiques importants. Une miniaturisation à cette échelle a impliqué de développer un dispositif ayant des propriétés électrochimiques adaptées à la détection enzymatique à l'aide de fibres de carbone de 7 μm de diamètre. Et l'intégration d'un capteur optique et d'un biocapteur électrochimique sur un même dispositif a demandé de concevoir une microsonde permettant de réaliser une double mesure en simultanée sans que l'une n'altère la seconde.

Le Chapitre I est une revue bibliographique des méthodes d'analyse du milieu interstitiel du cerveau. Il expose le principe de fonctionnement des biocapteurs implantables et plus particulièrement celui des biocapteurs enzymatiques. Puis, les implications physiologiques dues à une implantation sont expliquées. Les différentes solutions explorées par la communauté scientifique sont passées en revue. Enfin, le potentiel des biocapteurs enzymatiques est démontré par des exemples de leur contribution à l'étude physiologique et pathologique du cerveau. Le Chapitre II présente la miniaturisation d'un biocapteur enzymatique grâce à l'utilisation de fibres de carbone platinées permettant d'obtenir un

diamètre externe inférieur à 15 μm . Puis l'impact de cette miniaturisation sur la mesure du glucose, du lactate, de l'oxygène, de la D-sérine et du glutamate est évalué *in vivo* en comparaison de biocapteurs conventionnels, plus larges. Enfin, le Chapitre III décrit la réalisation de l'association d'un biocapteur optique et électrochimique sur une unique sonde fabriquée en salle blanche. Cette microsonde est par la suite caractérisée *in vitro* dans le cadre du suivi neurochimique de l'environnement de cellules de glioblastomes fluorescents.

Chapitre I - Analyse neurochimique du milieu interstitiel du cerveau

L'analyse biochimique du fluide interstitiel du cerveau peut révéler des informations importantes sur les états métaboliques et neurochimiques locaux du parenchyme cérébral, et peut également améliorer notre compréhension de la façon dont les réseaux neuronaux réagissent à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Par conséquent, plusieurs méthodes de suivi moléculaire du cerveau ont été mises au point. Parmi celles-ci, les biocapteurs implantables ont fourni des analyses en temps réel du cerveau d'animaux de laboratoire avec une excellente résolution temporelle et une perturbation minimale des tissus en utilisant des enzymes oxydases. Actuellement, il existe deux types de biocapteurs utilisés pour l'analyse cérébrale *in vivo* : les biocapteurs basés sur des fibres et les aiguilles à multi-électrodes fabriquées en salle blanche. Les microélectrodes en fibre sont généralement fragiles, fabriquées à la main et ne peuvent surveiller qu'un seul analyte. Cependant, ils fournissent les plus petits dispositifs implantables à ce jour. Leur faible dimension améliore considérablement la biocompatibilité et leur permet d'accéder à des structures cérébrales profondes avec une perturbation minimale de la chimie cellulaire locale. En revanche, les biocapteurs fabriquées en forme d'aiguille peuvent être normalisés et sont potentiellement compatibles avec des dispositifs multicanaux pour détecter plusieurs analytes simultanément. Les biocapteurs ont déjà contribué de façon significative à notre compréhension du métabolisme énergétique du cerveau grâce à la détection du glucose et du lactate, et aux rôles des neurotransmetteurs grâce à la détection du glutamate, de la D-sérine, de l'acétylcholine et des purines. Par conséquent, les biocapteurs implantables ont le potentiel de connaître des progrès technologiques et de contribuer de manière significative à l'étude neurochimique au cours de futurs travaux de recherche.

I. Neurochimie du cerveau

Le cerveau est un organe extrêmement complexe qui contient des dizaines de milliards de vaisseaux sanguins, de neurones et de cellules gliales, et chaque ensemble de cellules a une identité génétique et biochimique unique ^[1]. La taille moyenne d'un corps cellulaire neuronal varie généralement de 10 μm à 20 μm ^[2], tandis que les structures sous-cellulaires importantes comme les synapses et les épines dendritiques sont encore plus petites, allant de 0,5 à 2 μm ^[3]. Par conséquent, l'insertion d'un biocapteur électrochimique dans un cerveau vivant entraîne inévitablement la destruction d'au moins certains processus cellulaires. Cependant, un biocapteur implanté est capable de contacter directement le liquide dans lequel les cellules du cerveau sont immergées, appelé fluide interstitiel, et les interactions entre un biocapteur et ce fluide peuvent permettre d'analyser la composition chimique de ce fluide essentiel.

1. Le milieu interstitiel

Le fluide interstitiel correspond au milieu qui entoure toutes les cellules du cerveau et représente environ 15 à 20 % du volume total du cerveau ^[4] (**Figure I-1**). Chez les adultes humains, le volume total de liquide interstitiel est d'environ 120 mL ^[5], alors qu'il est inférieur à 40 μL chez la souris ^[6]. La composition ionique typique du fluide interstitiel est de l'ordre de 140 - 150 mM Na^+ , 3,5 - 4 mM K^+ , 1,2 - 1,5 mM Ca^{2+} , 0,7 - 0,9 mM Mg^{2+} , et 99 - 113 mM Cl^- ^[7-11]. De plus, il contient de nombreux métabolites énergétiques importants tels que le glucose (1,2 - 1,5 mM) et le lactate (0,8 - 1 mM), ainsi que de nombreuses petites molécules dont des vitamines, des hormones et des neurotransmetteurs ^[12]. Cette composition peut changer avec l'âge, l'état de veille-sommeil ou au cours du développement de maladies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer ou encore après une lésion cérébrale ^[13]. En conséquence, la composition chimique du liquide interstitiel contient des informations utiles sur l'état pathologique/physiologique du tissu cérébral et peut révéler des biomarqueurs importants pour le diagnostic du dysfonctionnement neurologique. Dans les unités de soins intensifs neurologiques, les concentrations de métabolites énergétiques cérébraux, comme le glucose, le lactate et le pyruvate, sont surveillées toutes les heures chez

les patients cérébrolésés sévères, et ces niveaux peuvent aider à diagnostiquer des complications ischémiques secondaires et des infarctus cérébraux ^[14,15].

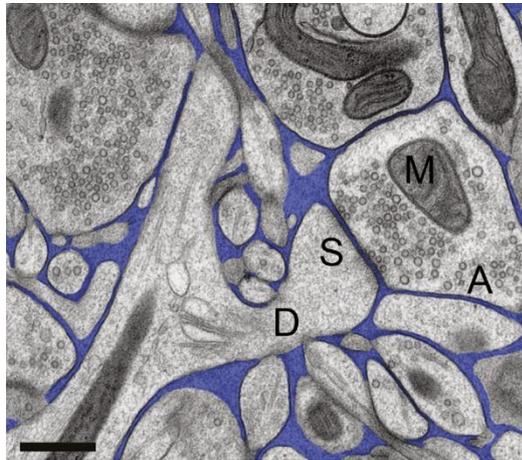


Figure I-1. Image en microscopie électronique en transmission de la matière grise du cerveau. Ce tissu a été préservé par cryo-fixation, une méthode de congélation à haute pression qui fournit la représentation la plus fidèle des structures biologiques à ce jour. L'espace interstitiel est en bleu et représente environ 15 % du volume total du cerveau. Barre d'échelle : 500 nm. A. Axone présynaptique ; D. Colonne dendritique ; M. Mitochondrie ; S. Synapse. (Adapté de Korogod, Petersen et Knott 2015, *Elife* 4:e05793).

Chez les animaux de laboratoire, l'analyse des concentrations de neurotransmetteurs ou de leurs métabolites présents dans le liquide interstitiel peut révéler des activateurs spécifiques des réseaux neuronaux. Par exemple, les neurones cholinergiques libèrent de l'acétylcholine comme neurotransmetteur, et cette molécule diffuse à partir des fentes synaptiques pour être dégradée en choline par l'enzyme acétylcholine estérase. En conséquence, l'activation des voies neuronales cholinergiques entraîne une augmentation rapide de la concentration de choline dans le liquide interstitiel, et cette augmentation a été facilement détectée par des biocapteurs électrochimiques implantés dans le parenchyme cérébral ^[16,17]. La D-sérine, neuromodulateur excitateur libéré par les cellules gliales et/ou les neurones pour potentialiser la transmission glutamatergique, peut également être quantifiée dans le liquide interstitiel, et il a été montré que sa concentration extracellulaire se trouve altérée dans le cadre de la maladie d'Alzheimer ^[18-20]. Cependant, les mécanismes par lesquels les composés neurochimiques sont libérés dans les synapses et diffusent dans le milieu interstitiel font actuellement l'objet d'un débat, surtout en ce qui concerne le principal neurotransmetteur excitateur, le glutamate. Par exemple, on ne sait toujours pas si le glutamate libéré par une synapse diffuse dans le liquide interstitiel extrasynaptique ou s'il reste confiné dans la fente synaptique en raison de l'action rapide de transporteurs membranaires spécifiques. Des changements transitoires dans les concentrations extrasynaptiques de glutamate ont été décrits dans le cortex et l'amygdale à l'aide de biocapteurs électrochimiques ^[21-23]. Cependant, même avec l'utilisation de biocapteurs

enzymatiques hautement sélectifs, des débordements de glutamate provenant de synapses hippocampiques stimulées électriquement se sont révélés indétectables [24].

2. Mécanismes de diffusion des molécules au sein du fluide interstitiel

La taille typique d'une synapse est de 0,05 à 0,06 μm^2 et elle peut être aussi mince que 20 nm [25]. Avec ces dimensions, les dispositifs implantés sont incapables de sonder les concentrations dans les synapses. En réalité, les dispositifs implantés sont exposés à des composés chimiques et biochimiques dans le liquide interstitiel qui sont de nature extrasynaptique. Outre les débats actuels sur la sélectivité des biocapteurs à microélectrodes et l'origine cellulaire du glutamate dans l'espace extrasynaptique, la détermination des mécanismes cellulaires responsables du contrôle des concentrations de neurotransmetteurs dans l'espace extracellulaire demeure un défi complexe.

Les trois principaux mécanismes qui contrôlent la diffusion des petites molécules comme les neurotransmetteurs et les métabolites dans le fluide interstitiel sont :

- (1) La tortuosité ;
- (2) L'obstruction provenant de la matrice extracellulaire ;
- (3) Les systèmes de recapture.

La tortuosité. Un paramètre important qui contrôle la diffusion des composés neurochimiques dans le fluide interstitiel est sa géométrie. L'espace extracellulaire est un compartiment très tortueux, ce qui augmente la distance parcourue par une molécule lorsqu'elle diffuse à travers le parenchyme cérébral. La tortuosité peut être quantifiée comme le rapport de la longueur du trajet réel de la molécule sur la distance entre le point de départ et d'arrivée, et cela varie habituellement entre 1,35 et 1,7 [26]. La tortuosité et la géométrie globale de l'espace interstitiel peuvent changer avec l'âge, la région du cerveau ou l'état physiopathologique [26]. Un exemple de ce changement de tortuosité peut être observé chez les rats femelles gestantes dont la tortuosité de l'espace interstitiel cérébral peut varier considérablement en quelques semaines, de 1,34 chez des rates vierges à 1,50 chez des mères allaitantes [27].

L'obstruction. Un second facteur essentiel influençant la diffusion des molécules dans le fluide interstitiel est la présence d'une matrice extracellulaire composée de macromolécules comme le collagène et les glycoprotéines. Un composant essentiel de cette matrice extracellulaire sont les protéoglycanes qui sont composés d'une protéine centrale modifiée par des chaînes latérales de glycosaminoglycanes [28,29]. Ces macromolécules sont sécrétées par les neurones et les cellules gliales et elles remplissent une grande variété de fonctions structurelles et biochimiques. En conséquence, la matrice extracellulaire fournit des points d'ancrage structurels pour les cellules du cerveau, elle guide la migration cellulaire, la croissance des axones et la division cellulaire pendant le développement du cerveau, et elle régule aussi la plasticité synaptique à l'âge adulte [29].

La matrice extracellulaire est également une source majeure d'entrave à la diffusion des molécules dans le liquide interstitiel et sa composition, comme la tortuosité, peut changer avec l'âge ou varier d'une région du cerveau à une autre. Par exemple, la matrice extracellulaire est particulièrement dense dans les filets périneuronaux qui entourent les corps cellulaires neuronaux et ceux de la partie proximale des dendrites. De plus, sa composition chimique peut aussi se modifier en réponse à des états pathologiques induits par des traumatismes crâniens, la sclérose en plaques, ou encore par des maladies psychiatriques [28,29].

Les systèmes de recapture. La communication entre deux synapses est effectuée par le biais de la libération de neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique. Une fois que ces neurotransmetteurs ont rempli leur fonction de transmission de l'impulsion neuronale, ils sont recaptés par des protéines de transports localisées le long de la membrane plasmique d'une synapse ou d'une cellule gliale. Elles permettent leur recyclage, la régulation de leur concentration au sein du fluide interstitiel, et contrôlent ainsi la durée du signal résultant de cette libération. Ces systèmes ont donc un rôle important pour la régulation des concentrations de molécules au sein du fluide interstitiel.

Il est primordial de prendre en compte ces mécanismes lors des analyses *in vivo* du liquide interstitiel cérébral.

II. Méthodes pour l'analyse du milieu interstitiel

Étant donnée la tortuosité élevée de l'espace interstitiel du cerveau et la petite taille des composants cellulaires neuronaux et gliaux, il est difficile d'effectuer une analyse spécifique du liquide interstitiel. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est capable de mesurer les concentrations de manière non invasive, bien qu'elle ne puisse déterminer que la concentration totale d'un produit chimique dans un volume donné de tissu cérébral. Certains noyaux nucléaires possédant un spin non nul présentent la capacité de pouvoir entrer en résonance magnétique nucléaire lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement électromagnétique externe. Les noyaux vont ainsi absorber l'énergie du champ électromagnétique, puis se relaxer en libérant cette énergie à une fréquence précise. En paramétrant une fréquence d'excitation et d'observation spécifique à un noyau, la spectroscopie par RMN permet d'observer un élément en particulier. Ce phénomène est également utilisé par l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Une grande variété de molécules a été détectée dans le cerveau avec la RMN. En particulier, le N-acétyl aspartate (NAA) est un marqueur utile de l'intégrité et de la densité neuronale. La détection de la choline ou de la créatine peut également révéler des caractéristiques importantes du métabolisme des cellules cérébrales et du renouvellement des membranes [30].

Cependant, la détection de neurotransmetteurs et de métabolites dans le fluide interstitiel par spectroscopie RMN présente plusieurs limites. Tout d'abord, cette méthode de détection souffre parfois d'une faible sensibilité, ce qui implique une faible résolution quant à la détection de molécules individuelles. Par exemple, le métabolite de la glutamine, le glutamate, ne peut être distingué qu'à une intensité de champ magnétique élevée de 3 Tesla ou plus [31]. Plus important encore, la spectroscopie RMN fournit les concentrations extracellulaires et intracellulaires moyennes dans un volume donné, et celles-ci peuvent différer largement de la concentration extracellulaire réelle. Pour la plupart des neurotransmetteurs, les réserves intracellulaires sont beaucoup plus importantes que les quantités de molécules libres dans le liquide interstitiel (**Figure I-2**) [32]. Par exemple, la concentration intracellulaire de glutamate dans les neurones est estimée à environ 15 mM [33,34], alors que la concentration de glutamate extracellulaire est estimée à 1 μ M ou moins [24,33,35], ce qui représente moins de 0,01 % de la quantité totale de glutamate dans un volume donné. Par conséquent, les mesures de tissus entiers obtenues par spectroscopie RMN sont

mal corrélées avec les concentrations interstitielles qui influencent l'occupation des récepteurs et la communication neuronale.

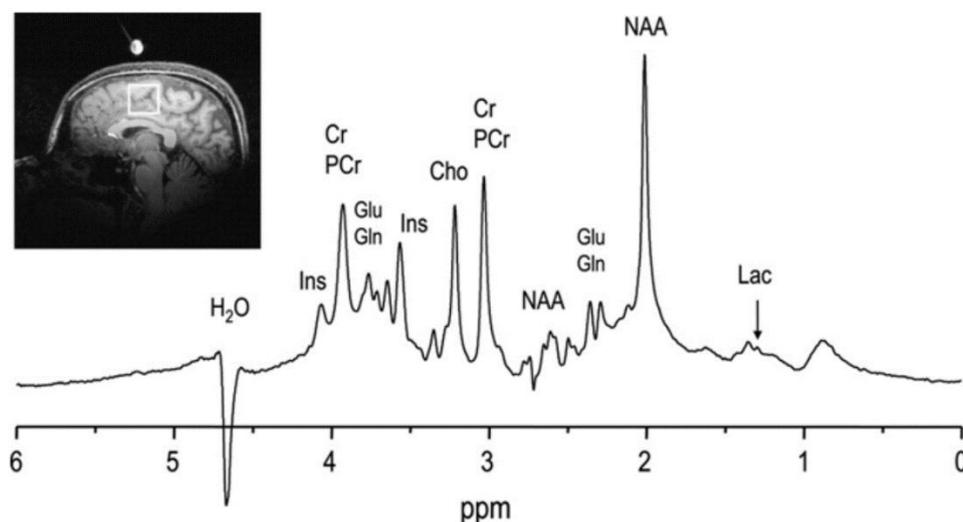


Figure I-2. Exemple d'un spectre RMN *in vivo*.

Spectre réalisé dans la région pariétale d'un cerveau humain acquis à 3 T (reproduit de Choi *et al.*, 2004 ^[32]).

1. Tomographie par émission de positron

Pour évaluer la composition du liquide interstitiel cérébral de manière non invasive, il est possible d'utiliser la tomographie par émission de positron (TEP), une technique qui permet de détecter les radiotraceurs, composés d'une molécule vectrice et d'un isotope radioactif, dans le cerveau des humains et des animaux. En quelques mots, pour estimer la concentration d'un composé neurochimique dans le fluide interstitiel, un ligand radioactif est injecté et se lie spécifiquement à un récepteur membranaire qui est normalement occupé par une molécule endogène d'intérêt. Lorsque la concentration de cette molécule change, le radiotraceur est déplacé, et par conséquent, un changement de l'intensité du signal est détecté. La concentration de dopamine dans le liquide interstitiel a été estimée à l'aide de C11-raclopride, un antagoniste des récepteurs D2 sensible à la compétition avec la dopamine endogène. Une augmentation de la concentration extracellulaire de dopamine en réponse à la cocaïne a été évaluée avec cette méthode, révélant ainsi le rôle de la dopamine lors d'état de manque et/ou lors d'une dépendance ^[36,37], tandis qu'une augmentation de la transmission de la dopamine chez les patients schizophrènes a également été détectée par la TEP ^[38]. Toutefois, les estimations des concentrations extracellulaires par TEP ne sont que

qualitatives, et la courte demi-vie des radioligands utilisés pour l'imagerie TEP limite la durée des analyses du liquide interstitiel à environ une heure. De plus, le sujet doit être immobilisé pendant toute la durée de l'acquisition, et pour les animaux, cela nécessite donc une anesthésie. Pour ces raisons, la TEP n'est pas une technique couramment utilisée pour l'analyse du liquide interstitiel.

2. Protéines rapporteuses fluorescentes

Au cours des trente dernières années, des développements remarquables ont été réalisés dans le domaine des protéines fluorescentes. Ceci inclut le développement de protéines fluorescentes comme biocapteurs afin de mesurer des concentrations de molécules neurochimiques dans le fluide interstitiel. Plusieurs modèles ont été établis dans lesquels un récepteur et un fragment de protéines fluorescentes, capable de transférer de l'énergie à un second fragment de protéine, sont attachés à la membrane plasmique des neurones et/ou des cellules gliales. Lorsqu'une molécule d'intérêt dans le fluide interstitiel se lie au récepteur, un changement structural est induit affectant le taux de transfert d'énergie entre les deux fluorophores, et ceci est représenté par un changement dans le transfert d'énergie par résonance de type Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) entre les deux fragments de protéines fluorescentes [39,40]. Plusieurs protéines fluorescentes à effet FRET ont été conçues pour sonder des molécules neurochimiques. Par exemple, le glutamate a été détecté avec les protéines rapporteuses fluorescentes FLIPE [41], ou iGluSnFR [42]. Cette méthode a été utilisée pour détecter la libération de glutamate dans la rétine en réponse à des stimuli lumineux [43], ainsi que dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le striatum *in vivo* [44-46]. Cependant, dans la plupart de ces études, les changements dans la concentration de glutamate ont été exprimés en fluorescence normalisée ($\Delta F/F$), et non en molarité absolue.

Récemment, une protéine rapporteuse fluorescente du lactate, Laconic, a été mise au point [47]. Laconic est habituellement exprimée intracellulairement et détecte les concentrations de lactate cytosolique, lactate contenu dans le liquide où baignent les composés de la cellule. Afin d'évaluer le lactate extracellulaire, des cellules renifleuses ou « sniffer » basées sur des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK) exprimant des cellules laconiques sur leur membrane plasmique ont été utilisées [48]. De nombreux biocapteurs FRET sont utilisés pour la détection intracellulaire, notamment pour la détection du Ca^{2+} , du pH ou du glucose dans le cytosol [39]. Jusqu'à présent, les biocapteurs FRET ne

sont utilisés de façon courante que pour détecter le glutamate dans le liquide interstitiel. Cependant, les biocapteurs FRET présentent un certain nombre d'avantages qui soutiennent leur développement en tant que détecteurs de molécules neurochimiques dans la fente synaptique avec une résolution spatiale suffisante pour surveiller plusieurs cellules individuellement. En effet, les biocapteurs de type FRET ont d'excellents temps de réponse permettant une détection neurochimique en moins d'une seconde. D'un autre côté, le principal inconvénient de ces biocapteurs est leur incapacité à quantifier les concentrations basales de composés neurochimiques. Étant donné que le niveau de fluorescence de base de la protéine rapporteuse est influencé par la diffusion de la lumière dans le tissu cérébral, il est difficile de déterminer le rapport entre la protéine liée et la protéine non liée, et par conséquent la concentration basale d'une molécule d'intérêt. Une solution possible à ce problème est de concevoir plusieurs biocapteurs FRET avec des affinités et des gammes dynamiques de détection différentes pour une molécule d'intérêt spécifique, puis de déterminer quels biocapteurs sont saturés dans des conditions basales ^[40]. La quantification des changements de concentration évoqués fait également l'objet d'un débat, car les propriétés optiques des biocapteurs FRET peuvent différer entre les étalonnages *in vitro* et les expériences *in vivo* dû, principalement, aux modèles *in vitro* dont les propriétés optiques sont souvent homogénéisées et donc pas représentatives de la réalité. Par exemple, une diminution de la plage dynamique des biocapteurs FRET a souvent été observée *in vivo* ^[40]. Malgré ces problèmes méthodologiques, les biocapteurs *in vivo* FRET ont un grand potentiel pour surveiller les changements rapides de concentration dans le fluide interstitiel et ils joueront probablement un rôle important dans ce domaine dans les années à venir.

3. Microdialyse

Malgré les progrès récents des techniques d'analyse non invasives, la mesure quantitative des concentrations interstitielles de molécules neurochimiques ne peut être effectuée que par des sondes qui pénètrent dans le parenchyme cérébral et entrent directement en contact avec le liquide interstitiel. La première méthode mise au point à cette fin fut la microdialyse qui consiste à prélever des quantités infimes du liquide interstitiel et analyse les échantillons prélevés de manière externe par chromatographie ou électrophorèse capillaire ^[49]. La microdialyse consiste à perfuser un tube mince de dialyse implanté dans le parenchyme cérébral avec un fluide extracellulaire artificiel, permettant aux petites

molécules de diffuser de part et d'autre de la membrane de dialyse (**Figure I-3**)^[49]. Le principal avantage de cette technique est sa très grande puissance analytique qui permet de détecter et de quantifier jusqu'à 70 analytes avec un seul échantillon^[50,51]. Un autre avantage majeur est que ces sondes de microdialyse peuvent être stérilisées et utilisées cliniquement pour réaliser, par exemple, des diagnostics chez des patients atteints d'une lésion cérébrale. Dans ce type de cas, des sondes de microdialyse sont implantées dans le cerveau du patient afin de compléter la surveillance multimodale de la pression intracrânienne, de la perfusion cérébrale et de la tension d'oxygène des tissus cérébraux^[52]. L'analyse clinique par microdialyse se concentre sur la détermination des concentrations de glucose, de lactate, de pyruvate et de glutamate. Ces données peuvent révéler des complications neurologiques, et elles peuvent prédire le devenir des patients ayant subi un traumatisme crânien grave ou un accident vasculaire cérébral hémorragique^[14,15].

Cependant, la résolution temporelle que peut atteindre la microdialyse est affectée par le temps de diffusion des molécules à travers une membrane de dialyse, ce qui peut prendre au moins plusieurs minutes. Au cours des dernières années, ce paramètre a été considérablement amélioré grâce à l'utilisation d'une technique d'écoulement segmenté qui consiste à intercaler de petites gouttelettes d'huile entre des échantillons de quelques nanolitres qui se dirigent vers un système de collecte et d'analyse sans qu'ils soient mélangés^[53,54]. Dans ces conditions, la microdialyse peut atteindre une résolution temporelle aussi faible que 14 secondes, cependant cela implique le prélèvement de centaines d'échantillons pour une seule analyse^[55]. Une autre considération importante concernant la microdialyse est qu'il s'agit d'une méthode plutôt invasive, avec des diamètres de sonde allant de 210 μm à 500 μm ^[55,56] (voir aussi <http://www.microdialysis.se/>). Par conséquent, l'implantation de la sonde dans le parenchyme cérébral endommage les cellules nerveuses et les vaisseaux sanguins, et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est compromise jusqu'à 28 jours après l'insertion d'une sonde de ce type. Par conséquent, la diffusion dans les tissus cérébraux des molécules contenues dans le sang est considérablement augmentée^[57]. Il s'agit d'un problème potentiellement important puisque la pénétration de l'albumine plasmatique et des lymphocytes dans le cerveau déclenche souvent une inflammation locale entraînant l'activation microgliale^[58,59]. Une gliose a ainsi été observée par des techniques histologiques jusqu'à 1 mm du site d'insertion de la sonde de microdialyse, et des médicaments anti-inflammatoires sont donc souvent administrés afin d'éviter cela^[60,61]. Jusqu'à présent, l'état pathophysiologique du tissu cérébral entourant la sonde fait l'objet d'un

débat. Il est probable que le liquide interstitiel prélevé par microdialyse provienne d'un microenvironnement local soumis à l'inflammation. Ainsi, sa composition chimique peut différer de celle d'un tissu cérébral intact ^[62].

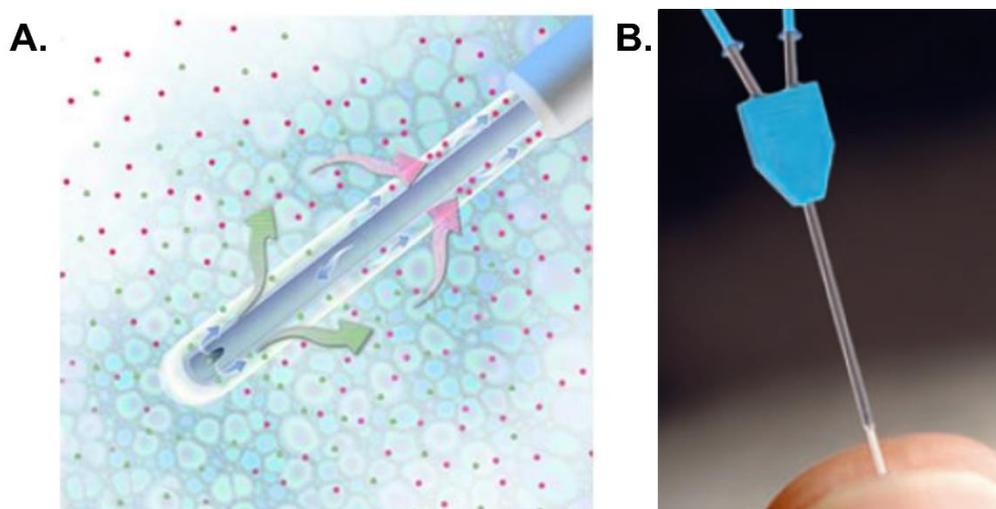


Figure I-3. La microdialyse.

A. Schéma représentant le principe de fonctionnement d'une sonde de microdialyse.

B. Photographie d'une sonde de microdialyse (<http://www.microdialysis.se/>).

4. Techniques électrochimiques

Les phénomènes d'oxydation et de réduction présents *in vivo* génèrent des variations de courant (*ampérométrie*), des variations de potentiel ou d'accumulation de charge (*potentiométrie*), des altérations des propriétés conductrices d'un milieu (*conductimétrie*), ou des variations d'impédance (*impédancemétrie*) mesurable par des microélectrodes implantables. Il est donc possible de surveiller un ou plusieurs de ces changements afin d'analyser les propriétés biologiques d'un milieu. En pratique, ces changements sont observés entre une électrode dite de travail et une électrode de référence. Une troisième électrode peut être ajoutée, l'électrode auxiliaire ou contre électrode, afin que le courant circule entre l'électrode de travail et l'auxiliaire et non par l'électrode de référence. Cela assure, principalement dans le cas où de fortes densités de courant circulent, que le potentiel de référence ne soit pas altéré.

En *ampérométrie*, le courant traversant l'électrode de travail est mesuré. Ce courant provient au moins en partie de l'oxydation ou de la réduction de biomolécules ayant des propriétés électrochimiques ou d'espèces électroactives liées à l'analyte. Les techniques les

plus communes pour étudier ces variations de courant sont les suivantes. L'ampérométrie continue, qui consiste à mesurer un courant à un potentiel constant. Ou la voltamétrie cyclique, où le courant est mesuré tout en appliquant un potentiel cyclique triangulaire. Cette technique est communément utilisée afin de caractériser les capacités électroactives d'une électrode. Elle permet d'obtenir une estimation de la plage de potentiels d'oxydation et de réduction ainsi que le transfert d'électrons entre l'électrode et un analyte spécifique.

En *potentiométrie*, l'accumulation de charges entre l'électrode de travail et la référence est mesurée au sein d'une cellule électrochimique lorsqu'aucun courant ne circule entre ces électrodes.

En *conductimétrie*, c'est la capacité de l'analyte à conduire le courant électrique qui est mesurée. Ces changements de conductance peuvent aussi être mesurés par des techniques d'*impédancemétrie*, usuellement appelées spectroscopie d'impédance électrochimique (ou *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS) ^[63]. L'EIS est une technique de caractérisation qui permet d'étudier la fonction de transfert d'un système en y appliquant de faibles perturbations en potentiel sur une gamme de fréquence et par conséquent d'obtenir une mesure de l'impédance de ce système en fonction de la fréquence. Les données obtenues par l'EIS sont exprimées graphiquement dans un graphe de Nyquist. Les spectres d'impédance comprennent une partie semi-circulaire à hautes fréquences, correspondant au procédé de transfert d'électrons, et une partie linéaire à basses fréquences, résultant de l'étape de limitation de diffusion du procédé électrochimique. Le diamètre du demi-cercle représente la résistance au transfert d'électrons. Si le transfert d'électrons se produit facilement, le tracé de Nyquist apparaît comme une ligne droite. En revanche, si la surface n'est pas conductrice, le graphe aura la forme d'un demi-cercle avec un grand diamètre.

Dans cette volonté de quantifier la concentration de molécules neurochimiques dans le milieu interstitiel, les biocapteurs électrochimiques développés à partir de microélectrodes implantables permettent de réaliser ces différentes mesures électrochimiques. De plus, certaines de ces microélectrodes ont été développées avec de très petites dimensions (de l'ordre de quelques microns) renforçant grandement la biocompatibilité des biocapteurs et améliorant ainsi considérablement l'analyse du milieu interstitiel par rapport à la microdialyse.

4.1. Microélectrodes sélectives aux ions

Une catégorie de microélectrodes utilisées pour analyser le fluide interstitiel du cerveau sont les microélectrodes sélectives aux ions. Ces dispositifs se composent d'une micropipette à double cylindre, l'un des cylindres fournissant une électrode conventionnelle de détection de potentiel, généralement un fil d'Ag/AgCl dans une solution de NaCl 3M, et l'autre cylindre fournissant la partie sélective aux ions du dispositif qui comporte une membrane liquide d'un solvant organique hautement diélectrique renfermant des porteurs sélectifs d'ions tels que H^+ , K^+ , Na^+ , Na^+ , ou Ca^{2+} . Ce dernier est rempli d'une solution contenant une concentration élevée de l'ion d'intérêt de sorte que tout changement de concentration d'ions à l'extérieur de la pipette est perçu comme un changement du potentiel de Nernst à travers la membrane sélective d'ions ^[64]. Ces capteurs sont donc de nature potentiométrique. De plus, le diamètre de leur extrémité est de l'ordre de 2 - 6 μm , ce qui est plus petit que la taille réelle d'un neurone. Cependant, leur performance analytique dépend essentiellement du fait que le porteur d'ions fasse une jonction liquide. De tels composés sont disponibles sur le marché, mais ils sont presque toujours affectés par l'interférence des ions endogènes. Il faut donc faire preuve d'un soin extrême pour s'assurer de la sélectivité des mesures obtenues. Les microélectrodes sélectives aux ions à double cylindre sont généralement fabriquées à la main selon une procédure très délicate ^[64]. Plus récemment, cependant, des électrodes sélectives d'ions fabriquées en salle blanche ont été proposées, et celles-ci faciliteraient la fabrication en masse standardisée de ces dispositifs ^[65].

4.2. Détection directe

D'autres microélectrodes détectent directement le courant redox d'une molécule oxydable dans le milieu interstitiel. La majorité de ces microélectrodes sont fabriquées à partir de carbone ou de platine. Ces matériaux ont la particularité de posséder de bonnes propriétés catalytiques, de plus ils sont commercialement disponibles sous forme de fibres de petit diamètre ou de fils permettant la fabrication de microélectrodes peu invasives. En outre, les catéchols, l'acide ascorbique et l'acide urique peuvent être facilement oxydés par voltamétrie avec des électrodes en fibre de carbone ^[66-69]. De même, ces microélectrodes peuvent être utilisées afin de réaliser des électrodes de type Clark, qui sont des électrodes composées de platine polarisées négativement à -0,7 V par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl déclenchant ainsi la réduction de l'oxygène. Par conséquent, les

électrodes de type Clark font d'excellents capteurs de PO_2 [70]. Les espèces réactives d'oxygène ou d'azote telles que le monoxyde d'azote (NO) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se prêtent également à la détection électrochimique directe [71-74]. La détection voltamétrique directe a conduit à des développements remarquables dans l'étude des amines biogènes cérébrales. Un neurotransmetteur tel que la dopamine, qui est impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales telles que la mémoire, la régulation de l'humeur, et le codage des mouvements, ainsi que dans la maladie de Parkinson, peut être oxydé en dopamine-o-quinone à +0,4 V par rapport à Ag/AgCl. Cette réaction d'oxydoréduction est très rapide. De plus, la détection voltammétrique de l'oxydation de la dopamine suivie de la réduction de la dopamine-o-quinone peut atteindre une résolution temporelle élevée avec l'utilisation de la voltamétrie cyclique à balayage rapide [75]. Cette dernière est typiquement réalisée à $100 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui permet d'effectuer un balayage de tension en moins de 100 millisecondes et donc une résolution temporelle de 10 Hz. La voltamétrie à balayage rapide de la dopamine sur des microélectrodes en fibre de carbone a mené à de nombreuses découvertes importantes et a considérablement amélioré notre compréhension du rôle de la dopamine dans la dépendance et le codage de la récompense et des attentes (voir la revue de Robinson *et al.*, Chem Rev 2008 [75]). Plus récemment, des modifications de surface des microélectrodes impliquant des nanoparticules telles que des nanotubes de carbone ou des médiateurs d'électrons ont été introduites pour améliorer la performance des microélectrodes. Par exemple, Xiang *et al.* ont mis au point avec succès des microélectrodes fabriquées à partir de fibres de carbone sur lesquelles des nanotubes de carbone ont été synthétisés pour suivre de manière plus sensible et sélective l'ascorbate [69]. Il a également été démontré qu'une microélectrode en fibre de carbone dont la surface a été modifiée à l'aide de nanotubes de carbone améliore la détection de la dopamine ainsi que celle d'autres analytes [76,77]. D'un autre côté, des travaux ont montré que la détection du H_2O_2 avec des microélectrodes en fibre de carbone peut être améliorée à l'aide de polydopamine et de dépôts de Bleu de Prusse [78].

La gamme de molécules oxydables pouvant être détectées directement sur les microélectrodes en fibre de carbone a été récemment élargie à d'autres neurotransmetteurs tels que la sérotonine, l'adénosine ou encore l'octopamine. L'oxydation de la sérotonine est une réaction complexe qui se produit à +600 mV par rapport à Ag/AgCl. L'un des produits d'oxydation de la sérotonine est la tryptamine-4,5-dione, et cette réaction d'oxydation est accompagnée de plusieurs produits hydroxylés, de dimères et d'autres espèces dérivées de

radicaux libres ^[79-82]. La détection de l'adénosine par voltamétrie cyclique à balayage rapide a récemment été mise au point. Cette méthode est basée sur l'oxydation de l'adénosine en un dimère O-O ^[83,84]. Enfin, l'octopamine, un important neurotransmetteur dans le cerveau de l'insecte, peut être oxydé en un polymère électroactif sur des fibres de carbone afin de détecter la neurotransmission à un seul terminal neuronal ^[85,86].

4.3. Détection enzymatique

L'un des principaux inconvénients des méthodes de détection électrochimiques est qu'elles reposent sur l'oxydation/réduction directe et qu'elles ne peuvent donc détecter que des molécules oxydables ou réductibles dans la fenêtre électrochimique de l'eau (à pH physiologique : 1,23 V). A des potentiels plus élevés, l'électrode commencerait à oxyder l'eau. Et c'est un inconvénient car il existe de nombreux composés neurochimiques importants qui ne peuvent pas être oxydés directement. Il s'agit notamment du glucose, du lactate, du glutamate et de bien d'autres. Pour surmonter cette limitation, des technologies de biodétection ont été mises au point. Ces technologies immobilisent un élément de reconnaissance biologique de sorte qu'il puisse communiquer avec l'électrode et qui catalysera une réaction d'oxydoréduction, ou induira un changement de potentiel, ou d'impédance, afin de permettre la détection d'une molécule non oxydable. De tels biocapteurs représentent des stratégies prometteuses pour la détection de pratiquement n'importe quelle substance neurochimique dans le cerveau.

Cependant, le cerveau est un environnement chimiquement complexe et il existe plusieurs spécifications rigoureuses qu'un biocapteur doit respecter afin d'effectuer des mesures *in vivo*. Tout d'abord, un biocapteur doit être capable d'obtenir des mesures en continu. Bien que les biocapteurs à usage unique, comme les biocapteurs à affinité, qui peuvent mesurer la liaison d'une molécule à l'ADN, à l'ARN, aux aptamères, aux anticorps, à un récepteur, ou à des polymères à empreinte moléculaire ^[87], offrent de vastes possibilités de reconnaissance biologique de molécules endogènes du cerveau, une telle liaison est généralement irréversible. Ce qui implique qu'un biocapteur à usage unique nécessiterait une pénétration cérébrale pour chaque mesure que l'on souhaiterait acquérir. Par conséquent, la reconnaissance enzymatique est la seule méthode qui permet actuellement une surveillance en temps réel. Malgré cela, dans la pratique, seuls quelques neurotransmetteurs et métabolites ont été détectés avec succès par des biocapteurs *in vivo*. Il s'agit notamment du glucose, du lactate, du glutamate, de la D-sérine, de la choline et de la famille des purines

(p. ex, adénosine, adénosine triphosphate, inosine et xanthine) [19,24,88,89]. Néanmoins, les progrès des biocapteurs à microélectrodes continuent d'offrir d'énormes possibilités pour l'analyse du liquide interstitiel cérébral.

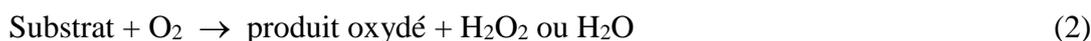
III. Biocapteurs enzymatiques

1. Principe de transduction de l'activité enzymatique en courant électrique

La classe d'enzyme la plus utilisée dans le cadre d'une détection d'un signal électrique au moment de la reconnaissance d'une molécule, est la classe EC1 (<http://www.brenda-enzymes.org>), qui comprend les enzymes appelées oxydoréductases, car catalysant des réactions d'oxydoréduction. Elles transfèrent des ions H⁺ et des électrons. Ces enzymes catalysent donc une réaction du type :

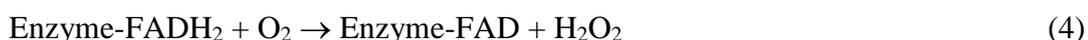


Dans cette réaction, A est le donneur d'électrons (oxydant) et B est l'accepteur d'électrons (agent réducteur). En général, l'une de ces deux molécules est incorporée à l'intérieur de la protéine enzymatique afin de servir de cofacteur, tandis que l'autre est le substrat et diffuse à l'intérieur et à l'extérieur de l'enzyme. Les flavines (dérivés de la vitamine B2) et les nicotinamides adénine dinucléotide (NAD⁺/NADH) ou nicotinamide dinucléotide phosphate (NADP⁺/NADPH)] sont les cofacteurs enzymatiques les plus fréquents. De plus, les enzymes les plus propices au monitoring *in vivo* proviennent des sous-classes d'oxydases qui comprennent 143 enzymes. Les oxydases sont des oxydoréductases qui utilisent l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons, et catalysent ce type de réaction :



La plupart des oxydases utilisées en neuroscience utilisent la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur. Par exemple, la glucose oxydase, la glutamate oxydase, la choline oxydase, et la D-aminoacide oxydase sont toutes des enzymes dépendantes de la FAD [90-93].

Une exception est la L-lactate oxydase qui utilise la flavine mononucléotide (FMN) comme cofacteur ^[94]. Par ailleurs, la xanthine oxydase contient deux molécules de FAD, deux atomes de molybdène et huit atomes de fer ^[95] et a aussi été utilisée pour concevoir des biocapteurs implantables. Dans le cas des enzymes dépendantes à la FAD, l'oxydation d'un substrat implique une réaction en deux étapes :



L'oxygène agit comme un accepteur d'électrons, transportant les électrons à la surface de l'électrode sous sa forme réduite H_2O_2 . Le principal défi est d'obtenir un transfert d'électrons efficace entre l'enzyme et la surface de l'électrode ^[96]. Comme les cofacteurs enzymatiques sont souvent séparés de la surface de l'électrode par le squelette de la protéine dans lequel est contenu l'enzyme, le transfert direct d'électrons n'est généralement pas possible. Cependant, les biocapteurs ont évolué sur trois générations distinctes pour rendre possible le transfert d'électrons.

2. Générations de biocapteurs

2.1. Première génération

Les biocapteurs de première génération ont été conçus pour mesurer la consommation d' O_2 ou la production de H_2O_2 par voie électrochimique (**Figure I-4 A.**). Le premier biocapteur a été développé par Clark et Lyons ^[97] pour détecter le glucose en suivant la consommation d' O_2 qui se produit après l'oxydation du β -D-glucose en β -D-gluconolactone, avec la réduction simultanée du FAD en FADH_2 . Par la suite, la réoxydation du FADH_2 conduit à la conversion de l' O_2 dissous en H_2O_2 . Le matériau le plus largement utilisé pour la détection du H_2O_2 lors de la conception de microélectrodes est le platine, bien que d'autres métaux nobles tels que le palladium, le ruthénium et le rhodium puissent également être utilisés ^[98]. Il faut cependant noter que le carbone et l'or ne sont pas les matériaux les plus favorables à l'oxydation directe du H_2O_2 car ils présentent de très faibles vitesses de transfert et nécessitent d'appliquer des potentiels plus élevés. Par exemple,

l'oxydation du H_2O_2 sur le carbone ou l'or commence typiquement de +750 mV jusqu'à +800 mV par rapport à Ag/AgCl, comparé à des potentiels entre +300 mV et +600 mV avec le platine ^[99].

Il y a cependant deux limites importantes associées à l'utilisation des biocapteurs de première génération *in vivo*.

La première limite est la dépendance à l' O_2 . Les oxydases ont besoin d' O_2 pour réoxyder leur cofacteur et revenir à leur état d'accepteur d'électrons (oxydé). Dans le cerveau, la pression partielle d' O_2 (PO_2) est assez faible, environ 10-40 mmHg ^[13,100]. Avec une valeur moyenne de PO_2 dans les tissus cérébraux d'environ 20 mmHg, la concentration d'oxygène dissous est donc d'environ 70 μM ^[101] et ceci peut être un facteur limitant lors du monitoring des concentrations de substances neurochimiques dans la plage 10^{-4} - 10^{-3} M, comme pour le glucose ou le lactate. Une stratégie pour éviter ce problème est d'utiliser une couche externe de polymère, comme le polyuréthane, qui peut limiter la diffusion du substrat dans la couche d'enzyme sans perturber la diffusion de l' O_2 grâce à sa forte perméabilité aux petites molécules telles que l' O_2 ou le H_2O_2 . Ainsi pour un capteur de glucose recouvert de polyuréthane, la concentration réelle de glucose qui atteint l'enzyme est diminuée et la gamme linéaire, ou dynamique, du biocapteur est ainsi augmentée jusqu'à 5 - 10 mM, malgré les faibles niveaux d' O_2 dans l'air ambiant du milieu d'étude ^[102,103]. Une autre stratégie pour pallier ce problème a été développée par Wang *et al.* en utilisant un composé fluorocarboné concentrant l'oxygène à l'intérieur de la couche enzymatique ^[104].

La deuxième limite associée aux biocapteurs de première génération est leur sélectivité. Le liquide interstitiel cérébral contient de nombreuses molécules oxydables, dont certaines sont résumées dans le **Tableau 1**. Les deux principaux antioxydants naturels sont l'acide ascorbique et l'acide urique, qui représentent des sources majeures d'interférence électrochimique. Leurs concentrations sont généralement assez élevées, avec 10 μM détectés pour l'acide urique, et des concentrations pour l'acide ascorbique allant de 200 à 400 μM ^[105-108]. De plus, l'acide ascorbique est oxydé autour de 0 mV par rapport à Ag/AgCl avec une électrode en carbone et l'acide urique autour de +300 mV. Par conséquent, les deux molécules s'oxydent au potentiel de maintien typique d'une électrode qui mesure la concentration de H_2O_2 (généralement +500 mV à +700 mV par rapport à Ag/AgCl). Les autres molécules interférentes dans le cerveau sont les métabolites, l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC), l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) et l'acide

homovanillique, ainsi que des neurotransmetteurs, tels que la dopamine, la sérotonine et la norépinéphrine.

Tableau I-1. Molécules électroactives redox et leur potentiel moyen d'oxydation respectif.

Molécule	Potentiel moyen d'oxydation*	Gamme de concentrations dans le fluide interstitiel
Adénosine	+ 1200 mV	4 – 8 nM ^[109]
Tryptophane dérivés	+ 800 mV	2 – 2,5 µM ^[110]
Tyrosine dérivés	+ 700 mV	5,7 – 14 µM ^[111]
Ocytocine	+ 700 mV	13 – 50 pM ^[112]
Vasopressine	+ 600 mV	3,1 – 3,5 pM ^[113]
3-Methoxytyramine	+ 500 mV	4,9 – 5,5 pM ^[114]
Acide homovanillique	+ 450 mV	260 – 713 nM ^[111]
L-DOPA	+ 400 mV	0,5 – 2,5 nM ^[115]
Sérotonine	+ 300–325 mV	1 – 5 nM ^[116]
Acide 5-hydroxyindolacétique	+ 300–325 mV	110 – 247 nM ^[111]
Acide urique	+ 300 mV	1–10 µM ^[106,108]
Acide ascorbique	+ 100–200 mV	200–500 µM ^[105,106]
Dopamine	+ 120–150 mV	2 – 4 nM ^[116]
Norépinéphrine	+ 120–150 mV	0,1 – 0,5 nM ^[115]
DOPAC	+ 120–150 mV	0,1 – 2,9 nM ^[115]
Epinephrine	+ 120–150 mV	0 – 0,1 nM ^[115]

*par rapport à Ag/AgCl. L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine; DOPAC: Acide Dihydroxyphénylacétique.

1.2.a Couche sélective

Une méthode afin d'atténuer l'oxydation des molécules interférentes consiste à déposer une membrane semi-perméable sur l'électrode. Les matériaux les plus largement utilisés à cette fin sont les films électropolymérisés de poly-phénylenediamine (PPD),

polypyrrole ou polypyrrole suroxydé. Ils constituent une barrière efficace pour restreindre la diffusion de molécules de poids moléculaire élevé (par exemple > 200 Da), tout en permettant la diffusion et l'oxydation de composés plus petits comme le H_2O_2 [117–120]. Une autre barrière fréquemment utilisée est le polymère perfluoro-sulfoné, ou de son nom commercial Nafion®. Ce polymère est un dérivé du Téflon, il agit comme un polymère échangeur d'ions, et il présente des propriétés intéressantes quant à la perméabilité aux cations tout en étant imperméable aux anions [121]. Par conséquent, son efficacité est maximale en ce qui concerne les molécules interférentes qui sont chargées négativement au pH physiologique (pH 7,4), comme l'acide ascorbique, l'acide urique, la DOPAC et la 5-HIAA. A l'inverse, son efficacité est faible vis-à-vis des molécules cationiques telles que la dopamine et la sérotonine.

1.2.b Médiateurs électrochimiques

Une autre façon de diminuer l'oxydation non spécifique des molécules interférentes est d'ajouter un médiateur électrochimique à la couche d'enzyme afin de catalyser l'oxydation du H_2O_2 , et ainsi réduire le potentiel appliqué à l'électrode pour détecter la biomolécule d'intérêt (**Figure I-4 B.**). Deux médiateurs électroniques possibles sont la peroxydase du raifort, qui s'oxyde à $-100 - 0$ mV par rapport à Ag/AgCl [122–124], et les hexaferrocyanates (par exemple, Bleu de prusse ou violet de ruthénium) [125–127]. Récemment, un biocapteur pour la détection de l'adénosine-triphosphate (ATP) basé sur le ruthénium violet a été proposé sur ce principe avec un potentiel de maintien à -50 mV par rapport à Ag/AgCl [128].

2.2. Seconde génération

Pour obtenir des biocapteurs totalement indépendants de l' O_2 ambiant, il est nécessaire d'inclure des médiateurs d'électrons qui atteignent des vitesses de transfert d'électrons plus élevées avec le cofacteur enzymatique qu'avec l' O_2 . Ainsi, ces médiateurs élimineraient le besoin d' O_2 ambiant lors de la mesure de H_2O_2 , ce qui est particulièrement utile lors des expérimentations *in vivo* impliquant une faible PO_2 tissulaire, comme l'ischémie cérébrale ou l'hypoxie. Des médiateurs tels que les dérivés du ferrocène [129], le poly(vinylimidazole), ou encore la poly(vinylpyridine) remplissent ce rôle. Cependant, lors d'expérimentations *in vivo* de longue durée, le risque qu'un médiateur s'échappe de la couche

d'enzymes ne peut être exclu dû à la faible stabilité structurelle de ces compositions biochimiques. Une amélioration de cette conception de deuxième génération est appelée "câblage enzymatique" (ou *enzyme wiring* en anglais), où l'enzyme impliquée est liée par une liaison covalente au médiateur par un maillage de polymère immobilisé sur la surface de l'électrode (**Figure I-4 C.**). L'un des premiers exemples d'un tel modèle utilisa des ions poly(1-vinylimidazole), $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$, et des ions de glucose oxydase réticulés avec de l'éther poly(éthylène glycol) diglycidyl (PEGDE) ^[130,131]. Ce modèle a également été utilisé pour monitorer le glutamate dans le cerveau ^[132-134].

2.3. Troisième génération

Une évolution plus récente des biocapteurs enzymatiques a consisté à réaliser un transfert direct d'électrons entre un cofacteur enzymatique et une électrode (**Figure I-4 D.**). Le principe de ces biocapteurs de troisième génération implique l'incorporation de nanoparticules d'or (GNP), de nanotubes de carbone (NTC) ou de graphène dans la couche d'enzyme pour faciliter le transfert direct d'électrons (revue dans ^[135], et Zhu *et al.* ^[136]). Ces dispositifs sont encore en cours de développement et, à notre connaissance, ils ne sont pas encore prêts pour des enregistrements *in vivo*. De plus, la nature exacte du processus de transfert direct d'électrons pour ces biocapteurs fait l'objet d'un intense débat au sein de la communauté des chimistes.

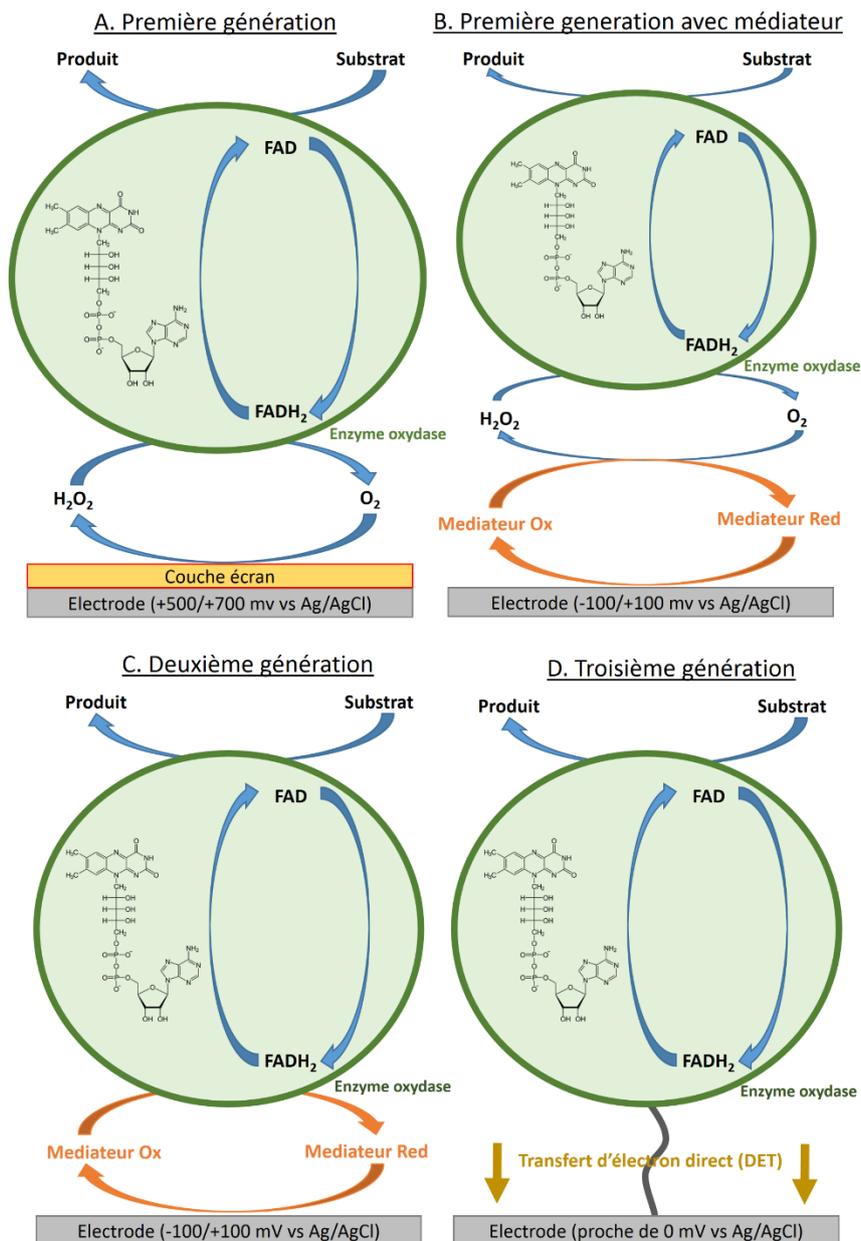


Figure I-4. Représentations schématiques de l'évolution des biocapteurs.

A. Les biocapteurs de première génération sont basés sur l'oxydation d'une molécule d'intérêt (substrat) par une enzyme oxydase qui produit de l'H₂O₂. L'oxydation du H₂O₂ se produit alors à la surface de l'électrode en appliquant un potentiel compris entre +500 mV et +700 mV par rapport à Ag/AgCl. Une couche sélective déposée à la surface de l'électrode bloque les molécules interférentes qui peuvent être oxydées dans cette plage de potentiel, y compris l'acide ascorbique, l'acide urique, la dopamine, la sérotonine, etc. **B.** Certains biocapteurs de première génération incorporent également un médiateur électronique qui permet d'abaisser le potentiel appliqué entre -100 mV et +100 mV par rapport à Ag/AgCl afin de pallier l'oxydation des molécules interférentes endogènes. **C.** Les biocapteurs de deuxième génération intègrent un médiateur électronique qui présente une affinité plus élevée pour la réoxydation d'un cofacteur enzymatique par rapport à l'oxygène. Cette conception est indépendante de l'O₂. **D.** Les biocapteurs de troisième génération facilitent le transfert direct d'électrons (DET) d'un cofacteur enzymatique à la surface de l'électrode.

3. Cinétique enzymatique

On exprime l'activité d'une enzyme comme le nombre de molécules de substrat dégradé par unité de temps (typiquement une unité équivaut à 1 μmol de substrat par minute) dans des conditions de température et de pH spécifiées. Le modèle le plus simple et le plus connu pour modéliser la vitesse d'une réaction enzymatique est l'équation de Michaelis-Menten caractérisée par la constante de Michaelis K_m et de la vitesse maximale de réaction V_m (**Figure I-5**). K_m est une constante cinétique qui indique la concentration du substrat pour laquelle la vitesse de réaction est équivalente à la moitié de sa valeur maximale. Elle renseigne aussi sur la gamme linéaire de concentrations du substrat pour laquelle se produit une catalyse performante. Ce modèle représente la réaction enzymatique sous la forme simplifiée suivante :



Avec **E** étant l'enzyme et **S** le substrat, ils forment ainsi **ES**, un complexe intermédiaire enzyme-substrat. Cette étape est réversible et est caractérisée par la constante de formation du complexe intermédiaire k_1 et la constante de dissociation k_{-1} . Si la conversion enzymatique se produit, alors le complexe intermédiaire évolue irréversiblement vers un produit **P** et l'enzyme **E** est libérée. La vitesse de formation du produit est :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] \quad (6)$$

Si $[E]_0$ représente la concentration initiale en enzyme, on a :

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (7)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E]_0 - [ES]) \cdot [S] - (k_{-1} \cdot k_2) \cdot [ES] \quad (8)$$

D'autre part,

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] \quad (9)$$

$[S]_{t=0} = S_0$ et $[ES]_{t=0} = 0$ étant les conditions initiales, l'évolution de la concentration des différentes espèces peut être connue en résolvant ces équations. En supposant, que nous soyons dans un état quasi-stationnaire (*id est* en supposant que la concentration du complexe enzyme-substrat soit constante), on a :

$$[ES] = \text{constante, et donc } \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

De plus, si on suppose que la vitesse de réaction du produit est :

$$V_m = k_2 \cdot [E]_0 \quad (10)$$

Et que l'on suppose la constante de Michaelis comme étant égale à :

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (11)$$

L'équation de Michaelis-Menten donne alors la vitesse de réaction sous la forme :

$$V = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (12)$$

Deux cas limites peuvent être envisagés :

Si $[S] \ll K_m$, l'équation (12) devient :

$$V = \frac{k_2 \cdot [E]_0}{K_m} \cdot [S] \quad (13)$$

La vitesse de réaction est dans ce cas d'ordre 1 par rapport à $[S]$. Par conséquent, le rapport k_2/K_m n'est plus que fonction des autres constantes de vitesse.

Si $[S] \gg K_m$, l'équation (12) devient :

$$V = k_2 \cdot [E]_0 \quad (14)$$

Cette fois-ci la vitesse de réaction est d'ordre 0 par rapport à [S]. C'est-à-dire qu'elle est indépendante du substrat et qu'elle a atteint sa valeur maximale. Le modèle de Michaelis-Menten peut donc être représenté par l'équation suivante :

$$V = \frac{v_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (15)$$

Si l'on translate cette équation à une relation courant-concentration qui caractérise un biocapteur, on peut, par approximation, obtenir une équation modifiée de (15) :

$$I(S) = \frac{I_m \cdot [S]}{K_{mapp} + [S]} \quad (16)$$

I_m représente le courant maximum mesuré par un biocapteur et K_m^{app} est la constante de Michaelis-Menten apparente du dispositif. Il correspond au K_m de l'enzyme immobilisée, mais aussi d'autres paramètres tels que le taux de diffusion du substrat, la concentration d' O_2 autour de l'enzyme, et du H_2O_2 présent dans la couche d'enzyme.

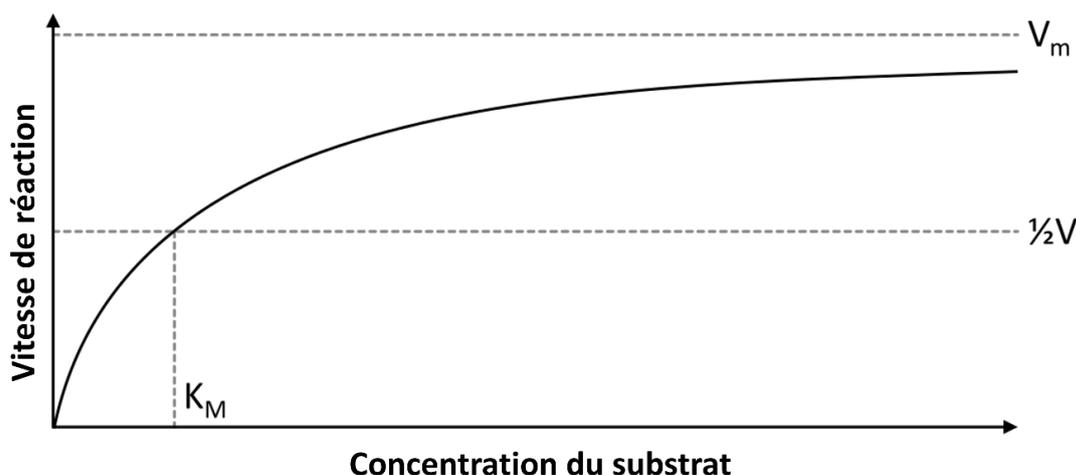


Figure I-5. Représentation graphique de la cinétique de Michaelis-Menten.

Évolution de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat.

4. Immobilisation de l'enzyme

Un élément clé lors de la conception de biocapteurs est l'immobilisation d'une enzyme sur l'électrode. L'enzyme immobilisée doit conserver son activité biologique, fournir des temps de réponse rapides sur une large gamme linéaire, présenter une sélectivité

et une sensibilité élevées du substrat, et être stable dans le temps, en particulier *in vivo* à 37°C. De plus, les produits chimiques utilisés pour l'immobilisation doivent être biocompatibles et non toxiques. Il existe actuellement une grande variété de techniques d'immobilisation qui peuvent être divisées en deux grandes catégories: la réticulation (ou *cross-linking*) [137–140] et le piégeage de l'enzyme dans des matrices de polymères (*enzyme entrapment*) [88,141,142]. Les principaux avantages et inconvénients de chaque technique sont résumés dans le **Tableau 2**.

Tableau I-2. Techniques d'immobilisation d'enzyme.

		Avantages	Désavantages
Réticulation	Glutaraldehyde	<ul style="list-style-type: none"> • Procédure en une étape • Forte concentration enzymatique (bonne sensibilité) • Court temps d'immobilisation (qq. minutes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxique
	PEGDE	<ul style="list-style-type: none"> • Non-toxique • Biocompatible • Préserve la spécificité de l'enzyme 	<ul style="list-style-type: none"> • Long temps d'immobilisation (heures) • Requier un recuit
	Hydrogel Redox	<ul style="list-style-type: none"> • Bonne sensibilité • Incorpore un médiateur électronique (faible potentiel de travail) • Peu d'interférence provenant des molécules oxydables endogènes • Non-toxique 	<ul style="list-style-type: none"> • Composants coûteux • Procédure à plusieurs étapes • Requier une synthèse sur mesure des composants (pas disponible commercialement)
Piégeage	Matrice sol-gel	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle spatial par application du potentiel (bien adapté pour les multi électrodes) • Contrôle de l'épaisseur • Pas de liaisons covalentes (préserve la spécificité) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxique • Faible stabilité (perte du matériel biologique dans le temps) • Procédure à plusieurs étapes • Diffusion
	Polypyrole	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle spatial par application du potentiel (bien adapté pour les multi électrodes) • Contrôle de l'épaisseur • Utilisable comme couche écran • Pas de liaisons covalentes (préserve la spécificité) 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible stabilité (perte du matériel biologique dans le temps) • Requier une synthèse sur mesure des composants (pas disponible commercialement)
	Poly-phenylenediamine	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle spatial par application du potentiel (bien adapté pour les multi électrodes) • Epaisseur très fine (de l'ordre de 10 nm) • Utilisable comme couche écran • Pas de liaisons covalentes (préserve la spécificité) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxique (cancérogène)

4.1. La réticulation

Afin de fabriquer des biocapteurs, une liaison stable et durable dans le temps des protéines à la surface de l'électrode est nécessaire. La réticulation, ou *cross-linking*, est un processus par lequel les macromolécules sont liées par covalence, et cette méthode peut être utilisée pour immobiliser les enzymes.

Le glutaraldéhyde (pentane-1,5-dial) est probablement l'agent de réticulation le plus largement utilisé. C'est une petite molécule (MW 100 Da) composée de deux groupes aldéhydes qui peuvent réagir avec des groupes amines et des groupes carboxyliques exposés à la surface des protéines. Chaque groupe aldéhyde libre réagit avec une protéine différente, créant ainsi un réseau ramifié. Cette technique d'immobilisation est relativement facile à réaliser puisqu'elle nécessite un équipement minimal et se réalise en seulement quelques minutes. Cependant, il faut noter que le glutaraldéhyde est un produit chimique toxique et qu'il doit être manipulé avec beaucoup de précaution. Par conséquent, bien que le glutaraldéhyde soit largement utilisé dans la recherche animale, les applications cliniques possibles de cet agent sont limitées ^[143].

Une autre molécule bi-fonctionnelle utilisée pour la réticulation enzymatique est le PEGDE. Il s'agit d'un réactif chimique non toxique qui contient deux groupes époxy capables de réagir avec les groupes amines, hydroxyles et carboxyles des protéines. A des températures modérées (entre 20 et 70 °C), le PEGDE réagit préférentiellement avec les fonctions amines présentes dans les protéines et crée une matrice de molécules d'enzymes réticulées sur une surface d'électrode très similaire à celle obtenue avec le glutaraldéhyde. Cependant, contrairement au glutaraldéhyde, le temps de réaction du PEGDE est plutôt lent, environ 48 heures à température ambiante. Le temps de réaction peut être considérablement accéléré par exposition à des températures plus élevées ^[89,144] ; cependant les conditions de température et de concentration doivent être soigneusement optimisées et contrôlées afin de préserver l'activité enzymatique et d'obtenir une immobilisation stable de l'enzyme ^[89].

Enfin, les hydrogels redox sont des matrices conductrices d'électrons qui sont créées par la réticulation de polymères redox solubles dans l'eau. Il en résulte une connexion électrique entre les centres redox des molécules d'enzymes et de l'électrode. Un hydrogel de ce type a été conçu par Heller *et al.*, et a ensuite été appliqué aux biocapteurs de glucose pour les patients diabétiques. Ce dernier a utilisé un squelette de polymère de polyvinylpyrène et de complexes métal-organique d'osmium ($\text{Os}^{2+/3+}$) avec des pyridines substituées et non substituées pour réaliser le transfert d'électrons entre l'électrode et l'enzyme ^[145], le PEGDE

étant utilisé comme agent de réticulation pour lier les enzymes au complexe polymère redox [130,144]. Jusqu'à présent, plusieurs enzymes ont été immobilisées avec succès sur des biocapteurs en utilisant cette technique [132,144,146]. Cependant, les composants chimiques de ces hydrogels redox nécessitent plusieurs étapes pour leur synthèse organique, et sont, par conséquent, plus difficiles à utiliser que le glutaraldéhyde ou le PEGDE [133,143,144,146,147].

L'immobilisation de l'enzyme peut avoir des effets conséquents sur la sélectivité du substrat. Par exemple, dans une étude récente de Vasylieva et al, lorsque le glucose oxydase était immobilisé avec le glutaraldéhyde, le xylose, le galactose et le mannose pouvaient être détectés, alors que si l'enzyme était sous sa forme libre ou immobilisée avec le PEGDE, elle était spécifique du glucose [24]. De même, la glutamate oxydase pourrait détecter l'asparagine, l'aspartate, la glutamine et l'histidine après avoir été immobilisée avec le glutaraldéhyde, alors qu'elle ne détectait pas ces molécules sous sa forme libre ou après immobilisation au PEGDE [24]. Ces changements observés dans la spécificité du substrat peuvent être liés à la longueur du bras d'espacement qui représente la distance entre les groupes réactifs. Cette longueur peut déterminer la flexibilité de la matrice protéique et les degrés de liberté que les protéines conservent une fois immobilisées, ce qui affecte la spécificité du substrat. Il est intéressant de noter que lorsque le glutaraldéhyde est préincubé dans un sérum d'albumine bovine (BSA), avant l'immobilisation enzymatique, ces effets sur la spécificité du substrat sont atténués [148]. Il est possible que dans ces conditions, l'immobilisation de l'enzyme soit réalisée avec des molécules de glutaraldéhyde qui sont déjà liées à la BSA, ce qui fournirait une chaîne plus longue de molécules réticulées pour l'immobilisation. De plus, ces effets sur la spécificité des substrats enzymatiques pourraient avoir des conséquences importantes concernant l'estimation des concentrations de neurotransmetteurs, ainsi que lors de changements dynamiques de leur concentration [24].

4.2. Piégeage enzymatique

Le principe de base du piégeage enzymatique consiste à créer une couche de polymère sur la surface d'une électrode. En quelques mots, l'enzyme est ajoutée à une solution de monomère, puis pendant la polymérisation, les molécules d'enzyme sont piégées mécaniquement ou électrostatiquement dans une matrice créée par le polymère en question, ou sont absorbées dans la couche. Dans ce type d'immobilisation, il n'y a pas de liens chimiques forts entre l'enzyme et le polymère, bien que des contraintes physiques puissent

retenir l'enzyme dans la structure du polymère, dont l'activité enzymatique est bien conservée. À ce jour, les deux principales méthodes de piégeage des enzymes sont les matrices sol-gel et l'électropolymérisation du polypyrrole (et de la polyphénylènediamine). La méthode sol-gel est couramment utilisée en science des matériaux pour créer une matrice poreuse capable d'emprisonner des macromolécules sur la surface d'une électrode. Cette méthode implique l'hydrolyse de précurseurs, généralement des alcoxysilanes, suivie de la polymérisation des produits de la réaction. Souvent, la réaction pour générer le gel dépend du pH et sa cinétique augmente à un pH alcalin. Cette propriété est particulièrement utile pour l'immobilisation d'enzymes à un endroit spécifique et pour une électrode en particulier. Une électrode chargée négativement peut déclencher la réduction de H^+ en H_2 ou la réduction des ions nitrate en nitrite, créant une augmentation locale du pH et déclenchant ainsi la polymérisation sol-gel [142,149]. Cette technique a donc un fort potentiel pour les biocapteurs fabriqués en salle blanche avec plusieurs microélectrodes sur la même aiguille qui nécessitent l'immobilisation de différentes enzymes sur des microélectrodes distinctes. L'épaisseur d'une matrice peut également être contrôlée en ajustant le temps pendant lequel le potentiel est appliqué à une électrode. Les matériaux à base de silice dérivés de sol-gel sont bien adaptés au piégeage des enzymes parce qu'ils sont chimiquement inertes et ont une structure tridimensionnelle qui permet une certaine mobilité des biomolécules encapsulées, préservant ainsi une activité catalytique optimale [150]. Cependant, certains précurseurs de la polymérisation sol-gel sont toxiques, en particulier le tétraméthoxysilane (TMOS), ce qui limite leurs potentielles applications cliniques. De plus, les biocapteurs basés sur des procédures sol-gel ont tendance à présenter une diminution initiale significative de la sensibilité du biocapteur, probablement due à la perte de matériel biologique [143,150].

Une autre technique pour réaliser l'immobilisation enzymatique est la polymérisation électrochimique. Cette technique permet de piéger les enzymes soit pendant la croissance d'un polymère qui est généré par l'oxydation électrique d'un monomère contenu dans une solution enzymatique [151], soit en les absorbant dans une couche d'enzyme/monomère [152]. Le pyrrole et les monomères dérivés du pyrrole sont largement utilisés afin de réaliser cette technique en raison de leur stabilité à température ambiante et de leur compatibilité avec différents électrolytes, y compris les solutions aqueuses. Au cours de la polymérisation, un potentiel appliqué génère des radicaux pyrrole-cation réactifs qui réagissent avec les molécules monomères voisines, produisant ainsi une couche de polymère sur la surface de l'électrode [151]. Comme pour les procédures d'immobilisation sol-gel, l'épaisseur de la

couche d'enzyme peut être affectée spatialement en contrôlant la polarisation de chaque microélectrode. De plus, le potentiel requis pour l'électropolymérisation (+700 mV entre l'électrode et la référence) fournit des conditions suffisamment douces pour éviter la dénaturation enzymatique. Cependant, la plupart des monomères utilisés pour l'électropolymérisation du pyrrole ne sont pas disponibles sur le marché ^[88]. Une solution de rechange est la phénylènediamine, qui peut être facilement polymérisée en polyphénylènediamine, ce qui facilite le piégeage de la glucose oxydase, de la glutamate oxydase, ou de la D-aminoacide oxydase ^[153–155], bien qu'elle soit cancérigène et doive être manipulée avec précaution.

IV. Les différents types de microélectrodes, et leur conception

Dans le domaine des biocapteurs à microélectrodes, l'enzyme est l'élément de reconnaissance biologique et la microélectrode est le transducteur physique. En neurosciences, de nombreuses conceptions différentes ont été proposées pour l'implantation *in vivo* de microélectrodes, et celles-ci peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les biocapteurs fabriqués à partir de fils, permettant la détecter d'une molécule unique, et les sondes fabriquées à l'aide des technologies MEMS à détection multiple.

1. Dispositif à détection unique

C'est au début des années 1950 que les premières microélectrodes implantables ont été conçues. Ces biocapteurs avaient comme base des microélectrodes, des fils métalliques, encapsulées dans un capillaire en verre, et ils ont été exclusivement utilisés jusqu'à l'avènement des techniques de photolithographie et le développement des procédés de microfabrication. A ce jour, ce sont toujours ces biocapteurs qui sont les plus largement développés et utilisés particulièrement grâce à leur très faible diamètre, de l'ordre de quelques micromètres. Une prouesse qui ne peut pas encore être atteinte avec les sondes fabriquées en salle blanche à l'aide des technologies MEMS. Cette conception de biocapteurs aux très faibles dimensions permet également à un biocapteur d'accéder à des structures profondes dans le cerveau, tout en introduisant un minimum de dommages

tissulaires. Un tel biocapteur ne peut détecter qu'un analyte à la fois, et il est fabriqué typiquement à partir d'un micro fil en platine/iridium, ou tout autre matériau conducteur (par exemple, une fibre de carbone) qui est inséré dans un capillaire en verre étiré. La micropipette est coupée à l'extrémité pour permettre au fil de dépasser du capillaire de 100 - 500 μm . La jonction entre le micro fil et la pointe de la micropipette est ensuite scellée en faisant fondre localement le verre ou bien en y insérant de la colle ^[66,138,156] (**Figure I-6**). En 1997, Hu *et al.* ont utilisé un fil de platine/iridium d'un diamètre extérieur de 178 μm pour mesurer le lactate et le glucose dans le cerveau du rat, et, aujourd'hui, ce biocapteur est toujours utilisé ^[157,158]. De leur côté, O'Neil *et al.* ont recouru à un fil de platine de 60 - 250 μm isolé avec du téflon afin de concevoir un biocapteur pour la détection du glucose ^[159] et du glutamate ^[153,160]. D'autres équipes ont choisi d'utiliser des fibres avec des diamètres externes encore plus petits, de l'ordre de 7 μm , et qui peuvent être amincies encore davantage en étant gravées. Ces diamètres peuvent être obtenus avec des fibres de carbone qui sont disponibles dans le commerce ^[161]. Les fils de platine/iridium disponibles dans le commerce ont des diamètres qui peuvent atteindre les 15 - 25 μm et peuvent être insérés dans des capillaires en verre étiré ^[156,162]. Cet alliage de platine et d'iridium permet d'obtenir des fils de très faibles dimensions tout en conservant de bonnes propriétés mécaniques. Tous ces matériaux d'électrodes permettent la fabrication de biocapteurs à microélectrodes d'un diamètre extérieur de l'ordre de 40 - 50 μm une fois l'enzyme immobilisée sur sa surface active. La facilité de fabrication et de manipulation des fils de platine/iridium justifie leur utilisation généralisée en neurosciences ; bien que leur utilisation nécessite une fabrication à la main, ce qui prend du temps, coûte cher, et conduit souvent à une mauvaise reproductibilité. De plus, ces biocapteurs ne peuvent détecter qu'une seule molécule à la fois, alors que de nombreuses applications en neurosciences nécessitent une mesure simultanée de deux ou plusieurs analytes, notamment pour des couples de molécules comme le glucose et le lactate ^[103,163], la choline et le glutamate ^[140,164], et la choline et l'acétylcholine ^[165]. Ce dernier point représente donc une limitation importante concernant cette catégorie de biocapteurs à microélectrodes.

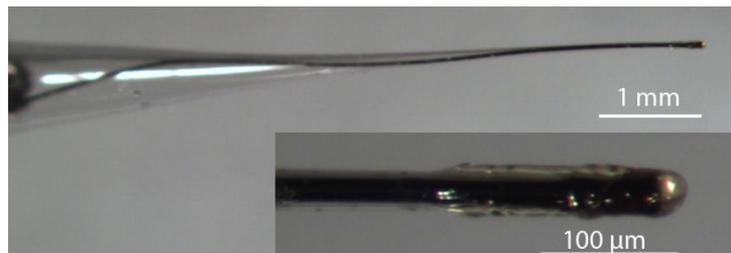


Figure I-6. Exemple d'un biocapteur à détection unique.

Microphotographie d'un biocapteur de première génération fabriqué à partir d'un fil de platine/iridium de 25 µm de diamètre isolé dans un capillaire de verre étiré. La bio-fonctionnalisation du biocapteur (comme l'application de couches d'enzymes et de polyphénylènediamine) est effectuée sur une portion cylindrique du fil exposé d'une longueur de 100 µm (encart). Barres d'échelle : 1 mm et 100 µm, respectivement.

2. Dispositif à détection multiple

La détection simultanée de plusieurs analytes a été permise grâce aux microélectrodes fabriquées en salle blanche. Ces microélectrodes peuvent être fabriquées en utilisant des substrats en céramique, en silicium ou à base de polymères qui sont par la suite microstructurées à l'aide de techniques de microfabrication. Ces techniques ont vu le jour au cours des années 1970 sous le terme de microsystème électromécanique (MEMS). Issus des techniques de fabrication de la micro-électronique, les MEMS comprennent un ou plusieurs éléments mécaniques (dans le domaine des capteurs implantables, l'aiguille) et l'électricité comme moyen de transmission de l'information. Bien que les MEMS soient utilisés dans divers domaines, leur application aux neurosciences est apparu dès leur commencement par la fabrication des premiers biocapteurs multicanaux avec plusieurs électrodes sur une seule micro-aiguille ^[166-168]. Grâce aux récents progrès des technologies de microfabrication, il est maintenant possible de fabriquer des microaiguilles à électrodes multiples avec des faibles dimensions et des matériaux biocompatibles qui permettent une implantation *in vivo* engendrant un minimum de dommages tissulaires ^[169].

3. Les technologies MEMS

La fabrication d'un dispositif MEMS requiert trois familles de techniques de fabrication, la structuration, les procédés de dépôt de matériaux, et la gravure. *La structuration* (ou « patterning », en anglais) est la première phase de toute étape de fabrication, elle permet de réaliser la mise en forme de chaque structure que l'on souhaite

que ce soit pour déterminer où se situeront les pistes électriques ou pour la forme physique des structures du dispositif. Ces phases de mise en forme sont ensuite généralement suivies d'étapes successives de *dépôts de matériaux* comme des matériaux conducteurs, isolants, ou encore afin de réaliser des couches sacrificielles. Enfin, entremêlée entre ces étapes de fabrications, *la gravure* intervient afin d'enlever une ou plusieurs parties d'une couche mince déposée ou du substrat.

3.1. La structuration

Cette étape de fabrication consiste à réaliser la mise en forme, le « dessin » des motifs souhaités sur une surface. La structuration est réalisée principalement par des techniques dites de photolithographie, mais d'autres techniques existent comme l'impression qui consiste à exercer une pression mécanique d'un moule sur une résine afin de lui donner la forme souhaitée. Dans notre cas, nous nous intéresserons qu'à la photolithographie qui reste la technique la plus employée. Cette technique consiste à utiliser des matériaux polymères photosensibles pouvant se polymériser sous l'exposition de photons permettant ainsi de définir des motifs en exposant, ou non, des zones spécifiques. Un procédé de photolithographie s'effectue en plusieurs étapes distinctes. Tout d'abord, une phase de nettoyage approprié est effectuée sur le substrat afin de supprimer toutes contaminations qui pourraient avoir une influence sur les étapes suivantes. Ce nettoyage est suivi d'un recuit à une température suffisamment élevée pour éliminer l'humidité présente à la surface du substrat. Ensuite, le substrat est recouvert de manière uniforme de résine photosensible par *spin-coating*, c'est-à-dire que la résine est étalée par effet de centrifuge à l'aide d'une tournette. Une fois recouvert de résine, le substrat est recuit à une température spécifique en fonction de la résine utilisée afin d'évaporer l'excès de solvant contenu dans cette dernière. C'est à la suite de cette étape que la photolithographie va être effectuée. La résine est exposée sous un masque à une lumière intense, généralement dans des longueurs d'ondes ultraviolettes (UV). C'est sur ce masque que le motif souhaité sera représenté, et qui définira donc les parties de la résine qui seront exposées ou non. Deux types de résines photosensibles existent, la résine positive dont la partie exposée aux photons et recuite à une température spécifique devient soluble lorsqu'immergée dans la solution de révélation; et inversement pour la résine négative, la partie exposée se polymérise et devient insoluble à la solution de révélation.

Les procédés de lithographie offrent deux possibilités de fabrication différentes :

(1) la possibilité de déposer un métal à des endroits spécifiques et avec des motifs prédéfinis lorsque la photolithographie est suivie d'un procédé de *lift-off*, permettant de structurer des couches minces de matériaux déposés. Cette technique est principalement utilisée lorsque la gravure directe du matériau en question est impossible, difficile, ou bien entraîne des effets secondaires indésirables. En quelques mots, un procédé de lithographie, comme présenté plus haut, dont les zones solubles de la résine exposée correspondront aux zones où l'on souhaite déposer le matériau est réalisé. Par la suite, le dépôt du matériau est effectué sur l'ensemble du substrat. Enfin, lorsque l'échantillon est nettoyé avec un solvant adapté pour enlever toute la résine, le matériau déposé situé au-dessus de celle-ci s'enlèvera par la même occasion.

(2) La possibilité de graver un substrat en suivant des motifs prédéfinis par photolithographie en utilisant la résine restante après révélation comme protection du substrat lors de la phase de gravure.

3.2. Le dépôt de matériaux

La possibilité de déposer des couches minces de matériaux est un processus important en microfabrication. Diverses techniques existent que ce soit par dépôt physique (évaporation ou pulvérisation cathodique), par dépôt chimique, par croissance du matériau souhaité, ou encore par impression. Dans notre cas, nous nous intéresserons uniquement aux dépôts physiques et à une technique de dépôt par phase vapeur, l'ALD.

L'évaporation (Figure I-7 A.). Ce procédé de dépôt s'effectue en deux phases successives, l'évaporation du matériau que l'on souhaite déposer et sa condensation sur l'échantillon. Le matériau est contenu dans un creuset qui est chauffé à l'aide d'un filament électrique. Ce procédé se déroulant dans une enceinte sous vide, le matériau évaporé va pouvoir se condenser directement sur l'échantillon situé en face de la source. La pureté de la couche mince déposée va donc principalement dépendre de la qualité du vide, moins de particules dans l'enceinte impliqueront moins de collisions avec le matériau évaporé. Lors d'un dépôt par évaporation, le matériau est déposé de manière uniforme, mais non-conforme, sur toute la surface directement exposée (Figure I-7 B.).

La pulvérisation cathodique (Figure I-7 C.). Ce procédé se déroule dans une enceinte sous vide au sein d'un plasma froid, généralement un plasma d'argon. Par application d'un

potentiel entre les parois de la chambre de dépôt et la source du matériau, les ions du plasma chargés positivement, sous l'effet du champ électrique, sont attirés par la cathode, la source. Cette dernière va se retrouver bombardée par les ions provoquant ainsi la pulvérisation des atomes sous forme de particules neutres. Enfin, ces particules pulvérisées vont se déplacer de manière chaotique jusqu'à ce qu'elles entrent en contact avec l'échantillon. Le dépôt effectué par pulvérisation est un dépôt conforme (**Figure I-7 D.**). Contrairement à l'évaporation, de nombreux paramètres entrent en jeu lors de la pulvérisation d'un matériau :

- La pression du gaz injecté dans le plasma ;
- La composition du plasma ;
- La puissance appliquée sur la cible ;
- La tension de polarisation du porte-substrat ;
- La densité de courant ;
- L'incidence des particules pulvérisées ;
- La présence ou non de champs magnétiques

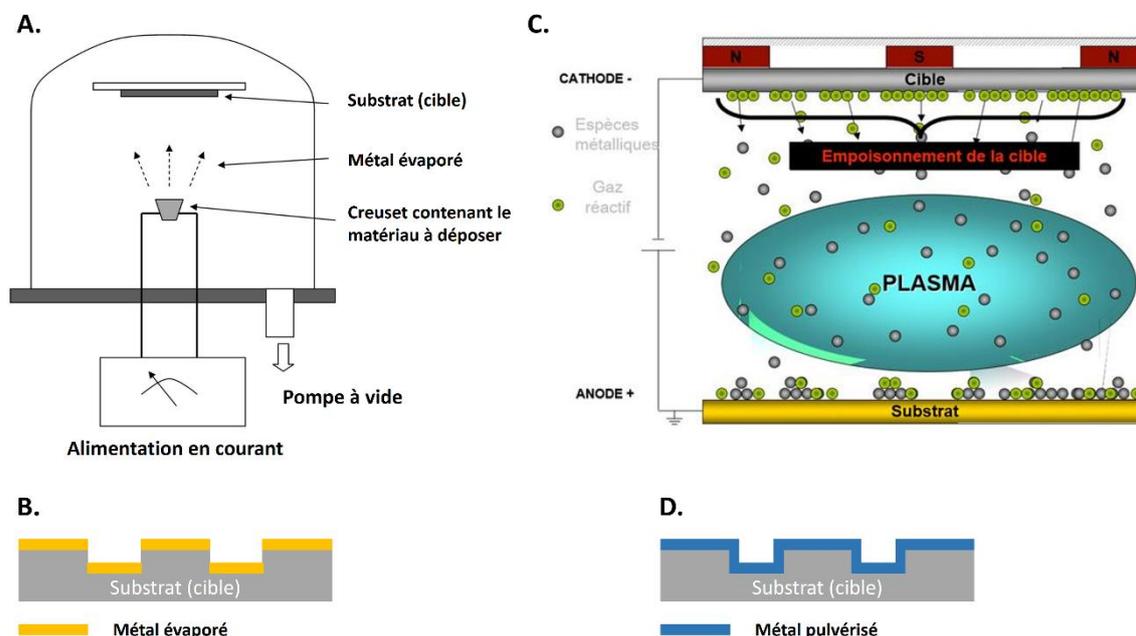


Figure I-7. Représentation schématique des dépôts physiques

A. Représentation schématique d'un bâti d'évaporation sous vide. **B.** Allure non-conforme d'un dépôt par évaporation. **C.** Représentation schématique d'un bâti de pulvérisation cathodique. **D.** Allure conforme d'un dépôt par pulvérisation

Le dépôt par couches atomiques (ALD). L'ALD est une technique de dépôt de couches minces basée sur l'utilisation séquentielle d'un procédé chimique en phase gazeuse. L'ALD est considéré comme une sous-classe de dépôt chimique en phase vapeur. La majorité des réactions se produisant lors d'un dépôt par ALD utilisent deux produits chimiques, généralement appelés précurseurs. Ces précurseurs réagissent avec la surface d'un matériau à la fois, de manière séquentielle et autolimitative. Grâce à l'exposition successive à des précurseurs, un film mince se dépose lentement. Le principal avantage de l'ALD est donc sa capacité à déposer une monocouche sur des surfaces à très fort rapport d'aspect (comme des creux ou des bosses).

3.3. La gravure

Les techniques de gravures peuvent être regroupées en deux catégories, la gravure sèche par plasma (*dry plasma etching*) et la gravure humide/chimique (*wet etching*). Que ce soit pour graver des matériaux métalliques ou isolants par l'une ou l'autre de ces deux techniques, il y a trois conditions *sine qua non* à remplir :

- Le transport de l'agent de gravure à la surface ;
- La réaction de la surface ;
- L'élimination des espèces produites par la gravure.

Deux profils de gravures peuvent être réalisés, les gravures isotropes et anisotropes.

Isotrope. On a souvent recours à la gravure humide lorsque l'on souhaite obtenir un profil isotrope en forme sphérique, bien que cela soit aussi possible dans certains cas en gravure sèche. Le substrat est gravé de manière isotrope lorsque la vitesse de réaction est égale dans toutes les directions. Si un masque est utilisé pour la gravure isotrope cela conduit à un décollage de celui-ci. Au cours d'une gravure humide la résine, le masque, n'est habituellement pas consommé par le réactif de gravure, mais peut perdre en adhérence due à l'agent de gravure qui a réagi avec le substrat sous la résine. Cela dépend de la nature de l'accroche entre la résine et le substrat, de sa nature, ou de l'épaisseur et des propriétés chimiques de la résine. La photorésine est donc un moyen efficace afin de réaliser un masque pour les gravures à température ambiante ou à basse température, mais elle ne tolère pas les

gravures avec des solutions corrosives à haute température. Dans ce dernier cas, des masques de protections plus résistants sont utilisés.

Anisotrope. Une gravure anisotrope signifie qu'elle est spatialement directionnelle. Elles peuvent être obtenus à la fois par gravure humide ou par plasma. L'hydroxyde de potassium et l'hydroxyde de tétraméthyl ammonium sont des agents de gravure humide anisotrope pour le silicium. Avec ces composés, l'anisotropie est associée au fait que les taux de gravure dans les différents plans cristallins diffèrent significativement (gravure dépendant de l'orientation). Contrairement à la gravure anisotrope humide, la gravure sèche anisotrope est généralement associée à des parois latérales verticales. L'anisotropie résulte d'un bombardement ionique directionnel dans le plasma.

La gravure sèche se réalise dans une chambre à vide au sein de gaz réactifs excités par un champ radiofréquence (RF), plasma froid. Deux types d'agents actifs importants pour la gravure se forment dans ce plasma, des molécules neutres excitées et des espèces ionisées. Accélérées par le champ RF, les espèces ioniques bombardent directement la surface du substrat permettant ainsi la gravure directionnelle anisotrope. La gravure sèche est principalement conditionnée par la volatilité des produits de réaction, ce qui nécessite souvent une optimisation très précise des conditions chimiques et des paramètres de bombardement. Le bombardement fournit de l'énergie aux surfaces horizontales, qui subissent une désorption induite par les ions, des dommages, et des réactions chimiques activées par les ions. Dans certains cas, les gaz de gravure forment un film sur les parois latérales du substrat, ce qui empêche une gravure latérale. Les parois latérales ne subissent pas le bombardement ionique et, par conséquent, le taux de gravure n'est pas le même que ce soit dans les directions longitudinale ou latérale. La gravure ionique réactive profonde (*Deep reactive-ion etching*, DRIE) exploite largement ce principe pour assurer des vitesses de gravure élevées avec une excellente résolution directionnelle. Le procédé Bosch est le procédé le plus utilisé pour la DRIE. Afin d'obtenir des structures verticales, deux étapes sont répétées alternativement : la gravure au plasma isotrope, par exemple en utilisant de l'hexafluorure de soufre (SF_6 pour le silicium), et le dépôt d'une couche de passivation chimiquement inerte, par exemple l'octafluorocyclobutane (C_4F_8) qui donne un matériau quasiment similaire au Téflon. Chaque phase dure plusieurs secondes. La couche de passivation protège l'ensemble du substrat contre d'autres gravures chimiques. Lors de la phase de gravure, les ions directionnels qui bombardent le substrat gravent la couche de passivation au fond de la tranchée et non sur les côtés, exposant ainsi le substrat à la gravure

chimique. En conséquence, la DRIE permet de graver un matériau en profondeur sans pour autant graver le substrat de manière latérale tout au long de la gravure.

4. L'application aux biocapteurs

En général, le procédé de fabrication de ces microélectrodes consiste à déposer un métal sur un substrat tel que le silicium, le verre ou la céramique, puis à réaliser des étapes de photolithographie et *de lift-off* afin de définir la forme, le nombre et le placement relatif de chaque électrode sur une microaiguille. La forme de l'aiguille et son épaisseur sont ensuite obtenues par gravure physique ou bien chimique ^[103,140]. Bien que les biocapteurs à multi-électrodes aient été conçus pour la première fois dans les années 1970, ce n'est que dans les années 1990 que ces outils ont été appliqués à la mesure neurochimique. Par exemple, c'est en 1996 que Sreenivas *et al.* ont mesuré la dopamine dans le cerveau à l'aide d'une microaiguille en silicium comportant quatre microélectrodes de carbone isolées avec du nitrure de silicium ^[170]. Plus tard, Gerhardt *et al.* ont fabriqué des biocapteurs à multi-électrodes en céramique fabriquées en salle blanche de 125 μm d'épaisseur \times 120 μm de largeur et munis de quatre électrodes rectangulaires en platine, chacune de 50 \times 50 μm pour la détection du glutamate ^[137].

Pour les analytes présents à de faibles concentrations allant de moins de 1 μM à quelques μM dans le fluide interstitiel, comme le glutamate et l'acide aminé exciteur D-sérine qui sont présents à de faibles concentrations, de l'ordre du μM dans le cerveau ^[19,24], il est nécessaire d'avoir une électrode capable de contrôler les courants non enzymatiques provenant des molécules oxydables endogènes, de changements de pH, ou de potentiels de champ locaux qui pourraient affecter la sélectivité de la mesure. Par conséquent, des électrodes dites de contrôle généralement recouvertes de BSA, et qui ne seront donc pas sensibles à la molécule désirée mais uniquement à ces faibles courants non spécifiques, sont utilisées en parallèle aux électrodes enzymatiques. Les mesures provenant des électrodes de contrôle sont ainsi soustraites à la mesure enzymatique afin d'obtenir uniquement le signal de la molécule désirée. Cette stratégie est communément appelée l'auto-référencement ^[171]. Par exemple, les aiguilles en céramique conçues par Gerhardt *et al.* sont capables de réaliser de l'auto-référencement lors de la détection du glutamate, en intégrant une électrode contrôle et une électrode pour le glutamate sur une même micro-aiguille fabriquée en salle blanche, créant ainsi un système intégré capable d'exclure les courants non spécifiques ^[171]. De plus, la possibilité de fabriquer sur une seule aiguille plusieurs biocapteurs pour détecter une

même molécule permet de cartographier les différences de concentration en fonction de la profondeur dans le tissu cérébral. Cette possibilité a récemment été explorée avec la détection de l'O₂ [172]. Cependant, pour tous ces biocapteurs à détection multiple, l'espacement des électrodes doit être soigneusement pris en compte afin d'éviter des interférences entre les électrodes [103] (**Figure I-8**).

Présentement, il n'est pas possible d'exposer tous les dispositifs à plusieurs microélectrodes qui se prêtent à la biodétection *in vivo*. Cependant, un grand nombre de ces biocapteurs fabriqués à l'aide des technologies MEMS ont d'ores et déjà été passés en revue récemment par Weltin *et al.* [169].

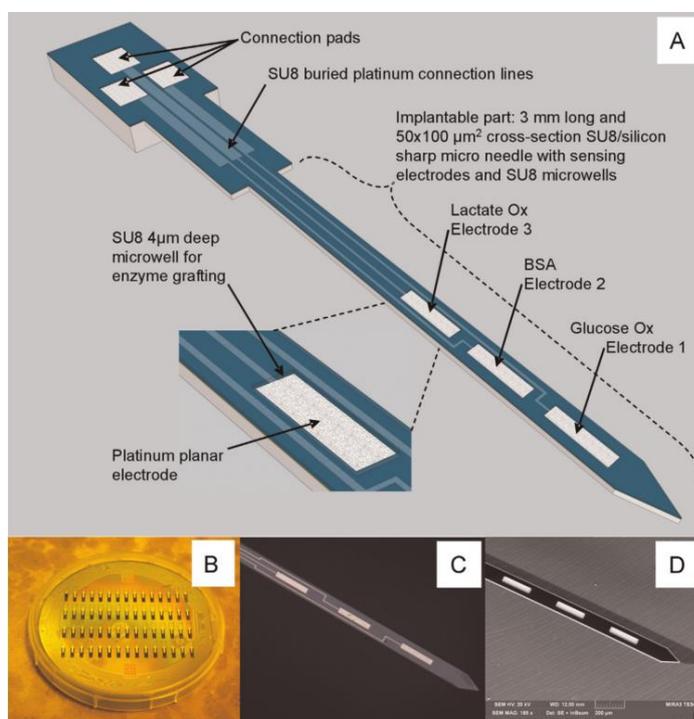


Figure I-8. Vue d'ensemble d'un biocapteur à plusieurs électrodes. **A.** Modélisation d'une sonde multi-électrodes en silicium/SU8 telle que développée par Vasylieva *et al.* (2015). **B.** Image d'un substrat de 4 pouces avec 60 micro-aiguilles fabriquées en salle blanche. **C.** Image en microscopie optique montrant les trois électrodes avec leur ligne de connexion. **D.** Image au microscope électronique à balayage (MEB) d'une micro-aiguille implantable et de trois électrodes entourées de micropuits en SU8.

V. Biocompatibilité

L'un des principaux problèmes liés à l'implantation de biocapteurs dans le cerveau est la possibilité de déclencher une réaction inflammatoire, également appelée réaction au corps étranger, qui peut compromettre les interactions entre le biocapteur et le liquide interstitiel (**Figure I-9**). Tous les vertébrés réagissent de manière stéréotypée à la pénétration d'un corps étranger : des mécanismes de cicatrisation et d'inflammation sont induits et une cicatrice se forme autour de l'objet implanté. Lorsqu'un biocapteur est implanté, les vaisseaux sanguins sont endommagés et les molécules plasmatiques telles que l'albumine, le

fibrinogène, et la fibronectine diffusent autour du site d'implantation et provoquent une passivation due à un encrassement biologique, ou *biofouling* en anglais [173]. Par la suite, des macrophages et des monocytes se lient à la surface du corps étranger, et des chimiokines et des cytokines sont libérées en réponse à la reconnaissance du biomatériau par le système immunitaire [58]. Enfin, la réponse inflammatoire attire les fibroblastes vers le matériau implanté et induit la fusion des macrophages en cellules géantes, qui entraîne la synthèse d'une capsule de collagène isolant efficacement le dispositif implanté du tissu sain à proximité [58,165] (voir l'étude de Kozai *et al.* [62]).

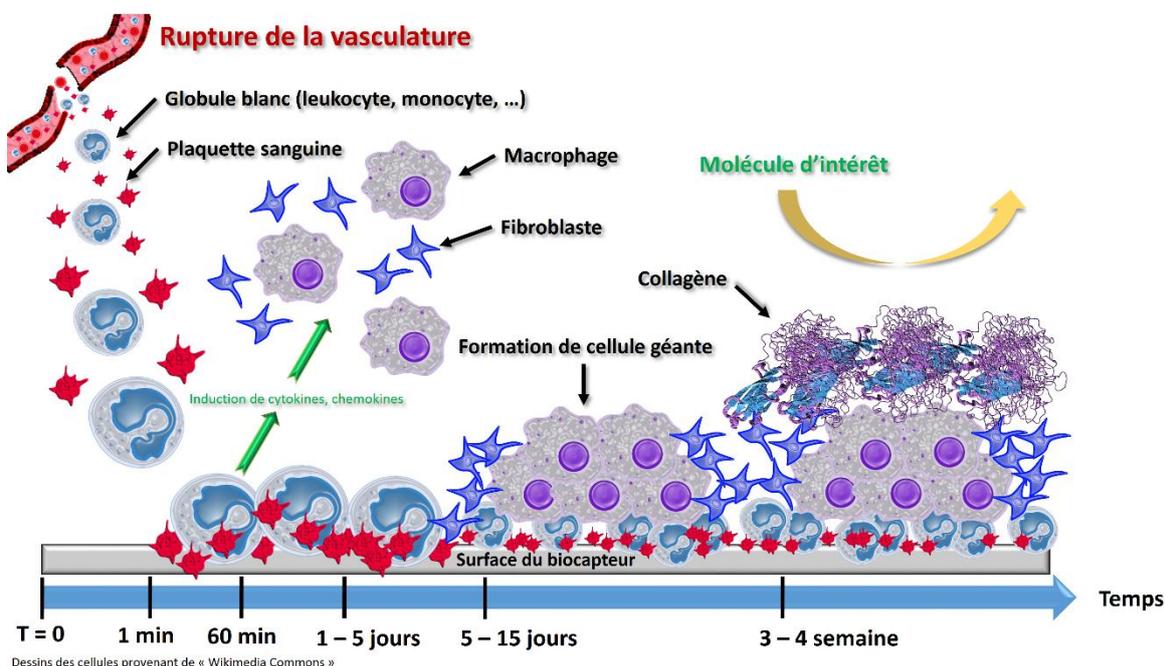


Figure I-9. Représentation temporelle de la réaction à un corps étranger en réponse à l'implantation d'un biocapteur.

Après l'implantation d'un biocapteur, la barrière hémato-encéphalique (BHE) est perturbée, se produit alors la diffusion d'albumine, de plaquettes, et de globules blancs (leucocytes et monocytes) à proximité du dispositif. Ces molécules s'adsorbent ensuite sur la surface du biocapteur et déclenchent une réaction au corps étranger se caractérisant par la libération de cytokines et de chimiokines et par l'attraction de macrophages et de fibroblastes vers le dispositif. Les macrophages absorbés fusionnent ensuite en cellules géantes et les fibroblastes synthétisent le collagène pour former une capsule isolante. Par conséquent, la molécule d'intérêt devient incapable d'accéder à la surface du biocapteur. (Certains éléments de ce schéma sont sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International license).

1. Libération de médicaments à l'aide de couche polymère

Une stratégie pour inhiber la réaction à un corps étranger consiste à libérer des médicaments anti-inflammatoires à proximité du biocapteur. Des couches de polymères libérant des médicaments ou des systèmes microfluidiques peuvent être intégrées dans des biocapteurs fabriqués en salle blanche ^[174] (**Figure I-10**). Des biocapteurs revêtus d'une membrane polymère poreuse contenant des agents pharmaceutiques anti-inflammatoires ont été proposés ^[175]. L'oxyde nitrique (NO) est une molécule qui bloque l'agrégation plaquettaire et l'hémostase, et elle présente également des propriétés anti-inflammatoires et pro-angiogéniques qui en font un candidat de choix afin d'être incorporé dans des biocapteurs *in vivo* pour en améliorer la biocompatibilité ^[175]. La dexaméthasone a également été incorporée dans des membranes d'hydrogel en utilisant des microsphères ^[176] ou des nanotubes de carbone ^[177], et il a été démontré que sa libération de manière lente dans le microenvironnement local du site d'implantation bloque les processus de formation de cicatrices. Par exemple, lorsque Zhong et Bellamkonda ont enduit des biocapteurs en silicium avec de la nitrocellulose chargée de dexaméthasone, les cicatrices gliales et la mort neuronale ont été réduites à proximité de la sonde ^[178]. Dans la recherche sur le diabète, lorsque Vallejo-Heligon *et al.* ont incorporé dans des capteurs de glucose une membrane poreuse en polyuréthane chargée de dexaméthasone, ils ont constaté que leur biocapteur conservait sa sensibilité sur une période d'implantation plus longue qu'avec des capteurs conventionnels et s'étendant jusqu'à 21 jours ^[179]. Cependant, la dexaméthasone systémique peut induire de nombreux effets secondaires, comme des oedèmes, des troubles du sommeil et/ou un gain de poids. En addition, il reste à établir quels effets possibles pourraient résulter de l'application locale de la dexaméthasone autour d'un biocapteur sur la physiologie du cerveau.

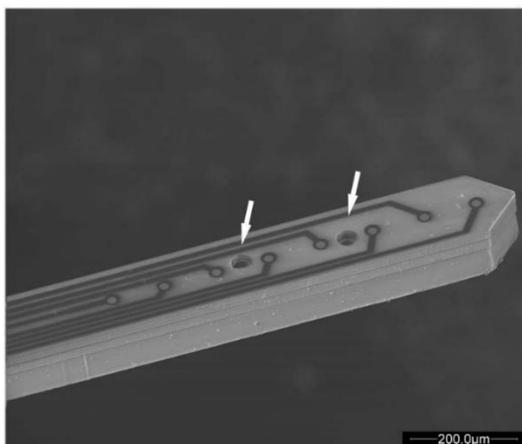


Figure I-10. Microsonde SU-8 avec des canaux microfluidiques pour la libération de médicaments.

Photographie au microscope électronique d'une microsonde équipée de huit microélectrodes alignées, ainsi que de deux orifices microfluidiques (indiqués par des flèches) qui permettent la libération d'un médicament à proximité des microélectrodes. Barre d'échelle : 200 µm. (Adapté d'Altuna *et al.* 2013).

2. Biocompatibilité de la surface externe du biocapteur

Les propriétés physiques de la surface directement en contact avec le milieu biologique d'une sonde implantée peuvent être influencées par sa compatibilité avec les tissus vivants. Par exemple, la forme, la taille, la rugosité, la porosité et la composition chimique des microélectrodes peuvent influencer l'intensité de la réaction à un corps étranger ^[180]. Les hydrogels à base de poly(éthylène glycol) (PEG) ont montré une faible affinité avec les protéines plasmatiques telles que l'albumine ou les globules blancs, entraînant ainsi une atténuation des réponses inflammatoires ^[181]. Il a également été avancé que le polyuréthane, le poly-carilonitrile et le polyéthersulfone, en plus d'étendre la gamme linéaire des biocapteurs, peuvent augmenter leur durée de vie *in vivo* ^[103,182]. L'électropolymérisation d'un film de phosphorylcholine pour des microélectrodes dopaminergiques a montré de bonnes capacités à empêcher l'absorption des protéines pendant l'implantation tout en maintenant dans le temps la sensibilité des microélectrodes ^[183]. Un autre matériau intéressant est le poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle) (PHEMA) qui est déposé par dépôt chimique en phase vapeur. Cet hydrogel a montré une réduction de huit fois de l'adhésion de l'albumine par rapport à une microélectrode en silicium nu, démontrant ainsi le potentiel d'un tel matériau pour augmenter la biocompatibilité ^[184]. Plus récemment, Skousen *et al.* ont proposé un biocapteur recouvert d'hydrogels d'alginate réduisant significativement la réponse inflammatoire *in vivo* ^[185]. De tels hydrogels pourraient s'appliquer aux analyses cérébrales par le biais de microélectrodes (voir la revue de Morais *et al.* ^[59]).

3. Importance de la dimension du biocapteur

La dimension d'un biocapteur implantable est également un facteur important pour limiter la réaction à un corps étranger, des biocapteurs avec des dimensions plus faibles réduisent les réponses inflammatoires lors de l'implantation ^[186,187]. Les déclencheurs initiaux d'une réaction à un corps étranger sont les lésions vasculaires et la perturbation de la BHE, qui entraînent le dépôt de protéines plasmatiques, y compris l'albumine, les globulines, la fibrine/fibrinogène, la fibrine, la plasmine thrombine, et les globules rouges ^[188]. Dans le cerveau du rat, les capillaires sanguins ont une distance moyenne de 15 μm ^[189]. Par conséquent, tout biocapteur dont le diamètre extérieur serait inférieur à 15 μm pourrait épargner une grande partie du parenchyme cérébral d'une perturbation majeure après

l'implantation. A notre connaissance, un tel degré de miniaturisation n'a jamais été atteint. Néanmoins, des efforts significatifs ont été faits, et continuent d'être faits, pour limiter le caractère invasif des biocapteurs électrochimiques.

Les biocapteurs *in vivo* ont une forme d'aiguille typique avec une petite section transversale et une longue tige. Généralement, les électrodes cylindriques utilisées pour la fabrication des biocapteurs ont des diamètres allant de 25 μm à 180 μm pour les fils de platine [89,156,158,190,191] et de 7 - 15 μm pour les fibres de carbone [134,146]. Cependant, ces diamètres augmentent jusqu'à 40 - 200 μm après que les biocapteurs aient subi une biofonctionnalité avec des enzymes et des polymères. Les sondes en silicium ou en céramique atteignent généralement des dimensions plus grandes avec une section transversale de $100 \times 50 \mu\text{m}^2$ [103,164] ou encore plus grandes [137,192].

Les effets de la taille du biocapteur sur la composition chimique locale du liquide interstitiel cérébral peuvent être dramatiques (**Figure I-11**). Borland *et al.* [193] ont comparé la détection de la libération de dopamine dans le cerveau par une sonde de microdialyse implantable d'un diamètre extérieur de 220 μm , côte à côte avec une microélectrode en fibre de carbone de 7 μm . La libération de dopamine évoquée par la stimulation des terminaux nerveux dopaminergiques a été détectée par les électrodes en fibre de carbone comme un signal électrochimique transitoire qui n'a duré que quelques secondes. Cependant, lorsque la microélectrode a été insérée à proximité de la sonde de dialyse, la libération de dopamine n'a plus été détectée, ce qui suggère que la plus grande sonde ait perturbé la transmission neuronale locale [193,194]. On a également constaté que la taille d'un biocapteur a un effet significatif sur les concentrations locales d'acide urique présentes dans le liquide interstitiel. Par exemple, la concentration d'acide urique était d'environ 50 μM à proximité de sondes de 320 μm de diamètre, et seulement 5 μM à proximité de sondes plus petites de 160 μm ou moins [68].

En plus de réduire les dimensions des biocapteurs, une flexibilité accrue des sondes peut offrir un certain nombre d'avantages [195-198]. Récemment, un biocapteur à microélectrode flexible basé sur un transistor électrochimique organique avec un polymère conducteur poly(3,4-éthylènedioxythiophène) dopé au polystyrène sulfonate (PEDOT:PSS) a été greffé sur un substrat de parylène de 4 μm d'épaisseur [199]. Ces dispositifs fournissent une nouvelle classe de microélectrodes mini-invasives sur lesquelles il est possible d'immobiliser des enzymes [200]. Cependant, leur biocompatibilité et leur performance *in vivo* pour la biodétection restent à évaluer.

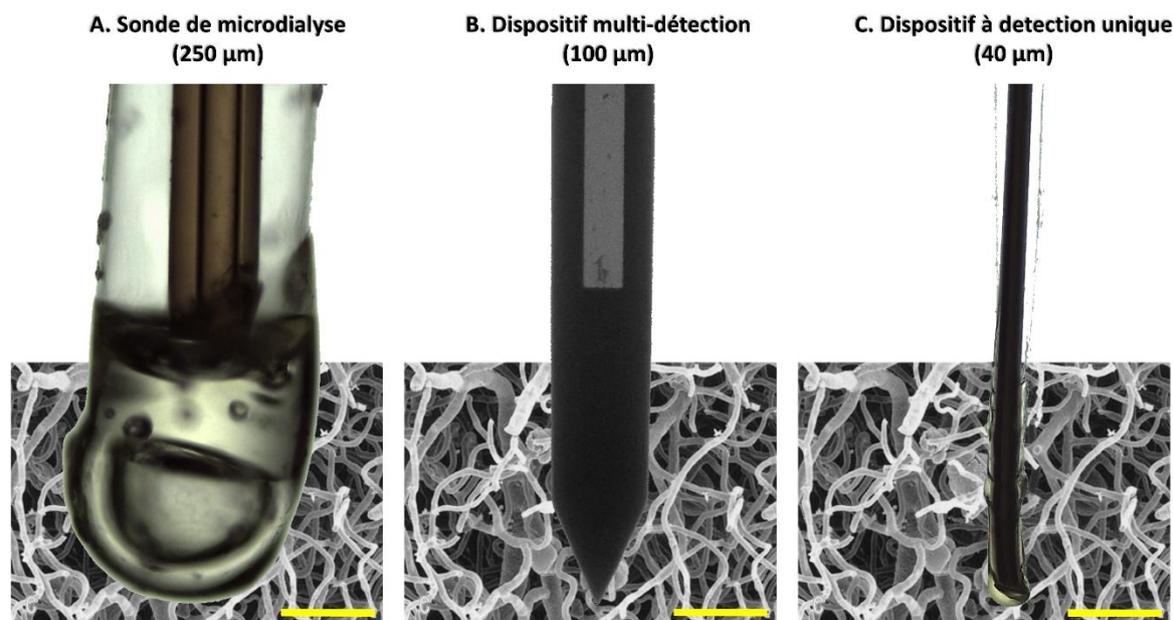


Figure I-11. Impact de l'implantation en fonction de la dimension des biocapteurs. Représentations illustrées (A) d'une sonde de microdialyse commerciale (diamètre externe, 250 µm), (B) d'une sonde fabriquée en salle blanche à plusieurs électrodes (largeur, 100 µm), et (C) d'un biocapteur à détection unique fabriqué avec un fil de platine/iridium (diamètre externe, 40 µm) superposées à une photographie prise par microscopie électronique de capillaires sanguins cérébraux espacés d'une distance moyenne de 15 µm selon Ohtake *et al.* [201] Barre d'échelle : 100 µm.

VI. Exemples de contributions des biocapteurs aux neurosciences

Au cours des 20 à 30 dernières années, les biocapteurs électrochimiques ont contribué de façon significative à notre compréhension des mécanismes neuronaux et des pathologies cérébrales. Il n'est pas possible de passer en revue toutes les études expérimentales en neurosciences qui impliquent des biocapteurs électrochimiques. De plus, les exemples suivants n'ont pas été choisis en fonction de leur excellence scientifique ou de leur impact, mais plutôt en fonction de leur capacité à illustrer ce que les biocapteurs peuvent réaliser en neurosciences. La plupart des études de biocapteurs se concentrent sur les métabolites énergétiques, le glucose et le lactate, sur les neurotransmetteurs excitateurs, le glutamate, la D-sérine et l'acétylcholine, ou sur les transmetteurs purinergiques, l'adénosine et l'ATP.

1. Métabolisme énergétique, le glucose et le lactate

Des biocapteurs électrochimiques ont d'abord été mis au point pour le suivi du glucose chez les patients diabétiques, puis appliqués à la recherche sur le cerveau pour étudier le métabolisme cérébral. Ces biocapteurs pour la détection du glucose utilisent la glucose-oxydase comme élément biologique, tandis que le remplacement de la glucose-oxydase par la lactate oxydase permet de concevoir un biocapteur de lactate.

Le glucose est le principal nutriment des cellules du cerveau, et il est métabolisé pour produire de l'énergie chimique sous forme d'ATP, de NADH, et d'autres composés. Il existe deux voies principales pour produire de l'ATP à partir du glucose : une voie oxydative qui est possible dans des conditions de normoxie et qui consomme de l'O₂, et une voie non oxydative qui n'a pas besoin d'O₂ et qui aide à maintenir la demande d'énergie cérébrale dans des conditions hypoxiques. Initialement, le glucose est métabolisé en pyruvate par une séquence de réactions qui composent le processus appelé glycolyse. En présence d'O₂, le pyruvate est ensuite soit transformé en CO₂ et en H₂O avec la production de 33 - 35 molécules d'ATP par le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs), soit lorsque la concentration en O₂ est faible ou dans des cellules qui manquent de mitochondries comme les érythrocytes, le pyruvate est métabolisé en acide lactique et seulement 8-10 molécules d'ATP sont produites [202]. Il a été démontré que ce processus métabolique complexe peut être suivi par des techniques électrochimiques. Par exemple, en 1997, Hu et Wilson ont décrit des changements dans les concentrations de glucose et de lactate pendant l'activité neuronale évoquée dans l'hippocampe [203], et ont démontré que la stimulation neuronale induisait une baisse des niveaux de glucose qui accompagnait une augmentation des niveaux de lactate extracellulaire [157]. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle le lactate est utilisé comme substrat énergétique par les neurones actifs. Les niveaux de glucose et de lactate ont également été surveillés pendant les périodes de sommeil et d'éveil. Il a été constaté que les concentrations extracellulaires de glucose diminuent pendant l'éveil et augmentent pendant le sommeil. En parallèle, les niveaux de lactate montrent, respectivement, des augmentations et des diminutions pour ces deux états [158,204,205].

Récemment, une observation plus complète du métabolisme cérébral a été obtenue grâce à la surveillance simultanée des concentrations d'O₂, de glucose et de lactate à l'aide de microélectrodes, d'une sonde de perfusion cérébrale, et de la mesure du débit sanguin avec un laser Doppler [163,206]. En particulier, les effets des dépolarisations corticales envahissantes (que l'on nommera CSD, pour *Cortical Spreading Depolarization*, ou

simplement SD, pour *Spreading Depolarization*) sur le métabolisme cérébral ont été soigneusement évalués. Les CSD sont un phénomène neurologique encore mal maîtrisé qui implique une vague de dépolarisation massive des neurones et des cellules gliales qui se propagent à travers le cortex à une vitesse de 2 - 4 mm/min. Les CSD représentent une contrainte métabolique majeure pour le parenchyme cérébral. De l'énergie doit être rapidement fournie afin de repolariser les cellules affectées et reprendre une activité neuronale normale. Au niveau métabolique, la propagation des ondes de dépolarisation a été caractérisée par une diminution du glucose extracellulaire, une augmentation du lactate, et un schéma triphasique (augmentation – diminution – augmentation) de variation d'O₂ [163,206]. Considérées dans leur ensemble, ces données indiquent que le métabolisme énergétique du cerveau augmente avec un taux élevé d'O₂ et une consommation de glucose qui s'accompagne d'une libération de lactate, un phénomène appelé hypermétabolisme (**Figure I-12**). Il est intéressant de noter que cette réponse hypermétabolique a été observée comme étant compromise après un traumatisme crânien chez le rat [206].

Dans l'ensemble, l'utilisation combinée de capteurs de lactate, de glucose et d'O₂ permet une analyse seconde par seconde du métabolisme cérébral et pour mieux comprendre les effets métaboliques provenant de phénomènes transitoires tels que les CSD et des pics d'activité neuronale.

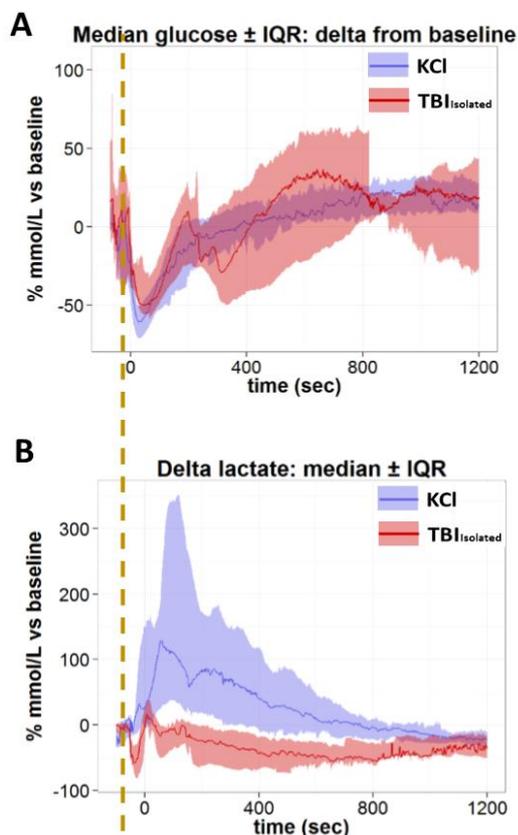


Figure I-12. Exemple de détection de la glycémie cérébrale et du lactate.

Changements de glucose (**A**) et de lactate (**B**) pendant les 20 premières minutes après une CSD dans le cerveau normal (traces bleues) et après trauma (traces rouges). La ligne verticale orange en pointillés marque l'apparition de la dépolarisation (Adapté de Balança *et al.*, 2017).

2. Neurotransmetteurs excitateurs, le glutamate et la D-sérine

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau, et on estime que 60 à 70 % de toutes les synapses du système nerveux central utilisent le glutamate comme neurotransmetteur [207]. Bien que le glutamate puisse être détecté au moyen de biocapteurs électrochimiques biofonctionnalisés à l'aide de la glutamate oxydase, notre compréhension des mécanismes qui régulent les concentrations de glutamate dans le liquide interstitiel n'en est encore qu'à ses balbutiements. La concentration ambiante de glutamate au repos dans le liquide interstitiel en l'absence de tout stimulus ou pathologie majeure fait actuellement l'objet d'un débat, avec des estimations allant de 0,02 μM [35] à 45 μM [208]. Cependant, la plupart des études sur les biocapteurs et la microdialyse réalisées au cours des dernières années ont fait état d'estimations de concentration de 1 à 5 μM (voir l'étude de Moussawi *et al.* [209]). Cette convergence récente des résultats est probablement liée à des améliorations techniques dans la conception des microélectrodes et des procédures d'immobilisation des enzymes [24,148]. L'effet de la décharge neuronale sur les concentrations de glutamate au repos est également débattu. Actuellement, cette condition est évaluée par l'administration locale d'un bloqueur du canal Na^+ , la térodotoxine (TTX), qui arrête rapidement l'activité neuronale. Alors que la plupart des études de microdialyse rapportent que les niveaux de glutamate au repos sont largement insensibles au TTX. Les biocapteurs, de leur côté, ont identifié une diminution de 30 à 50 % des niveaux de glutamate en réponse à la TTX [24,210,211]. Ces résultats suggèrent que le glutamate ambiant présent dans le liquide interstitiel peut avoir de multiples sources neuronales et non neuronales. De plus, il est probable que la concentration de glutamate dans l'espace interstitiel soit hétérogène et qu'il existe de forts gradients entre les différentes sous-régions du cerveau. Par exemple, des différences dans les concentrations de glutamate entre les fentes synaptiques et les compartiments extrasynaptiques ont été signalées [209].

Indépendamment des opinions divergentes sur les concentrations basales de glutamate, les biocapteurs électrochimiques ont régulièrement détecté des augmentations transitoires des niveaux de glutamate chez les rats éveillés engagés dans des tâches d'apprentissage. Par exemple, des changements transitoires dans les niveaux de glutamate ont été détectés dans l'amygdale basolatérale lors de comportements de recherche de récompense, et ces niveaux étaient sensibles à l'administration de TTX [22,23]. Ces résultats suggèrent que les changements transitoires dans les niveaux de glutamate sont bien une conséquence de l'augmentation de l'activité neuronale dans les voies glutamatergiques. De

plus, des changements transitoires de niveaux de glutamate ont été détectés dans les voies sensorielles du cerveau en réponse à la stimulation cutanée de la patte et dans le cortex préfrontal en réponse au stress ^[212,213]. Par ailleurs, une forte augmentation de la concentration de glutamate (+11 μM) a été observée lors de CSD, ce qui est probablement une conséquence de la dépolarisation massive des neurones et de la libération rapide de neurotransmetteurs qu'ils contiennent ^[214,215]. Il est aussi intéressant de noter que les lésions cérébrales induites lors d'un trauma entraînent une augmentation des niveaux de glutamate basal et des libérations de glutamate en réponse aux CSD successives ^[214,216].

La D-sérine est un acide aminé excitateur moins connu. C'est un co-agoniste du glutamate sur les récepteurs de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et il est connu pour être impliqué dans l'apprentissage et la mémoire, la plasticité synaptique, et dans les maladies neurologiques ainsi que psychiatriques telles que l'ischémie cérébrale, l'épilepsie, et la schizophrénie ^[217]. La D-sérine peut être détectée à l'aide de biocapteurs électrochimiques composés de la D-aminoacide oxydase ^[154,156]. Bien que cette enzyme ne soit pas spécifique à la D-sérine, mais de tous les acides D-amino neutres et cationiques ^[218], la D-sérine est le seul acide D-aminé de ce type à être présent dans le cerveau à des niveaux détectables ^[156]. Les études ayant recours à ces biocapteurs ont su révéler de faibles concentrations de l'ordre de quelques μM de D-sérine dans le liquide interstitiel : 2 à 3 μM dans le cortex et l'hippocampe, et < 1 μM dans le cervelet ^[18]. Physiologiquement, les niveaux de D-sérine sont contrôlés, au moins en partie, par les protéines transporteurs de l'alanine-sérine-cystéine ^[19]. Il est intéressant de noter que les modèles murins de la maladie d'Alzheimer ont montré une diminution des concentrations extracellulaires de D-sérine, et celles-ci ont été corrélées avec des déficits cognitifs ^[20]. Par conséquent, les biocapteurs à microélectrodes ont d'ores et déjà su contribuer de manière significative à une meilleure compréhension globale de la transmission du glutamate et de la D-sérine dans le cerveau, et continueront probablement à le faire à l'avenir.

3. L'acétylcholine et la choline

L'acétylcholine est le principal neurotransmetteur à la jonction neuromusculaire, et il a de nombreux rôles neuromodulateurs dans le cerveau ^[219]. Une fois libérée dans le liquide interstitiel, l'acétylcholine est rapidement dégradée en choline par l'enzyme acétylcholine estérase. Les biocapteurs électrochimiques peuvent détecter la choline en utilisant la choline

oxydase. L'acétylcholine peut également être détectée si l'acétylcholine estérase et la choline oxydase sont mélangées et immobilisées ensemble à la surface de la microélectrode [220–222]. Cependant, ces biocapteurs à double enzyme n'ont pas réussi à détecter des niveaux substantiels d'acétylcholine dans le liquide interstitiel [223], probablement parce que cette molécule se dégrade rapidement dans la fente synaptique et qu'elle n'est donc présente qu'à des concentrations extrêmement faibles dans l'ensemble du liquide interstitiel. Par conséquent, la plupart des études des systèmes neuronaux cholinergiques utilisant des biocapteurs se sont appuyées sur la détection de la choline, qui représente une estimation indirecte de la transmission de l'acétylcholine. Cette stratégie a démontré qu'une augmentation de choline dans le cortex préfrontal est déclenchée lors d'états d'attention chez le rat (**Figure I-13**) [16,224]. De plus, des changements dans les niveaux de choline ont été détectés en association avec l'éveil et des tâches de mémoire dans le cortex préfrontal et l'hippocampe [17].

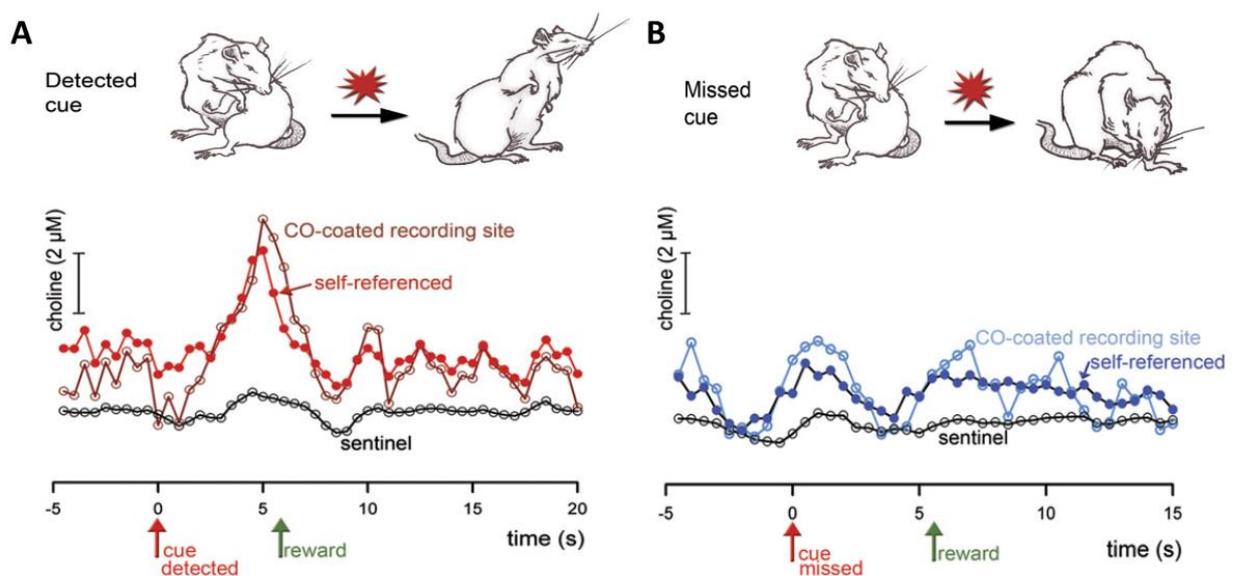


Figure I-13. Exemple de détection de la choline dans le cerveau.

L'activité cholinergique est augmentée lors de la détection d'un signal connu en rapport avec une remise de récompense. **A.** Traces brutes provenant d'un biocapteur avec de la ChOase (rouge foncé) et d'un autre sans ChOase (noir), enregistrées à 2 Hz au cours d'un essai impliquant la détection de signaux de récompense. **B.** Traces brutes (ChOase-coated : bleu ; non-ChOase-coated : noir) d'un essai au cours duquel le signal a été manqué. Les flèches sur l'abscisse indiquent l'heure du signal et de la remise de la récompense (Adapté de Parikh *et al.* 2007).

4. Transmission purinergique, l'adénosine et l'ATP

Les vésicules synaptiques qui stockent les neurotransmetteurs lors de transmissions synaptiques contiennent également de l'ATP, et la libération d'ATP en réponse à l'activité neuronale est presque omniprésente [225]. L'ATP qui est libérée dans le liquide interstitiel est rapidement dégradée en adénosine par les ectonucléotides, et l'adénosine contribue à un large éventail de fonctions cellulaires et comportementales. Par exemple, l'adénosine se lie à deux sous-types de récepteurs majeurs, les récepteurs A1 et A2, qui ont principalement à des fonctions inhibitrices [226]. Actuellement, aucune enzyme, à elle seule, n'a été identifiée comme étant capable de catalyser la dégradation de l'adénosine ou de l'ATP afin de les rendre détectables par des biocapteurs électrochimiques. Cependant, ces deux molécules peuvent être détectées à l'aide de systèmes de biocapteurs multi-enzymatiques. Par exemple, l'ATP peut être détectée par un mélange de glycérol kinase et de glycérol-3-phosphate oxydase, le glycérol kinase consommant de l'ATP pour transformer le glycérol en glycérol-3-phosphate. Ce dernier est ensuite dégradé en phosphate de glycérone par la glycérol-3-phosphate oxydase [227]. De son côté, la détection de l'adénosine nécessite un mélange de xanthine oxydase, de purine nucléoside phosphorylase, et d'adénosine désaminase. D'abord, l'adénosine est dégradée en inosine par l'adénosine désaminase, puis l'inosine est dégradée en hypoxanthine par la nucléoside phosphorylase, et enfin, l'hypoxanthine est dégradée en acide urique et H₂O₂ par la xanthine oxydase [88,228]. Ces deux types de biocapteurs ont été utilisés *in vivo* et dans des coupes de cerveau par Dale *et al.*, et les données obtenues ont démontré le rôle de l'ATP dans la chimiosensation, notamment dans la détection du CO₂ par les neurones dédiés de la moelle oblongue [229,230] et dans la détection du glucose par les tanocytes, cellules gliales hypothalamiques spécialisées dans la communication sang-cerveau [231]. De plus, les biocapteurs électrochimiques ont montré que l'adénosine libérée par les astrocytes s'accumule dans le liquide interstitiel du cerveau pendant l'éveil, modulant ainsi la transmission synaptique et l'activité des réseaux corticaux [232].

VII. Axes et stratégie expérimentaux

Les biocapteurs enzymatiques implantables sont une des voies les plus prometteuses en neurosciences pour mesurer les composés neurochimiques au sein du fluide interstitiel dans des zones profondes du cerveau de manière quantitative et en temps réel. Mais l'impact de leur implantation sur la physiologie du cerveau est un paramètre non négligeable pour obtenir des mesures neurochimiques fiables et précises. Cette problématique a donc motivé le développement de biocapteurs minimalement invasifs afin de pouvoir réaliser un suivi intracérébral des neurotransmetteurs et des métabolites dans des conditions les plus physiologiques possibles.

La stratégie expérimentale choisie pour répondre à cette question a été d'explorer deux axes de recherche, la miniaturisation de biocapteurs enzymatiques et l'intégration de biocapteurs électrochimiques et optiques sur une unique microsonde.

La stratégie fut la suivante,

I. Pour la miniaturisation de biocapteurs enzymatiques :

- Obtenir des propriétés de détection de l' H_2O_2 sur des fibres de carbone en déposant des couches minces de Pt,
- Déterminer le dépôt optimal (choix de la technique de dépôt, des matériaux déposés et des paramètres de dépôt),
- Biofonctionnaliser les fibres de carbone platinées,
- Evaluer *in vivo* l'impact physiologique des biocapteurs miniaturisés par rapport à des biocapteurs conventionnels.

II. Pour l'intégration de biocapteurs optiques et enzymatiques sur un unique support :

- Développer une microsonde implantable permettant d'accueillir une fibre optique et des microélectrodes sur son extrémité,
- Biofonctionnaliser de manière localisée les microélectrodes,
- Mettre en place un système optique pour la détection de fluorescence,
- Caractériser *in vitro* les performances individuelles des biocapteurs,
- Evaluer la mesure en simultané par la présence d'interférences d'une mesure sur une autre.

Chapitre II - Développement de biocapteurs enzymatiques ultra-miniaturisés et évaluation de l'impact de la miniaturisation sur la mesure *in vivo*

Le suivi de la composition chimique et biochimique du liquide interstitiel du cerveau est un défi important pour la recherche préclinique et clinique. Les biocapteurs enzymatiques sont une technique prometteuse pour détecter les substances neurochimiques dans le fluide interstitiel, et peuvent fournir des estimations quantitatives de concentration avec une résolution temporelle seconde par seconde. Cependant, cette technique est souvent limitée par la taille des sondes implantées dans le cerveau. Ce chapitre présente des microélectrodes ultra miniaturisées à base de fibres de carbone platinées qui ont été fabriquées pour obtenir des biocapteurs avec un diamètre extérieur inférieur à 15 μm . Ces biocapteurs implantables ont le potentiel de pouvoir être implantés dans le cerveau sans endommager gravement le parenchyme cérébral et les vaisseaux sanguins. Lors des travaux présentés dans ce chapitre, nous verrons qu'ils ont permis de fournir des estimations plus précises des concentrations basales d'oxygène, de glucose, de lactate et de D-sérine, ainsi que de leurs changements dynamiques en réponse à une vague de dépolarisation, comparativement à des biocapteurs conventionnels de taille plus importante qui sont probablement entourés d'une couche de tissu nerveux lésé par l'implantation. Ces biocapteurs ultra miniaturisés représentent une avancée majeure dans l'analyse chimique en temps réel du fluide interstitiel du cerveau.

I. Introduction

L'analyse du fluide interstitiel cérébral peut révéler des informations neurochimiques importantes sur les états physiopathologiques du cerveau. En clinique ou chez les animaux de laboratoire, les concentrations extracellulaires des métabolites énergétiques cérébrales tels que le glucose, le lactate et le pyruvate peuvent être suivies en temps réel pour détecter des formes spécifiques de lésions cérébrales [233]. De plus, la communication entre neurones et l'activation de réseaux neuronaux entraîne une libération synaptique ou extrasynaptique de neurotransmetteurs qui peuvent être détectés dans le fluide interstitiel. Les sondes implantables telles que la microdialyse ou les microélectrodes fournissent une meilleure estimation des valeurs quantitatives des concentrations extracellulaires de ces composés neurochimiques par rapport aux techniques non-invasives optiques ou spectroscopiques, et à cet égard, la taille de la sonde et les lésions locales produites lors de leur implantation sont des paramètres clé pour une estimation fiable dans des conditions physiologiques les plus proches possibles de la réalité [234].

La détection des neurotransmetteurs à l'aide de microélectrodes en fibre de carbone a contribué de façon significative à la compréhension du système dopaminergique et de ses implications en matière de récompense et de dépendance [75,235-238]. Leur petit diamètre de l'ordre de 7 μm les rend particulièrement adaptées à l'analyse du fluide interstitiel. Ils sont significativement plus petits que la distance moyenne entre les capillaires cérébraux estimée à environ 15 μm [189,201], et peuvent être implantés dans le parenchyme cérébral sans dommage majeur aux vaisseaux sanguins [193]. Cependant, l'analyse du fluide interstitiel à l'aide de microélectrodes en fibre de carbone est limitée par des problèmes de sélectivité. Par exemple, les courants redox de la dopamine, l'épinéphrine et la norépinéphrine sont indiscernables avec des microélectrodes en carbone. Pour cette raison, l'étude de la dynamique de la dopamine cérébrale se limite habituellement aux régions du cerveau dans lesquelles l'épinéphrine et la norépinéphrine sont indétectables, comme le noyau Accumbens et le striatum [75]. Les biocapteurs à microélectrodes peuvent étendre la gamme de molécules susceptibles d'être détectées par voie électrochimique en utilisant des enzymes oxydases pour détecter des neurotransmetteurs ou des métabolites non électroactifs. Typiquement, les oxydases oxydent leur substrat tout en consommant de l' O_2 et en produisant du peroxyde

d'hydrogène (H_2O_2). Par conséquent, la plupart des biocapteurs basés sur des microélectrodes pour l'analyse cérébrale sont fabriqués à l'aide d'électrodes de platine (Pt) qui détectent le H_2O_2 produit par l'enzyme. Malheureusement, la taille de ces microélectrodes de Pt est relativement grande, de l'ordre de 25 à 250 μm (40-250 μm avec l'enzyme), et l'implantation de ces dispositifs dans le parenchyme cérébral peut entraîner des lésions des vaisseaux sanguins, la diffusion de l'albumine sérique et de monocytes dans le cerveau, ainsi que le déclenchement d'une réaction inflammatoire autour de la sonde conduisant à une réaction au corps étranger ^[62]. Cela peut avoir des conséquences désastreuses sur la détection chimique à long terme, et les conséquences à court terme après quelques heures d'implantation, bien que mal comprises, pourraient être potentiellement significatives.

Malheureusement, si le carbone est disponible dans le commerce sous forme de fibres très fines, il est mal adapté à la détection du H_2O_2 ^[239,240]. Le Pt peut être électro-déposé sur des fibres de carbone pour obtenir des microélectrodes sensibles au H_2O_2 , mais ces dispositifs ont généralement une durée de vie relativement courte, de quelques heures ^[241]. Le Pt peut aussi être facilement déposé sur des surfaces planes en silicium ou en céramique par dépôt physique en phase vapeur, mais de tels procédés ont rarement été testés sur des objets de forme cylindrique. Nous avons examiné ici la faisabilité de la platination de fibres de carbone de 7 μm de diamètre par dépôt physique en phase vapeur et ainsi de l'obtention de biocapteurs électrochimiques ultra miniaturisés avec un diamètre externe inférieur à 15 μm une fois biofonctionnalisés avec une enzyme. Nous avons testé ces dispositifs *in vivo* pour le suivi de l' O_2 , du glucose, du lactate et de la D-sérine dans le cerveau de rats afin de comprendre l'impact de la réduction de la taille de la sonde sur l'estimation des concentrations extracellulaires de substances neurochimiques dans le cerveau.

La première partie de ce chapitre décrit les techniques de métallisation employées ainsi que les différents protocoles *in vitro* et *in vivo*. La seconde partie présente les résultats de la fabrication des biocapteurs ultra miniaturisés, de leur comportement électrochimique et de leur biofonctionnalisation. Enfin, une troisième partie évalue l'impact de la miniaturisation en exposant les résultats obtenus *in vivo* qui les comparent à des biocapteurs conventionnels et donc plus larges.

II. Matériels et méthodes

1. Techniques de métallisation

La possibilité de déposer des couches minces de matériaux est un processus important en microfabrication. Diverses techniques existent que ce soit par dépôt physique (évaporation ou pulvérisation cathodique), par dépôt chimique, par croissance du matériau souhaité, ou encore par impression. Dans notre cas, nous nous intéresserons principalement aux dépôts physiques en phase vapeur (PVD). D'un autre côté, l'alumine (Al_2O_3) a été déposée par le biais de dépôts chimiques en phase vapeur (CVD), l'ALD (« Atomic Layer Deposition »).

Dans le cadre des travaux présentés par la suite, la métallisation a été réalisée sur des fibres de carbone de 7 μm de diamètre (Goodfellow, Lille, France). Les fibres ont été nettoyées dans de l'acétone bouillante pendant 30 minutes, puis séchées dans une étuve à 40 - 50°C, avant d'être fixées sur un support en aluminium par une de leurs extrémités pour l'évaporation, ou suspendues entre deux capillaires en verre montés sur un substrat de 2 pouces pour la pulvérisation cathodique. Les dépôts par évaporation ont été réalisés avec un bâti Edwards AUTO 306. La pulvérisation cathodique a été réalisée avec un bâti AC450. Enfin, 5 nm d'alumine (Al_2O_3) ont aussi été déposés sur quelques échantillons par ALD (Précurseurs : TMA, Ar [pulse de 0,06 s, purge de 10 s], H_2O [pulse de 0,06 s, purge de 10 s], 200 cycles de pression régulée par débit d'Ar). Pour les dépôts par évaporation et pulvérisation, les paramètres selon lesquels les différents matériaux utilisés ont été déposés sont résumés dans le **tableau II-1**.

Tableau II-1. Récapitulatif conditions de dépôts

		Titane – Ti	Chrome – Cr	Platine – Pt
Evaporation	Pression (mbar)	$5,10^{-7}$	$1,10^{-6}$	$1,10^{-6}$
	Puissance (W)	300	50	750
	Epaisseur (nm)	15	15	100
Pulvérisation	Pression (mbar)	$5,10^{-3}$	$5,10^{-3}$	$5,10^{-3} / 5,10^{-2}$
	Puissance (W)	277	90	111 / 100 / 90
	Epaisseur (nm)	15	15	24 à 100
	Débit d'argon (sccm)	50	50	50

2. Fabrication des biocapteurs

Les biocapteurs électrochimiques minimalement invasifs ont été fabriqués à partir de fibres de carbones platinées de 7 μm de diamètre, collées sur un fil de cuivre de 0,5 mm (Becker, Almacen, Espagne) en utilisant une laque électroconductrice à base d'argent (Radiospares, Beauvais, France). Ils ont ensuite été encapsulés dans un capillaire de verre étiré (Warner Instruments, Hamden, USA), et la pointe de cette micropipette a été coupée pour laisser dépasser une longueur d'environ 100 μm de la fibre en dehors du verre. La jonction entre le verre et la fibre a été scellée par la fusion locale du verre, et de la résine époxy (Araldite, Bostik, Paris, France) a été appliquée sur l'extrémité arrière entre la micropipette et le fil de cuivre. Les électrodes conventionnelles ont été fabriquées selon le même principe, en utilisant un fil de 75 μm de diamètre composé de 90% Pt et de 10% Ir (Goodfellow, Lille, France) qui a été scellé à la pointe de la micropipette en verre à l'aide de colle époxy au lieu d'être scellé par la chaleur. Enfin, les deux types d'électrodes ont été nettoyées pendant 10 minutes dans de l'éthanol et rincées à l'eau dé-ionisée avant utilisation.

Fabrication des biocapteurs enzymatiques. La biofonctionnalisation des microélectrodes a été réalisée en suivant les protocoles établis par Vasylieva *et al.* ^[89,242]. Une couche de sélectivité de polyphénylènediamine (PPD) a d'abord été électro-déposée par immersion des électrodes pendant 20 minutes dans une solution de 100 mM de m-phénylènediamine dans du tampon phosphate salin (PBS) de 0,01 M, à un pH de 7,4, avec un potentiel constant de +700 mV par rapport à une pseudo-référence Ag/AgCl. Les biocapteurs de glucose, de lactate, de D-sérine, et de glutamate ont été construits en évaporant respectivement une solution de 60 mg/mL de glucose oxydase d'*Aspergillus niger*, de lactate oxydase de *Pediococcus sp.*, de D-amino oxydase (DAAO) de *Rhodospiridium toruloides*, ou 100 mg/mL de glutamate oxydase de *Streptomyces sp.* dans 0,01M PBS (pH 7,4) avec 1 % de glycérol, 60 mg/mL de sérum albumine bovine (BSA) et 20 mg/mL de poly(éthylène glycol) diglycidyléther (PEGDE, Mn 500 en moyenne), pour la glucose et la lactate oxydase, 5 mg/mL pour la DAAO et 100 mg/mL pour la glutamate oxydase. Après le dépôt de l'enzyme réalisé sur la fibre de carbone platinée ou le fil Pt/Ir, le mélange enzymatique a été immobilisé en plaçant les biocapteurs à 42°C (biocapteurs de glucose et de glutamate) ou à 57°C (biocapteurs de lactate et de D-sérine) pendant 2 heures. Enfin, pour les biocapteurs de

glucose et de lactate, en fonction de la valeur de la constante de Michaelis (K_m) à obtenir, deux ou plusieurs couches de polyuréthane à 5 % ont été déposées par trempage.

Des biocapteurs contrôles, ont également été fabriqués en remplaçant l'enzyme active par de l'albumine bovine (BSA, solution de dépôt 400 mg/ml, 1 % de glycérol dans 0,01 M PBS pH 7,4). Ils permettent de détecter l'oxydation de l' H_2O_2 endogène et de quantifier les courants de base à l'interface entre le biocapteur et le milieu extracellulaire. La BSA ne modifie pas la sensibilité des biocapteurs pour le peroxyde et n'a pas de propriétés catalytiques que ce soit pour le glucose, le lactate, la D-sérine ou le glutamate, de sorte qu'il n'interfère pas avec la détection de la molécule d'intérêt. Dans des conditions normales *in vivo*, la concentration extracellulaire dans le cerveau du glutamate et de la D-sérine est très faible. Il est alors impératif de mesurer les courants non spécifiques par le biais de biocapteurs contrôles (BSA) implanter en parallèle des biocapteurs de glutamate ou de D-sérine. En soustrayant le courant détecté par les biocapteurs BSA à celui mesuré par les biocapteurs de glutamate ou de D-sérine, il est possible d'obtenir des valeurs précises de la concentration de glutamate ou de D-sérine. Une représentation schématique d'un biocapteur finalisé est donnée par la **Figure II-1**.

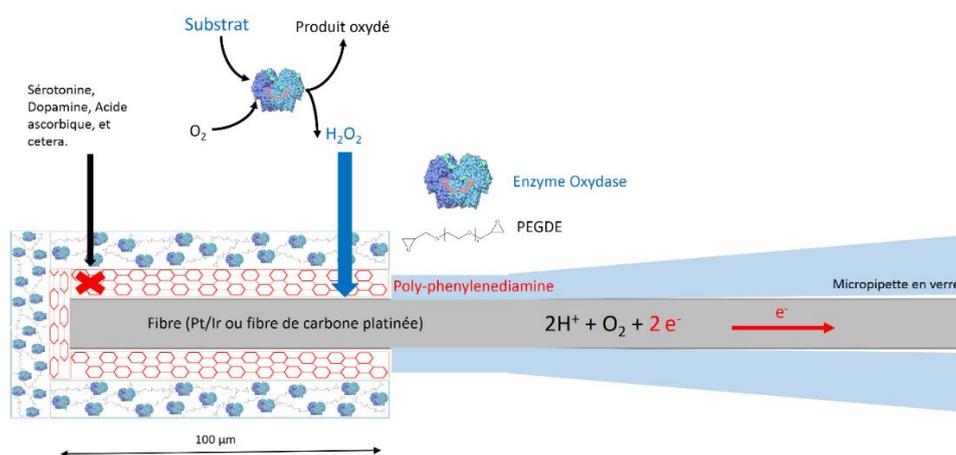


Figure II-1. Décomposition schématique d'un biocapteur fabriqué à la main.

Le biocapteur est fabriqué à partir d'une fibre de carbone platinée, ou d'un fil de platine/iridium massif, encapsulé dans une micropipette en verre. Une partie de la fibre ressort du capillaire avec une longueur de 100 µm. Ensuite, une couche sélective de poly-phénylènediamine est électro-polymérisée sur la surface du platine. Enfin, l'électrode est biofonctionnalisée avec une enzyme oxydase immobilisée avec du PEGDE qui permet la détection des molécules comme le glucose, le lactate, le glutamate ou la D-sérine. Lorsque la molécule d'intérêt est présente avec de l'oxygène, elle sera oxydée par l'enzyme produisant du peroxyde d'hydrogène. Puis, le peroxyde d'hydrogène s'oxyde sur la surface du platine, ce qui produit un courant d'oxydation qui permet d'estimer la concentration du substrat enzymatique autour de l'électrode.

Fabrication des capteurs d'oxygène. Les microélectrodes en fibre de carbone platiné ont été recouvertes par trempage avec deux couches de solution de résine perfluorée Nafion® à 5 %. Une couche de Nafion a été déposée afin d'augmenter la biocompatibilité et de ne pas exposer directement le Pt au milieu extracellulaire. Leur diamètre final était d'environ 7 µm. Pour comparer leurs performances *in vivo* avec celles de capteurs plus larges, nous avons utilisé des sondes à oxygène commerciales basées sur des fibres optiques de 250 µm de diamètre (Oxford Optronics, Abingdon, Royaume-Uni).

3. Techniques de calibration et d'acquisition, *in vivo*

Appareils et mesures

Tous les enregistrements ampérométriques ont été réalisés avec un amplificateur électrochimique VA-10X connecté à un préamplificateur à deux électrodes (NPI Electronic GmbH, Tamm, Allemagne) et à une interface analogique-numérique NI USB-6341 (National Instruments, Nanterre, France) contrôlée par des procédures programmées au sein du labo à l'aide du logiciel Igor Pro 7,0 (Wavemetrics, Eugene, OR, USA). Le courant d'oxydation a été enregistré à 1 kHz et filtré avec un filtre passe-bas avec une fréquence de coupure de 20 Hz (*in vivo*) et 200 Hz (*in vivo*). Une fréquence de coupure plus élevée est utilisée lors des mesures *in vivo* afin de pouvoir détecter l'activité électrique du cerveau aux alentours du biocapteur. Enfin, la médiane seconde par seconde du signal ampérométrique enregistré a été calculée pour diminuer le bruit électrique lié à l'activité neuronale et ainsi mieux mesurer les concentrations extracellulaires.

Étalonnages *in vitro*

Suite à la métallisation et avant le dépôt de l'enzyme oxydase, les microélectrodes ont été étalonnées au H₂O₂. Pour cela, les microélectrodes ont été immergées dans une solution de PBS, puis trois injections successives de 1 µM de H₂O₂ ont été réalisées. L'étalonnage des microélectrodes à des concentrations plus importantes n'était pas nécessaire car leur réponse au H₂O₂ était linéaire jusqu'à des concentrations de plusieurs milli molaires de H₂O₂ (**Figure II-2**). Il a été choisi d'utiliser la moyenne de ces trois injections correspondant à leur sensibilité normalisée au H₂O₂ afin de comparer les performances des

différentes microélectrodes. Un même étalonnage est réalisé suite à l'électrodéposition de la couche de PPD.

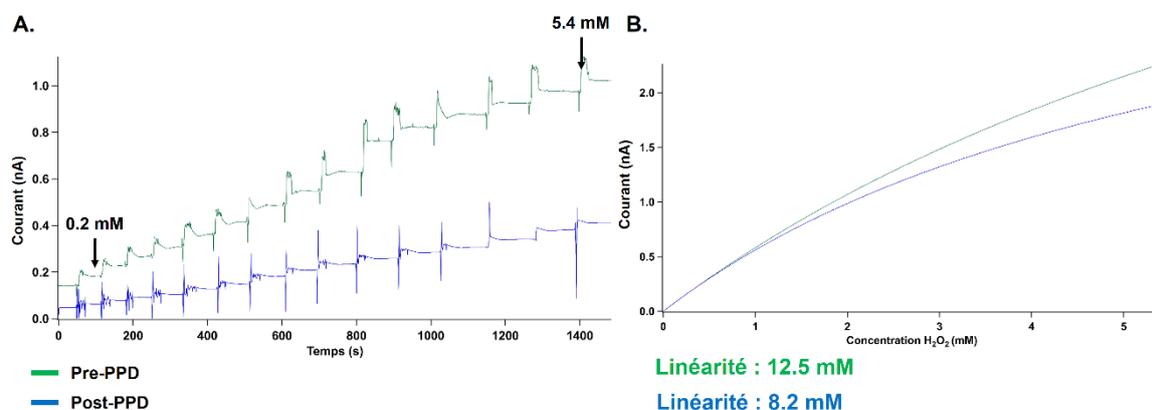


Figure II-2. Exemple d'étalonnage *in vitro* d'une microélectrode au H₂O₂.

A. Injections successives de différentes concentrations de H₂O₂ dans une solution de PBS avant (en vert) et après (en bleu) l'électrodéposition de la couche de PPD. B. Courbes d'étalonnage obtenues suite aux injections de H₂O₂ avant (en vert) et après (en bleu) l'électrodéposition de la couche de PPD.

Expérimentations *in vivo*

Biocapteurs enzymatiques. Les étalonnages *in vivo* ont été effectués dans une solution de PBS standard (0,01 M, pH 7,4). Un fil d'argent chloruré (Ag/AgCl) placé directement dans la chambre d'enregistrement a été utilisé comme pseudo-référence. Un potentiel constant de +500 mV a été imposé entre l'électrode de travail et la pseudo-référence. Avant les expériences, tous les capteurs sont testés pour la détection de la sérotonine (5-HT, 20 μM, PBS 0,01 M, pH 7,4). Notre critère d'efficacité de la couche de PPD est une détection inférieure à 1,2 pA.mM⁻¹.cm⁻² pour la 5-HT. Les biocapteurs présentant une sensibilité à la 5-HT supérieure à cette valeur sont à nouveau revêtus de PPD jusqu'à ce qu'ils remplissent ce critère de sélectivité. Pour les études *in vivo*, les biocapteurs ont été étalonnés avant et après les expériences pour s'assurer que la sensibilité soit restée stable. Les expériences montrant une variation de plus de 20 % de la sensibilité des biocapteurs ont été rejetées (ce qui représente 2 sur 13 des enregistrements), enfin les concentrations absolues ont été calculées sur la base d'étalonnages post *in vivo*.

Capteurs d'oxygène. L'étalonnage de l'oxygène *in vivo* a été effectué dans une fiole de verre hermétique, remplie de PBS standard (0,01 M, pH 7,4) et contenant une pseudo-référence

Ag/AgCl, une sonde à oxygène commerciale et une microélectrode en fibre de carbone platinée. La réduction de l'O₂ se produisant à partir de potentiel de -360 mV sur nos microélectrodes (**Figure II-3**), un potentiel constant de -500 mV a été réglé entre la microélectrode et l'électrode de référence pour déclencher la réduction de l'oxygène sur le platine et afin d'obtenir une meilleure sensibilité. La solution tampon a été progressivement désoxygénée avec de l'azote jusqu'à ce que la PO₂ atteigne $7,68 \pm 6,06$ mmHg (moyenne \pm écart-type standard, n = 12). Les mesures électrochimiques obtenues à partir des microélectrodes en fibre de carbone platinées ont été ajustées de manière polynomiale sur les valeurs mesurées par le capteur commercial. Pour les études *in vivo*, les biocapteurs ont été étalonnés avant et après les expériences. Les valeurs absolues de PO₂ ont été calculées sur la base de l'étalonnage post *in vivo*. Les expériences montrant une variation de plus de 30 % de la sensibilité des biocapteurs ont été rejetées (ce qui représente 3 sur 10 des enregistrements).

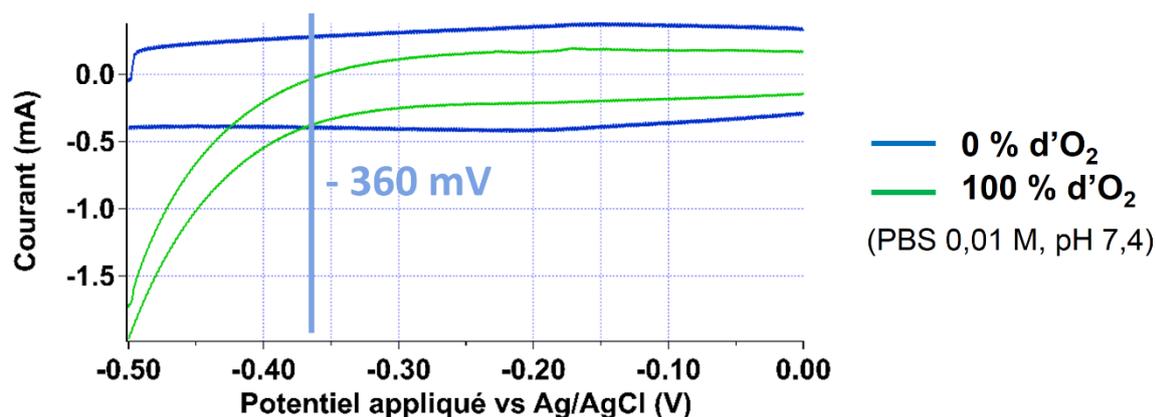


Figure II-3. Réduction de l'O₂ sur une fibre de carbone platinée.

Exemple de voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution de PBS (0,01 M, pH 7,4) à 0% d'O₂ et à 100% avec une microélectrode fabriquée avec une fibre de carbone platinée (7 μ m-diamètre), montrant la réduction de l'O₂ se réalisant à partir de potentiel de l'ordre de -360 mV.

4. Protocoles *in vivo*

Toutes les procédures expérimentales réalisées étaient conformes à la réglementation européenne (Directive européenne 2010/63/EU). Par ailleurs, les procédures ont été validées par le comité local de recherche animale et ont été approuvées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (C2EA DR2016-22 et APAFIS

9328) de l'Université Claude Bernard Lyon I. Les expérimentations *in vivo* ont été réalisées au sein de la plateforme NeuroChem (CRNL). Des rats Sprague Dawley adultes, mâles et femelles, pesant de 200 à 500 g (Envigo, Cannat, France) ont été utilisés tout au long de l'étude. Les enregistrements électrochimiques ont été effectués sous anesthésie à l'isoflurane (3 à 5 % pour l'induction, et 1,5 à 2,5 % durant l'expérimentation) et sous oxygène inspiré à 100 %, à l'exception des enregistrements du lactate et de la PO₂ durant lesquels les animaux ont respiré de façon transitoire l'air ambiant (oxygène inspiré ± 21 %). Afin d'exclure toute possibilité de souffrance chez les animaux lors de la chirurgie, ils ont reçu un traitement analgésique systémique de buprénorphine (Buprecare, 0,05 mg/kg s.c.) et une administration d'anesthésie locale au niveau de la boîte crânienne de lidocaïne/ropivacaïne (lidocaïne 2,5 mg/ml, ropivacaïne 3,75 mg/ml, 0,3 mL).

Chez certains animaux, un cathéter intraveineux a été placé dans la veine fémorale avec 0,1 mL d'héparine (20 U/mL) pour éviter la thrombose. Afin de procéder à l'installation du cathéter intraveineux, les membres du rat sont immobilisés à l'aide de sparadrap afin que la zone inguinale soit suffisamment exposée pour permettre l'identification des repères anatomiques. Après avoir pratiqué une incision cutanée oblique de 2 cm de long (**Figure II-4 A.**), le tissu conjonctif est séparé et la zone d'intérêt est exposée à l'aide d'une pince (**Figure II-4 B.**). Il est possible de distinguer l'artère de la veine sur la base de leur couleur : la veine est rouge foncé bleuté, l'artère est rouge vif. Le nerf qui court le long de l'artère est d'un ton blanchâtre. Sous fort grossissement binoculaire, l'artère et la veine, physiologiquement liées entre elles par une membrane de tissu conjonctif, sont séparées à l'aide d'une pince à pointe fine. Grâce à cette méthode chirurgicale, le risque de déchirer, de piquer et d'endommager les vaisseaux est considérablement réduit ^[243]. Cependant, pendant la chirurgie, il est impossible d'éviter complètement les déchirures et les saignements légers qui sont arrêtés à l'aide de coton-tiges. Un fil de soie (Ethicon, Neuilly sur Seine, France) est positionné sous l'extrémité distale de la veine et un autre est positionné sous l'extrémité proximale de la veine. Pour couper la circulation veineuse, un double nœud est fait avec le fil de soie distale. Afin de détendre les parois de la veine, 1 à 2 gouttes de Lidocaïne (5 mg/mL, Ceva®, Libourne, France) et de Ropivacaïne (3,75 mg/mL, AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) sont déposées sur la veine. À l'aide de ciseaux de microdissection, une petite incision est pratiquée dans la veine à un angle de 45 degrés. Le cathéter rempli de 20 U/ml d'héparine (Heparine Choay, Sanofi, Le Plessis-Robinson, France) et coupé avec un angle de 45° est

soigneusement inséré dans l'incision et glissé dans la veine. Un fil de soie est fixé autour de la veine et du cathéter avec un double nœud (en s'assurant qu'elle n'occulte pas la veine). Une seconde suture est utilisée pour fixer le cathéter ainsi que pour assurer le placement correct du cathéter (**Figure II-4 C.**). Une petite quantité de sang est ensuite aspiré dans le cathéter à l'aide d'une seringue pour vérifier le bon positionnement du dispositif. Après ce contrôle, 0,1 ml d'héparine (20 U/mL) est injecté dans la veine, afin de prévenir les phénomènes thrombotiques.

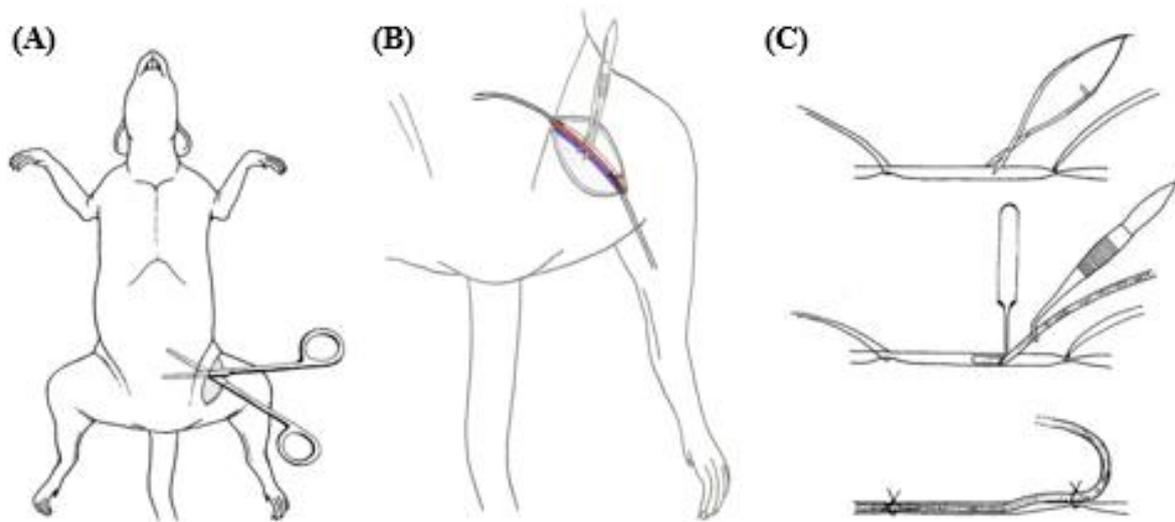


Figure II-4. Procédure d'insertion du cathéter.

(A) Dissection du tissu conjonctif pour exposer l'artère et la veine fémorale. (B) Séparation de l'artère et de la veine fémorale du tissu conjonctif. (C) Insertion et placement du cathéter. À l'aide de ciseaux de microdissection, une petite incision est pratiquée à travers le vaisseau à un angle de 45 degrés (en haut), des pinces à pointe fine sont placées dans l'incision et, à l'aide d'une autre paire de pinces, le cathéter est introduit dans le vaisseau (au milieu). A la fin de la mise en place de la suture du cathéter, le cathéter est en place (bas) ^[244].

Les animaux ont ensuite été placés dans un appareil stéréotaxique (Stoelting, Dublin, Irlande ; **Figure II-5 A. et B.**) avec leur température corporelle maintenue à 37 °C à l'aide d'un coussin chauffant homéothermique (Letica, Barcelone, Espagne). Après avoir pratiqué une incision cutanée de 2 cm de long avec un scalpel, la plaie est nettoyée avec du sérum physiologique, les bords des couches musculaires sont séparés et la surface du crâne est exposée. Si la surface du crâne saigne, le saignement est arrêté à l'aide d'une fine couche de cire. La craniotomie est réalisée en 2 différents points (un site d'implantation des biocapteurs et un site permettant de réaliser une vague de dépolarisation par « pin-prick », c'est-à-dire en exerçant une légère pression sur la surface de la dure-mère) de l'os frontal droit ou gauche à l'aide d'un foret de dentiste (**Figure II-5 C.**). La dure-mère est ensuite soigneusement

enlevée, au niveau de ces deux sites, pour exposer la surface du cerveau, tout en veillant à ne créer aucun saignement qui pourrait impliquer des artefacts ou des enregistrements non véridiques. A ce stade, la chirurgie est terminée et le rat est prêt pour l'implantation des deux biocapteurs. Avant l'implantation, une pseudo-référence Ag/AgCl est placée sur la surface du crâne et immergée dans une solution physiologique. Les enregistrements sont commencés au moins une heure après l'implantation pour assurer la stabilisation des courants électrochimiques de base de ces derniers. A la fin des expériences, tous les animaux sont euthanasiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (150 mg/kg ; Vétéquinol S.A., Luire, France).

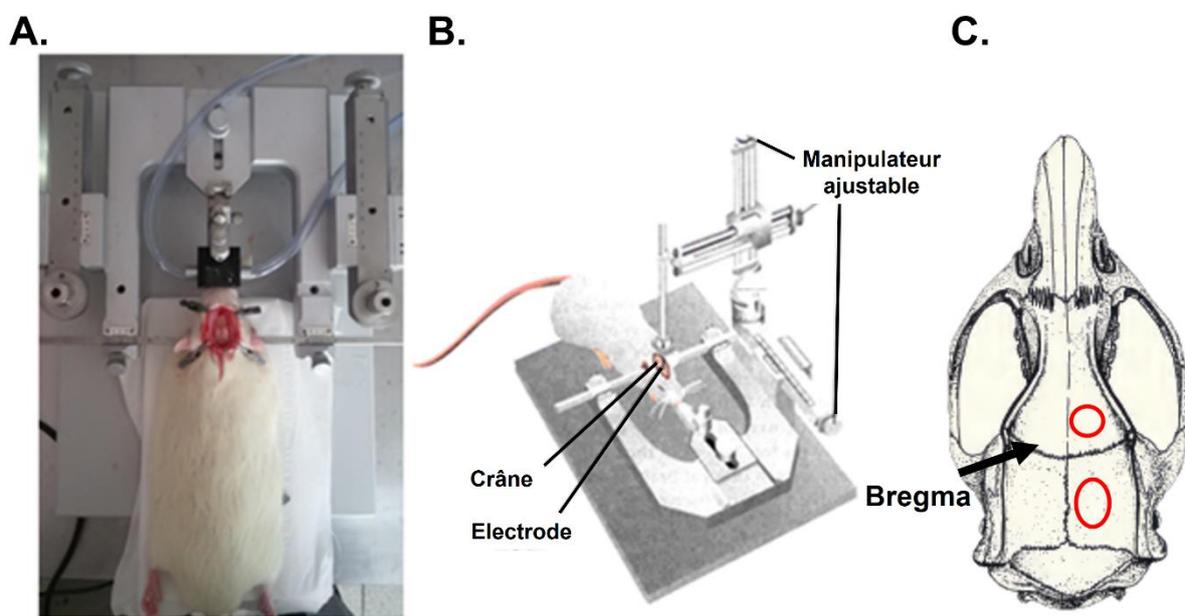


Figure II-5. Procédure de craniotomie.

(A.) Image d'un appareil stéréotaxique pendant une expérience *in vivo*. (B.) Appareil stéréotaxique. (C.) Zones des os frontaux où se pratique la craniotomie et principal repère sur le crâne du rat. Bregma est le point de repère le plus souvent utilisé comme point de référence pour la chirurgie stéréotaxique

Vague de dépolarisation corticale envahissante (Spreading Depolarization, SD).

Des vagues de dépolarisation ont été induites en piquant doucement la surface de la dure-mère avec une aiguille 18G émoussée. L'induction réussie d'un SD a été contrôlée en suivant la perfusion tissulaire locale au-dessus du site d'implantation des biocapteurs à l'aide d'un appareil de Laser Doppler Flowmetry (LDF). L'onde de la SD atteint généralement la zone d'implantation du capteur en 2 minutes, en accord avec sa vitesse de propagation habituelle dans un cortex sain.

Enregistrements *in vivo*.

Des biocapteurs basés sur des microélectrodes à fibre de carbone platinées et des biocapteurs de taille conventionnelle ont été implantés côte à côte avec un espacement habituel d'environ 1 - 2 mm. La zone d'implantation était située à -1,5 mm caudal et 1,5 mm latéral au Bregma, et à une profondeur de 1 mm, évitant ainsi la présence de gros vaisseaux sanguins sur la surface du pial (1,5 mm de front de bregma et 2 mm de profondeur pour les capteurs d'oxygène) (voir **Figure II-4 C.**).

Après la stabilisation des courants électrochimiques, les courants mesurés par les biocapteurs dans le cerveau ont été mesurés en moyenne sur 5 minutes d'enregistrement, puis ces valeurs ont été comparées à celles obtenues dans des solutions étalons de différentes concentrations et à la même température que le cerveau (*id est* 37°C) afin d'obtenir la concentration extracellulaire relative à ces courants.

Protocole *in vivo* pour le glucose. Une fois les biocapteurs implantés et stabilisés, le niveau de base des concentrations extracellulaires a été mesuré sur une durée moyenne de 5 minutes. Le temps de stabilisation varie d'une expérience à l'autre (entre 1 heure et 1 heure 30). Par la suite, une dose intraveineuse de 50 U/kg d'insuline, 1 mL *i.v.*, (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) a été injectée par le cathéter fémoral. La diminution du taux de glucose dans le cerveau est suivie à l'aide de la courbe d'enregistrement des biocapteurs implantés et par des mesures périodiques de la glycémie. Pour cela, l'extrémité de la queue du rat est coupée et la glycémie est mesurée, en utilisant du sang prélevé au niveau de la queue, à l'aide d'un système de mesure OneTouch® Vita™ (LifeScan, UK). Il est important de surveiller périodiquement la glycémie car si elle descend en dessous de 30 mg/dl, la vie du rat commence à être en danger. Lorsque la glycémie a diminué jusqu'à environ 20 % de sa valeur initiale (environ 200 mg.mL⁻¹), ce qui se produit après une période qui varie de 35 à 80 minutes, 1 mM de glucose a été injecté (1 mL, *i.v.*) afin d'estimer la diffusion du glucose à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Une fois la dose de glucose injectée à travers le cathéter, une élévation instantanée et rapide de la glycémie extracellulaire cérébrale est enregistrée. Après quelques minutes de l'injection de glucose (5 - 10 minutes), l'expérience se termine. Les biocapteurs sont extraits et immédiatement étalonnés *in vitro* en utilisant la même électrode de référence. Dans une deuxième série d'expériences, des vagues de dépolarisation ont été induites sur d'autres animaux après la stabilisation suivant l'implantation des biocapteurs.

Protocole *in vivo* pour la D-sérine et le glutamate. La D-sérine et le glutamate étant présents en faible concentration dans le cerveau, les concentrations extracellulaires ont été mesurées en soustrayant le courant enregistré par l'électrode contrôle (BSA) de celui enregistré par le biocapteur. L'appareil stéréotaxique ne possédant que deux bras manipulateurs, il a fallu procéder en plusieurs phases successives d'implantation sur des sites différents du cortex cérébral à chaque fois. D'abord, pour la D-sérine et le glutamate, le couple biocapteur (D-sérine ou glutamate)-électrode contrôle (BSA) basé sur les fibres de carbone platinées a été implanté. Après un temps de stabilisation (environ 1 heure), la concentration extracellulaire de base a été mesurée. Les biocapteurs ont ensuite été extraits du cerveau et plongés dans une solution tampon de phosphate salin (PBS) à température ambiante. Ensuite, la même procédure est réalisée avec le couple de biocapteurs-électrodes contrôle conventionnels. Enfin, seulement les biocapteurs avec la DAAO ont été implantés. Comme pour le glucose, la diffusion de la D-sérine à travers BHE a été évaluée par une injection intraveineuse de D-sérine. Une fois les biocapteurs stabilisés, une dose intraveineuse de 1,5 mL de D-sérine 1 g/kg du poids corporel a été injectée à travers le cathéter fémoral. Une lente élévation du niveau de la D-sérine dans le cerveau est détectée pendant environ 90 minutes. Les biocapteurs sont finalement extraits et étalonnés *in vivo* à l'aide de la même électrode de référence. De la même manière que le glucose, l'enregistrement de vagues de dépolarisation a été effectué sur d'autres animaux avec uniquement les biocapteurs sans les électrodes de contrôle pour la D-sérine et le glutamate.

Protocole *in vivo* pour le lactate et l'oxygène. Après stabilisation des biocapteurs implantés, la concentration interstitielle du lactate et de l'oxygène a été modifiée en faisant varier la fraction d'oxygène inspiré de 100 % à 21 % (air ambiant) par l'alimentation en gaz du dispositif d'anesthésie. Par la suite, des vagues de dépolarisation ont été induites.

Intégrité de la barrière hémato-encéphalique.

L'intégrité de la BHE a été évaluée à l'aide de bleu d'Evans injecté par voie intrapéritonéale en suivant la procédure de Seiffert *et al.* ^[245]. 5 mL du colorant (2 % dans 0,9 % de NaCl) a été injecté à la fin des expériences d'enregistrement de l'oxygène. Une heure après l'injection, l'animal a été perfusé en intracardiaque avec du sérum physiologique hépariné (10 U/mL) et du paraformaldéhyde à 4 % à froid avant décapitation et extraction du cerveau. Le cerveau a ensuite été trempé dans 4 % de paraformaldéhyde pendant 48h,

suivies d'une incubation dans 30 % de saccharose (VWR Chemicals, Radnor, USA) dans du PBS (0,01 M, pH 7,4) pendant 48h. Ensuite, des coupes coronales de 30 μm d'épaisseur ont été découpées dans un cryostat (Microm[©] MH 500 OM) à -20°C , montées sur des microlames et scellées avec Eukitt[©]. Des coupes cérébrales ont été observées à l'aide d'un scanner de lames, Axio Scan.Z1 (Zeiss), et les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

5. Statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type standard pour les données provenant de mesures *in vitro* et de moyenne \pm erreur-type de la moyenne (SEM) pour les mesures *in vivo*. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPAD Prism (logiciel GraphPAD, La Jolla, Canada). La comparaison statistique entre deux groupes de données a été effectuée en testant d'abord la normalité de leur distribution avec le test Shapiro-Wilk suivi d'un test t de Student non apparié si les données étaient normalement distribuées et avec la correction de Welch en cas de différence significative entre les variances des deux groupes, ou un test Mann-Whitney non paramétrique dans le cas contraire (seuil de significativité, $P < 0,05$). La taille de l'échantillon (n) était égale au nombre de biocapteurs construits selon le même protocole, ou au nombre d'animaux utilisés dans les expériences *in vivo* (dans lesquelles un nouveau biocapteur a été utilisé pour chaque expérience). Pour les expériences *in vivo*, l'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un test de Student t apparié ou d'un test de Wilcoxon, selon la normalité de la distribution des données (seuil de significativité, $P < 0,05$).

III. Fabrication et caractéristiques des biocapteurs

1. Fonctionnalisation de fibres de carbone

Pour améliorer la sensibilité des fibres de carbone à la détection du H_2O_2 et abaisser le potentiel d'oxydation du H_2O_2 et le potentiel de réduction de l'O_2 sur la surface de l'électrode, les fibres de carbone ont été platinées. Pour cela, une couche d'accroche de chrome (Cr) ou de titane (Ti), et une couche catalytique de Pt ont été déposées par dépôt

physique en phase vapeur (PVD), par évaporation ou par pulvérisation. L'ensemble de ces dépôts ont été réalisés au sein de la plateforme Nanolyon (INL). Les images obtenues au microscope électronique qui seront présentées ont été au sein de cette même plateforme.

Le dépôt direct de Pt sur des fibres de carbone sans couche d'accroche a donné des microélectrodes qui ont perdu presque toute leur sensibilité au H_2O_2 après fonctionnalisation avec de la poly-m-phénylènediamine (PPD) ($98,8 \pm 0,5$ % de perte par évaporation, $n = 10$; $85,6 \pm 14,5$ % de perte par pulvérisation, $n = 12$). La présence d'une couche d'accroche est donc apparue nécessaire pour stabiliser la couche de Pt à la fois d'un point de vue mécanique et du point de vue de ses propriétés catalytiques pour l'oxydation du H_2O_2 . Que ce soit par évaporation ou par pulvérisation, plusieurs métaux ont été explorés comme couche d'accroche afin de trouver une combinaison optimale. Le Cr et le Ti ont été les premiers candidats car ils sont communément employés comme couche d'accroche lors de dépôt de Pt. Un dépôt préliminaire de 5 nm d'alumine (Al_2O_3) a aussi été déposé par ALD suivi par un dépôt de Cr et de Pt (15 et 100 nm respectivement). Ce choix a été tenté car le dépôt par ALD présente l'avantage d'être très conforme sur des dispositifs dont la surface présente un fort ratio d'aspect comme nos fibres de carbone (**Figure II-7 A.**). De plus, une couche d'accroche d'alumine permettrait d'isoler électriquement la fibre de carbone. Bien que ce dernier type de dépôt ait donné des microélectrodes ayant des signaux plus stables et moins bruités de manière qualitative, elles ne présentaient pas les meilleures sensibilités à la détection du H_2O_2 . Les résultats en termes de sensibilité au H_2O_2 par unité de surface, avant la fonctionnalisation avec la PPD, de ces différentes combinaisons sont résumés dans la **Figure II-6 A.** Le dépôt Cr/Pt par pulvérisation ressort significativement plus sensible pour l' H_2O_2 , suivi du dépôt avec une couche préliminaire d' Al_2O_3 ($P = 0,045$). Après fonctionnalisation avec la PPD (**Figure II-6 B.**), toutes les fibres de carbone platinées ont vu leur sensibilité à l' H_2O_2 significativement diminuer (de -64 % à -91 % ; analyse de la variance à un facteur (également appelé *one-way ANOVA*) suivi d'un test *post-hoc* de Tukey, $F = 50,34$, $P < 0,0001$). Le dépôt optimal reste le Cr/Pt par pulvérisation (dépôt de Cr/Pt [pulvérisation] comparé à celui de Ti/Pt [évaporation], $P < 0,001$). Par évaporation, le dépôt Ti/Pt est légèrement supérieur en terme de sensibilité au H_2O_2 après fonctionnalisation avec la PPD comparé aux autres dépôts par évaporation ($P = 0,017$). Le dépôt par pulvérisation de Cr/Pt et le dépôt par évaporation du Ti/Pt sont donc les deux dépôts qui nous intéresseront par la suite.

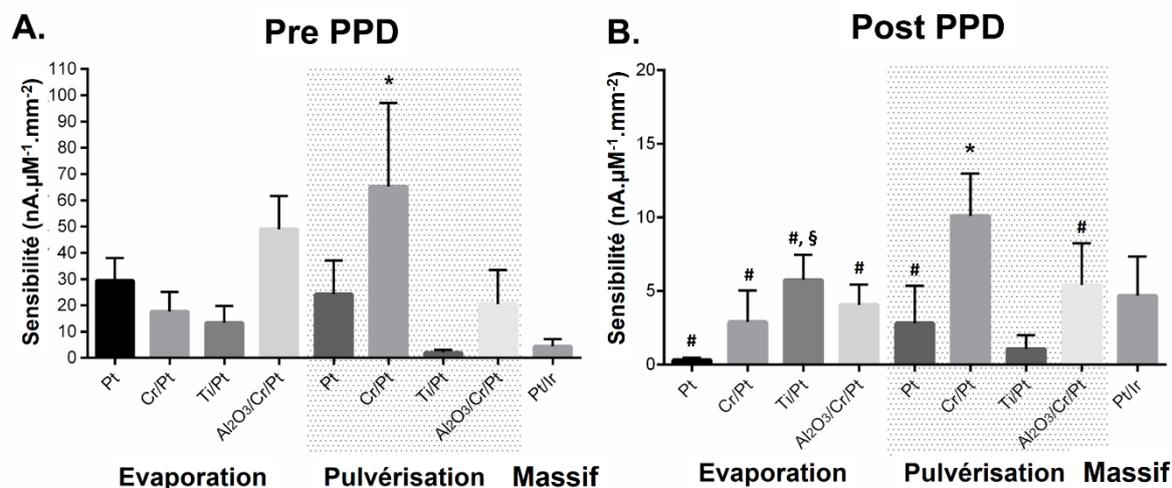


Figure II-6. Comparaison entre différentes métallisations et effets de la PPD sur la sensibilité au H₂O₂.

Deux procédés de dépôt ont été comparés, par évaporation et par pulvérisation. La sensibilité à l'H₂O₂ a été étudiée avant électro-dépôt de la couche de PPD (A.) et après (B.). La sensibilité des microélectrodes a été obtenue par une calibration *in vitro* réalisée dans une solution de H₂O₂ à 1 µM. La meilleure sensibilité a été obtenue avec des microélectrodes en fibre de carbone Cr-Pt. (#: indique une différence significative entre la sensibilité de post-fabrication et la sensibilité de post-fonctionnalisation avec la PPD de chaque ensemble de microélectrodes, *one-way ANOVA* suivi d'un test *post-hoc* de Tukey, F = 50,34, P < 0,0001 ; *: indique une différence significative entre la sensibilité des microélectrodes obtenues par pulvérisation de Cr-Pt et celles obtenues avec toutes les autres techniques, avant et après la fonctionnalisation des microélectrodes avec la couche de PPD (*one-way ANOVA* suivi d'un test de Tukey, F = 30,07, P < 0,0001). §: indique une différence significative entre la sensibilité des microélectrodes en Ti-Pt par évaporation et celles obtenues avec tous les autres dépôts par évaporation après fonctionnalisation avec la PPD (*one-way ANOVA* suivi d'un test *post-hoc* de Tukey, F = 22,02, P < 0,0001).

Une couche d'adhésion de Ti ou de Cr de 15 nm a donc été déposée avant de déposer 66 - 100 nm de Pt respectivement par pulvérisation ou par évaporation, et obtenu des microélectrodes ayant d'excellentes sensibilités au H₂O₂ (17,9 ± 4,4 nA.µM⁻¹.mm⁻² pour le dépôt Ti-Pt par évaporation, n = 12 ; 49,9 ± 4,4 nA.µM⁻¹.mm⁻² Cr-Pt par pulvérisation, n = 14). En utilisant ces dépôts, la perte de sensibilité après la biofonctionnalisation des microélectrodes a été réduite à 54 ± 16 % par évaporation (P < 0,0001, n = 10) et à 76,6 ± 10,8 % par pulvérisation (P < 0,001, n = 11). De plus, les fibres de carbone platinées ont été observées par microscopie électronique à balayage. Lorsque déposé par évaporation, le dépôt de Pt semble montrer au microscope électronique une plus faible rugosité avec des tailles de grain plus importantes que par un dépôt par pulvérisation et paraît légèrement moins

homogène (**Figure II-7 B.**). En addition, les deux types de dépôts ont montré une couche uniforme de Pt qui correspond à la structure striée sous-jacente de la fibre de carbone d'origine (**Figure II-7 C.**). Ces couches étaient stables et pouvaient être observées plusieurs jours après la fabrication des microélectrodes. Que ce soit par évaporation ou par pulvérisation, le dépôt de Pt a créé des surfaces rugueuses et striées (grâce à la structure des fibres de carbone). Cela implique donc une surface active potentiellement plus grande que celle de fils de Pt/Ir massifs. Les expérimentations *in vivo* de glucose et de lactate ont été réalisées avec des microélectrodes platinées par évaporation de Ti/Pt. Le glucose et le lactate étant présent en forte concentration extracellulaire, il n'était pas nécessaire d'avoir des biocapteurs extrêmement sensibles. Par la suite, les expérimentations *in vivo* pour la PO_2 , la D-sérine et le glutamate ont été réalisés à l'aide de microélectrodes métallisées par pulvérisation de Cr/Pt.

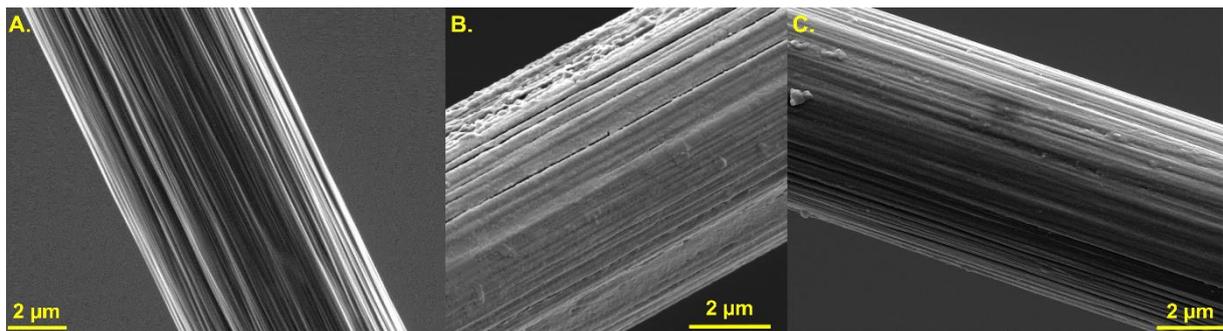


Figure II-7. Images au microscope électronique à balayage de dépôts PVD de Pt.

A. D'une fibre de carbone de 7 µm de diamètre (2,0 kV, MAG : 18,7 kx, WD : 8,94 mm).
B. D'une fibre de carbone platinée par évaporation (Ti-Pt ; [5,0 kV, MAG : 26,9 kx, WD : 9,27 mm]).
C. D'une fibre de carbone platinée par pulvérisation (Cr-Pt : $5,10^{-3}$ mbar, 111 W, 66 nm ; [10 kV, MAG : 21,1 kx, WD : 11,46 mm]).

2. Paramètres de métallisation par pulvérisation : Influence sur les propriétés électrochimiques

En dépit de leur excellente sensibilité, les dépôts de Cr/Pt par pulvérisation se sont montrés peu reproductible. En effectuant le dépôt de Cr et de Pt par pulvérisation dans les mêmes conditions en 4 sessions de dépôts différentes, la sensibilité à l' H_2O_2 a varié significativement entre $17,2 \pm 7,4 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ et $65,19 \pm 10,10 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ($P < 0,001$). Nous avons présumé qu'une modification des paramètres de métallisation du bâti de

pulvérisation cathodique a pu être introduite entre différentes les sessions de métallisation. En se basant sur les travaux de Slavcheva *et al.* [246], dans lesquels il est démontré que la pression, la puissance et l'épaisseur sont des paramètres importants afin d'obtenir une surface active plus grande et de meilleures propriétés catalytiques lors d'un dépôt de Pt par pulvérisation. Nous avons donc choisi d'explorer l'influence de ces paramètres sur nos fibres de carbone, le débit d'Ar a été gardé constant lors de tous les dépôts (50 sccm, « Standard Cubic Centimeters per Minute »). Dans un premier temps, l'épaisseur de la couche de Pt a été variée de 120 à 26 nm dans les mêmes conditions de dépôt : $5,10^{-3}$ mbar, 111W (**Figure II-8 A.**). Puis la puissance a été variée entre 111W, 100W et 90W (à $5,10^{-3}$ mbar, 60 nm ; **Figure II-8 B.**).

Pour une pression de $5,10^{-3}$ mbar, aucune différence significative n'a été observée entre les différentes épaisseurs (*one-way ANOVA* suivi d'un test *post-hoc* de Tukey, $F = 0,662$, $P = 0,582$, en excluant 26 nm) et les différentes puissances (*one-way ANOVA* suivi d'un test *post-hoc* de Tukey, $F = 2,441$, $P = 0,107$) explorées. Excepté pour une épaisseur de 26 nm, pour laquelle la sensibilité a chuté par rapport aux épaisseurs plus élevées, montrant ainsi l'existence d'une épaisseur minimale de Pt à déposer (*one-way ANOVA* suivi d'un test *post-hoc* de Tukey, $F = 5,109$, $P = 0,003$). La fabrication à la main des microélectrodes doit participer à la mauvaise reproductibilité de la fabrication et donc un écart-type assez important entre les différentes microélectrodes et les différents lots de fibres platinées. Cela rend donc difficile d'observer de faibles variations sur la sensibilité électrochimique des électrodes lors de modifications de paramètres de fabrication. Il a été seulement possible d'observer de manière qualitative qu'une certaine épaisseur optimale se situait aux alentours de 66 nm. Du côté de la puissance avec laquelle est pulvérisé le Pt, il nous a été impossible de répondre à l'impact de ce paramètre avec la gamme de puissance testée.

Par la suite, il a été question d'augmenter la pression de dépôt à $5,10^{-2}$ mbar. Afin de comparer avec la pression des dépôts précédents, il a été choisi de retenir une épaisseur de dépôt de 66 nm et une puissance de 90 W (car il a été difficile de déposer le Pt à des puissances plus élevées avec cette pression dans le bâti). Des sensibilités au H_2O_2 supérieures ont été obtenues, $31,1 \pm 10,1 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ($P = 0,002$; **Figure II-8 C.**). Bien que pour certaines fibres de carbone platinées dans ces conditions, une sensibilité proche de celle obtenue lors des premiers dépôts décrits au début de cette partie a réussi à être atteinte, et que l'on puisse penser que l'on ait réussi à retrouver des conditions de dépôt similaire à ces

premiers dépôts, il a été observé au microscope électronique que la structure du dépôt était totalement différente des précédentes obtenues à $5,10^{-3}$ mbar (**Figure II-9**). De plus, un problème de stabilité de la couche de Cr/Pt a été remarqué après une semaine de fabrication. Il a été observé au microscope électronique qu'à de nombreux endroits sur les fibres des craquelures de la couche métallique étaient apparues (**Figure II-10 A.**) ainsi qu'une sorte de corrosion de la fibre de carbone pour certaines (**Figure II-10 B.**). Dans le même sens, une chute de la sensibilité au H_2O_2 de $50,6 \pm 17,9$ % après moins d'une semaine suivant la fabrication des microélectrodes a été remarquée. La première hypothèse formulée pour expliquer cette instabilité dans le temps du dépôt fut un problème de propreté de la surface de la fibre de carbone. D'un autre côté, une seconde hypothèse fut que la couche de Pt déposée soit trop contrainte mécaniquement lorsque déposée dans ces conditions. Afin de tester la première hypothèse, nous avons donc réalisé une légère gravure préliminaire aux dépôts de Cr et de Pt à l'intérieur du bâti de pulvérisation à l'aide du plasma d'Ar. Ce procédé a été choisi car il présentait la capacité de nettoyer la surface de la fibre de carbone, et par la même occasion de la graver légèrement afin d'augmenter la surface d'accroche pour le Cr [247]. Des conditions pour cette gravure plasma ont donc été recherchées en modifiant la puissance et le temps de celle-ci (**Figure II-6 D.**). La gravure préliminaire aux dépôts de Cr/Pt à l'Argon avec une puissance de 17 W pendant 10 minutes a permis d'obtenir la meilleure sensibilité comparé au fait d'augmenter la puissance de gravure ou de l'effectuer sur une plus longue durée (*one-way ANOVA* suivi d'un test *post-hoc* de Tukey, $F = 24,44$, $P < 0,0001$). Mais la sensibilité obtenue par rapport aux dépôts sans gravure préliminaire n'est que très peu supérieure, $36,5 \pm 5,9$ nA. $\mu M^{-1}.mm^{-2}$ ($P = 0,201$). De même, la sensibilité au H_2O_2 après une semaine suivant la fabrication n'a pas été améliorée, $50,3 \pm 12,0$ % de perte de sensibilité. Malheureusement, la seconde hypothèse n'a pas pu être testée. En accord avec Slavcheva *et al.*, le fait d'augmenter la pression lors du dépôt de Pt entrainerait le dépôt d'une couche plus cristallisée, plus rugueuse et plus poreuse. Cela pourrait justifier le caractère trop contraint et la fragilité mécanique dans le temps du Pt déposé à une pression de $5,10^{-2}$ mbar. De plus, la morphologie striée et cylindrique des fibres de carbone doit accentuer cet effet.

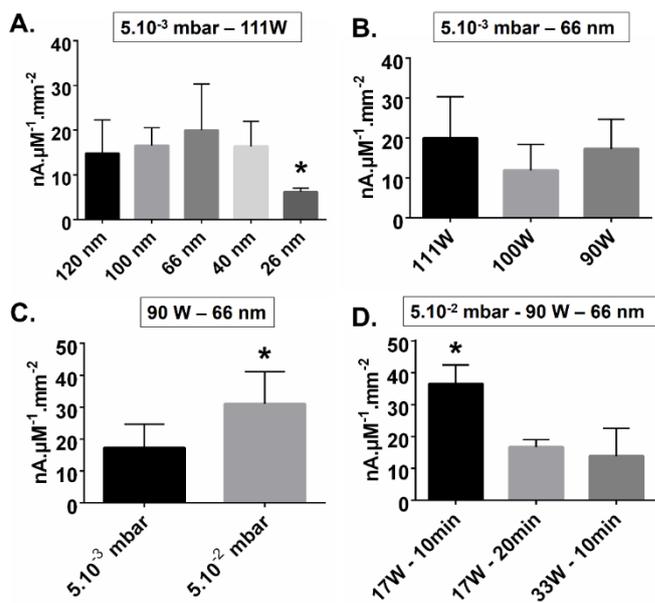


Figure II-8. Comparaison de la sensibilité au H₂O₂ par rapport aux conditions de dépôt par pulvérisation.

Différents paramètres du dépôt par pulvérisation du Pt ont été étudiés **A.** Avec une pression dans le bâti de pulvérisation de 5,10⁻³ mbar et une puissance de dépôt de 111 W, l'épaisseur de Pt déposée a été variée de 120 nm à 26 nm. **B.** Avec une pression de 5,10⁻³ mbar et une épaisseur de 66 nm de Pt, la puissance de déposition a été variée entre 111 W et 90 W. **C.** Avec une puissance déposition de 90 W et une épaisseur de Pt déposée de 66 nm, la

sensibilité au H₂O₂ a été comparée entre une pression dans le bâti de 5,10⁻³ mbar et 5,10⁻² mbar. **D.** Un nettoyage préliminaire des fibres de carbones a été réalisé à l'aide d'une gravure RIE à l'argon au sein du bâti de pulvérisation. Le temps et la puissance de celui-ci ont été étudiés. (* : Différence significative comparée aux autres conditions de dépôts).

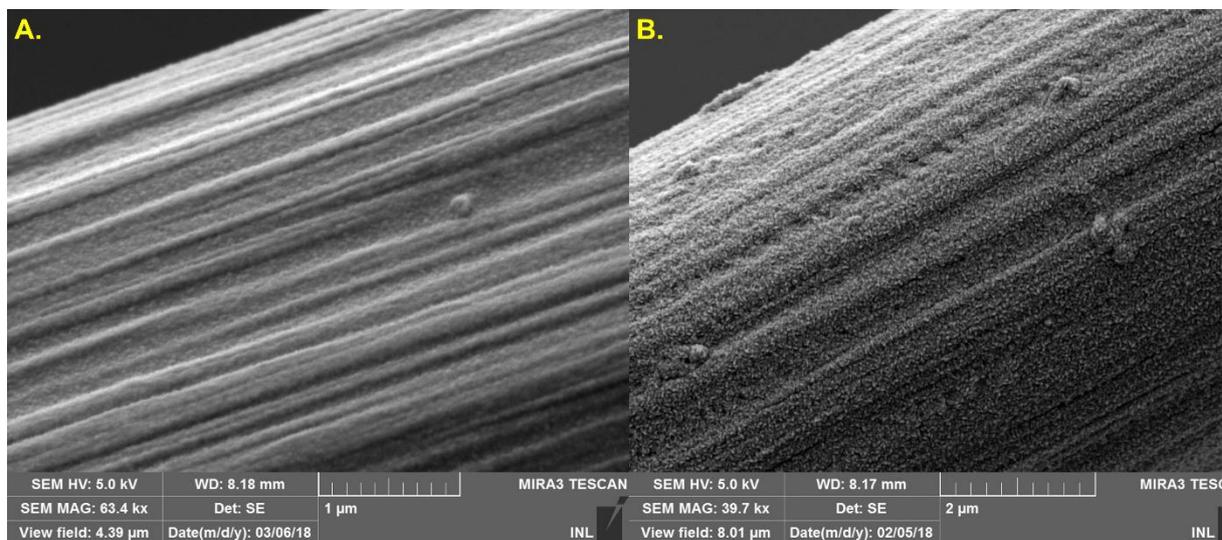


Figure II-9. Images au microscope électronique à balayage de dépôts par pulvérisation en fonction de la pression.

Ces images ont été prises après un dépôt de Cr-Pt par pulvérisation avec une pression de 5,10⁻³ mbar (**A.**) et de 5,10⁻² mbar (**B.**). Les deux dépôts ont été réalisés avec une puissance de 90 W et une épaisseur de 66 nm de Pt. On peut noter une différence au niveau de la morphologie du Pt déposé. A 5,10⁻³ mbar, la couche de Pt semble qualitativement plus lisse et rugueuse. Alors que le Pt déposé à 5,10⁻² mbar semble davantage se cristalliser, l'augmentation de la pression semble donc accentuer un dépôt des atomes de Pt en colonne et avec des vides plus grands entre elles.

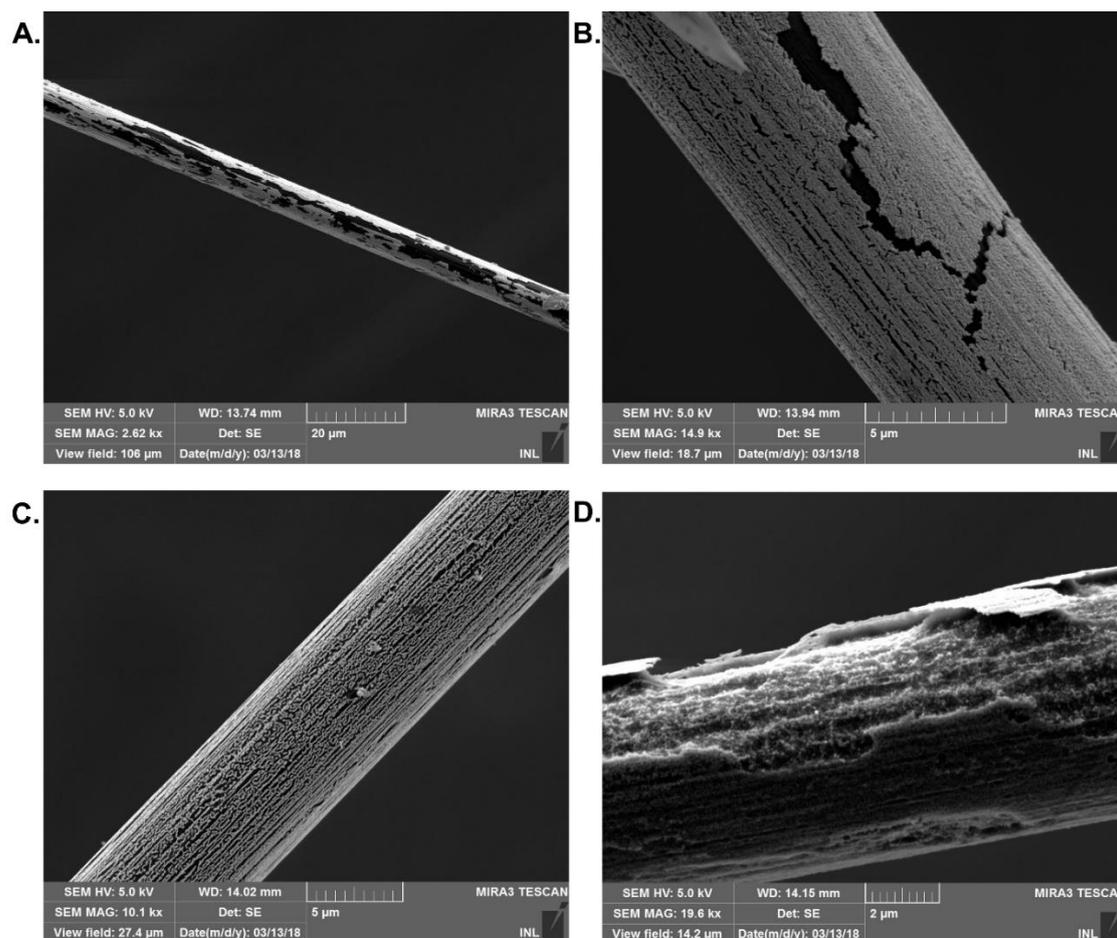


Figure II-10. Images au microscope électronique à balayage de microélectrodes après plusieurs oxydations de H₂O₂.

Les microélectrodes fabriquées avec des fibres de carbone platinées (Cr-Pt ; $5,10^{-2}$ mbar, 90 W, 66 nm) ont été observées au microscope électronique après une semaine suite à une calibration au H₂O₂. Une chute de leur sensibilité a été observée ainsi que des craquelures de la couche de Pt (A. et B.) qui pourrait être dû à une oxydation de la couche de Cr (C. et D.).

Par rapport à l'évaporation, le dépôt par pulvérisation a montré une faible reproductibilité en termes de performance électrochimique du Pt déposé. Des écarts dans les paramètres de dépôt par pulvérisation semblent être l'origine de ce problème. Une influence significative sur la sensibilité des microélectrodes au H₂O₂ a été observée en modifiant la pression avec laquelle est réalisé le dépôt de Pt par pulvérisation et en effectuant un nettoyage préliminaire de la surface des fibres de carbone. De plus, un effet de la puissance et de l'épaisseur a aussi influencé la sensibilité des fibres à l'H₂O₂. Cependant, la fabrication à la main a probablement induit une variabilité accrue de la sensibilité des microélectrodes. Ainsi il était difficile de détecter finement les effets des paramètres de dépôt par pulvérisation sur la sensibilité des fibres à l'H₂O₂. Pour conclure, il a été déterminé que les dépôts de Ti/Pt

par évaporation représentaient les conditions de dépôt optimales. Leur sensibilité était comparable à des microélectrodes fabriquées à partir de fils de platine/iridium massifs, et ils ont présenté une bonne reproductibilité.

3. Propriétés électrochimiques

La suite des résultats a été obtenue avec des dépôts de Ti/Pt par évaporation et de Cr/Pt par pulvérisation (parmi les lots de microélectrodes qui présentaient de bonnes sensibilités au H₂O₂). Nous avons testé électrochimiquement ces surfaces de Pt par voltamétrie cyclique (-0,2 à 1,0 V vs Ag/AgCl, 100 mV.s⁻¹) dans une solution de PBS (0,01 M, pH 7,4) avec 80 μM de H₂O₂. Comme attendu, les fibres de carbone ont produit de très petits courants redox pour l'H₂O₂ : l'oxydation du H₂O₂ s'est produite à des potentiels supérieurs à 0,8 V, et aucun courant de réduction n'a été détecté dans cette plage de potentiel (**Figure II-11 A.**). En revanche, les fils de Pt/Ir massifs présentaient une nette oxydation du H₂O₂ au-dessus de 0,2 V et une réduction en dessous de 0,2 V, ce qui est conforme aux rapports précédents ^[74,239]. Les voltammogrammes cycliques obtenus à l'aide de fibres de carbone platinées ont montré un modèle d'oxydoréduction similaire aux fils Pt/Ir. Les courants redox H₂O₂ étaient 17 fois plus importants avec les fibres de carbone platinées qu'avec ces fils de platine massif. La sensibilité respective des fils de Pt/Ir (75 μm-diamètre) et des fibres de carbone platinées (7 μm-diamètre) au H₂O₂ était respectivement de $4,37 \pm 2,78 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ (n = 10) et $49,85 \pm 4,44 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ (n = 14). Comme il a pu être observé dans la partie précédente, cela pourrait s'expliquer par le fait que la pulvérisation cathodique ait créé des surfaces de Pt plus rugueuses et poreuses, et donc avec une surface active potentiellement plus grande que des fils de Pt/Ir massifs. Cependant, les fibres de carbone platinées ont montré une diminution de leur sensibilité au H₂O₂ après la biofonctionnalisation avec la PPD ($-76,6 \pm 10,8 \%$, P < 0,0001) alors que cette diminution n'a pas été constatée sur les microélectrodes construites à partir de fils Pt commerciaux ($+11,6 \pm 22,3 \%$, P = 0,806, n = 10). La limite de détection de H₂O₂ après fonctionnalisation avec la PPD était respectivement de $10,2 \pm 2,9 \text{ nM}$ et $16,7 \pm 13,7 \text{ nM}$ (3 fois le bruit ; n = 6). Dans l'ensemble, la sensibilité au H₂O₂ après la fonctionnalisation avec la PPD était significativement plus sensible avec des fibres de carbone platinées par pulvérisation ($11,21 \pm 2,74 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$), qu'avec des fils Pt commerciaux ($5,11 \pm 2,38 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$; P < 0,0001 ; n = 10). D'un autre côté, la sensibilité des fibres de carbone platinées par

évaporation ne présentaient pas de différence significative avec les fils commerciaux ($6,06 \pm 1,72 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$; $P = 0,118$; $n = 16$). Les fibres de carbone platinées présentaient également d'excellentes sensibilités à la réduction de l' O_2 de $0,096 \pm 0,026 \text{ pA} \cdot \text{mmHg}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ ($n = 5$) avec une limite de détection de $0,1 \pm 0,02 \text{ mmHg}$. Ainsi, malgré leur forme cylindrique (inhabituelle dans la technologie des bio-MEMs), les fibres de carbone peuvent être platinées avec succès pour permettre la détection du H_2O_2 et de l' O_2 dans la fenêtre électrochimique de $-0,5$ à $1,0 \text{ V}$ typiquement utilisée pour l'électrochimie *in vivo*.

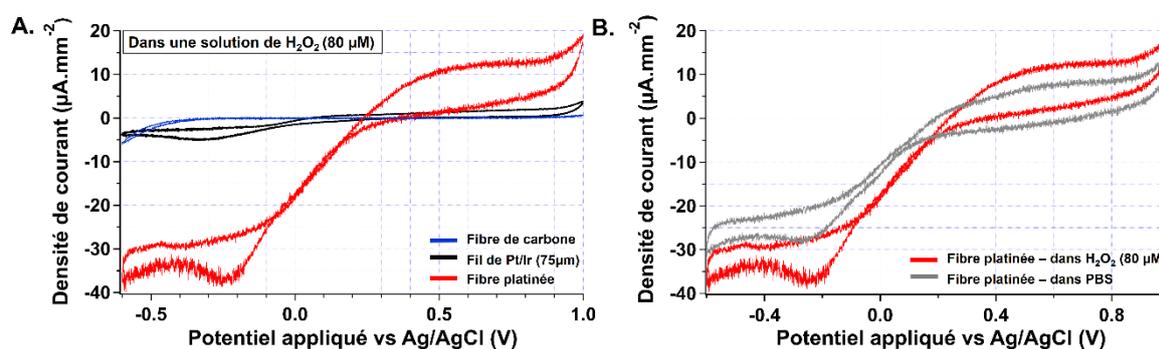


Figure II-11. Propriétés électrochimiques d'une fibre de carbone platinée.

A. Exemple de voltammogrammes cycliques obtenus dans une solution de H_2O_2 ($80 \mu\text{M}$, PBS pH 7,4) avec une fibre de carbone nue ($7 \mu\text{m}$ -diamètre, trace bleue), une fibre de carbone platinée ($7 \mu\text{m}$ -diamètre, trace rouge), et une fibre de Pt/Ir ($75 \mu\text{m}$ -diamètre, trace bleue), montrant un potentiel inférieur d'oxydation et de réduction de H_2O_2 avec la fibre de carbone platinée. Notons la forte densité de courant que montrent les fibres de carbone platinées. **B.** Exemple de voltammogrammes cycliques d'une même fibre de carbone platinée dans une solution de PBS ($0,01 \text{ M}$, pH 7,4 ; trace grise) et dans une solution de PBS avec $80 \mu\text{M}$ de H_2O_2 .

4. Obtention de biocapteurs par immobilisation d'enzymes

Les microélectrodes à base de fibres de carbone platinées ont permis d'obtenir des dispositifs hautement miniaturisés pour une biocompatibilité accrue des biocapteurs enzymatiques. Les biocapteurs de glucose, de lactate et de D-sérine étaient constitués d'une couche de poly-phénylènediamine électro-déposée, d'une couche de mélange immobilisé d'enzymes-BSA, et en raison des fortes concentrations *in vivo* pour le glucose et le lactate, des couches de polyuréthane ont été déposées pour limiter la diffusion du substrat et augmenter la gamme linéaire de l'enzyme. Ces couches fonctionnelles étaient déposées avec une épaisseur d'environ 2 à $3 \mu\text{m}$ et les biocapteurs électrochimiques obtenus au final avaient un diamètre extérieur moyen de 11 à $13 \mu\text{m}$ (**Figure II-12 A.**). Les étalonnages *in vitro* ont

révélé une relation courant-concentration typique qui suivait une cinétique de type Michaelis-Menten caractérisée par une plage linéaire initiale et un plateau (exemple d'étalonnage du lactate à la **Figure II-12 B.**). La constante de Michaelis-Menten, K_m^{App} , a été déterminée en suivant la relation suivante (**Chapitre I – Eq. (16)**) :

$$I(S) = \frac{I_m \cdot [S]}{K_{mapp} + [S]}$$

Les biocapteurs ultra miniaturisés présentaient:

- Une sensibilité pour le **glucose** de $0,55 \pm 0,21 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, une limite de détection de $3,08 \pm 0,88 \mu\text{M}$ et un K_m^{App} apparent de $4,49 \pm 1,277 \text{ mM}$ ($n = 7$) ;
- Une sensibilité pour le **lactate** de $0,20 \pm 0,04 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ avec une limite de détection de $1,16 \pm 0,26 \mu\text{M}$ et un K_m^{App} de $2,60 \pm 1,13 \text{ mM}$ ($n = 7$) ;
- Une sensibilité pour la **D-sérine** de $1,70 \pm 0,49 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ avec une limite de détection de $300 \pm 80 \text{ nM}$ et un K_m^{App} de $0,71 \pm 0,33 \text{ mM}$ ($n = 7$) ;
- Une sensibilité pour le **glutamate** de $3,91 \pm 0,54 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ avec une limite de détection de $287 \pm 120 \text{ nM}$ et un K_m^{App} de $0,16 \pm 0,009 \text{ mM}$ ($n = 3$) ;

Des biocapteurs plus conventionnels faits d'un fil de Pt/Ir massif commercial avec un diamètre de $75 \mu\text{m}$ ont également été construits. Une fois biofonctionnalisés, leur diamètre externe étaient d'environ $80\text{-}90 \mu\text{m}$. Ces biocapteurs de plus grande taille présentaient une cinétique de Michaelis-Menten similaire et des valeurs K_m^{App} similaires, mais des sensibilités plus faibles :

- $0,26 \pm 0,11 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ pour le **glucose** [$P = 0,008$, $n = 7$] ;
- $0,14 \pm 0,03 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ pour le **lactate** [$P = 0,0105$, $n = 7$] ;
- $1,13 \pm 0,35 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ pour la **D-sérine** [$P = 0,045$, $n = 6$] ;
- $0,32 \pm 0,11 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ pour le **glutamate** (n trop faible pour des statistiques fiables).

Ainsi, les fibres de carbone platinées ont permis la fabrication de biocapteurs électrochimiques de diamètre inférieur à $15 \mu\text{m}$, et donc inférieur à la distance moyenne entre les capillaires cérébraux ^[201].

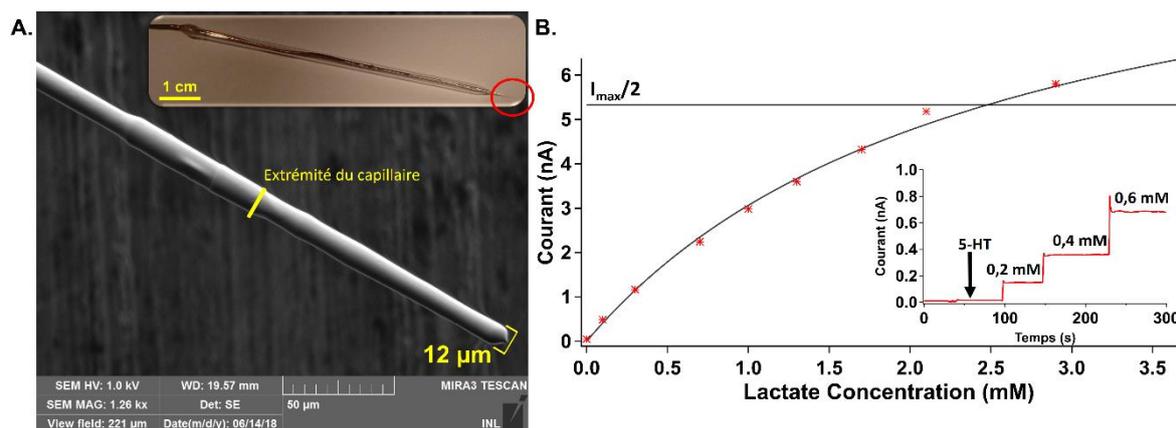


Figure II-12. Biofonctionnalisation et calibration.

A. Image en microscopie électronique d'une microélectrode ultra miniaturisée biofonctionnalisée avec des couches d'enzyme et de polyphénylènediamine, et présentant un diamètre externe final de 12 μm. L'encadré présente une photographie du biocapteur dans sa globalité (fil en cuivre, capillaire en verre et la partie implantable entourée en rouge). **B.** Relation courant-concentration et l'ajustement de Michaelis-Menten pour un biocapteur de lactate. L'encadré montre un exemple de calibration avec le test de sélectivité ne montrant aucune détection de 5-HT et les étapes suivantes avec des sauts de 0,2 mM de lactate.

IV. Impact de la miniaturisation, *in vivo*

1. Impact de l'implantation

L'implantation d'une sonde dans le cerveau entraîne une déformation des tissus, une déchirure et un cisaillement de la matrice extracellulaire et des prolongements cellulaires, ainsi qu'une perturbation de la BHE. Cette lésion initiale peut conduire à une réaction aux corps étrangers et ainsi à l'isolement du capteur dans une capsule de collagène [62]. Lors de l'implantation dans le parenchyme, la sonde produit typiquement une déformation de la surface du cerveau suivie d'une rupture de la surface de la pie-mère. Une telle déformation mécanique de la surface du cerveau conduit typiquement à la génération d'une vague de dépolarisation corticale. Il est intéressant de noter que l'implantation de nos biocapteurs électrochimiques n'a pas provoqué de déformation de la surface du cerveau. Dans le but d'observer objectivement la perturbation des tissus cérébraux lors de l'implantation, nous avons enregistré l'activité cérébrale par électrocorticographie en courant continu et la mesure du débit sanguin par le biais d'un laser Doppler afin de détecter les dépolarisations envahissantes (« Spreading Depolarization », SD) potentiellement générés par l'implantation de la sonde. Les SD ont été détectés de façon constante lors de l'implantation de biocapteurs électrochimiques conventionnels : l'ECOG présentait une dépolarisation d'une durée de

moins d'une minute, couplée à une vague de dépression de l'activité neuronale d'environ 5 minutes, alors que le laser doppler détectait une onde hyperhémique caractérisée par une augmentation de 85 % du débit sanguin cérébral local (**Figure II-13 A.**). Par contre, ces événements neurophysiologiques n'ont pas été détectés lors de l'implantation de biocapteurs à microélectrodes ultra miniaturisées, ce qui indique que nos dispositifs ne produisaient pas de SD corticale (**Figure II-13 B.**).

De plus, nous avons testé l'intégrité de la BHE avec une injection intrapéritonéale d'Evans Blue, un colorant qui se lie à l'albumine sérique et ne peut pas se diffuser dans le parenchyme cérébral lorsque la BHE est intacte ^[245]. La coloration de l'Evans Blue a révélé une perturbation de la BHE autour du site d'implantation des capteurs d'oxygène (**Figure II-13 C.**), alors que le site d'implantation était indétectable aux alentours de nos microélectrodes ultra miniaturisées (**Figure II-13 D.**). Dans l'ensemble, l'absence de perturbation détectable de la BHE et l'absence de SD lors de l'implantation indiquent que nos biocapteurs électrochimiques ultra miniaturisés ont un impact moins perturbateur sur le parenchyme cérébral par rapport aux dispositifs conventionnels.

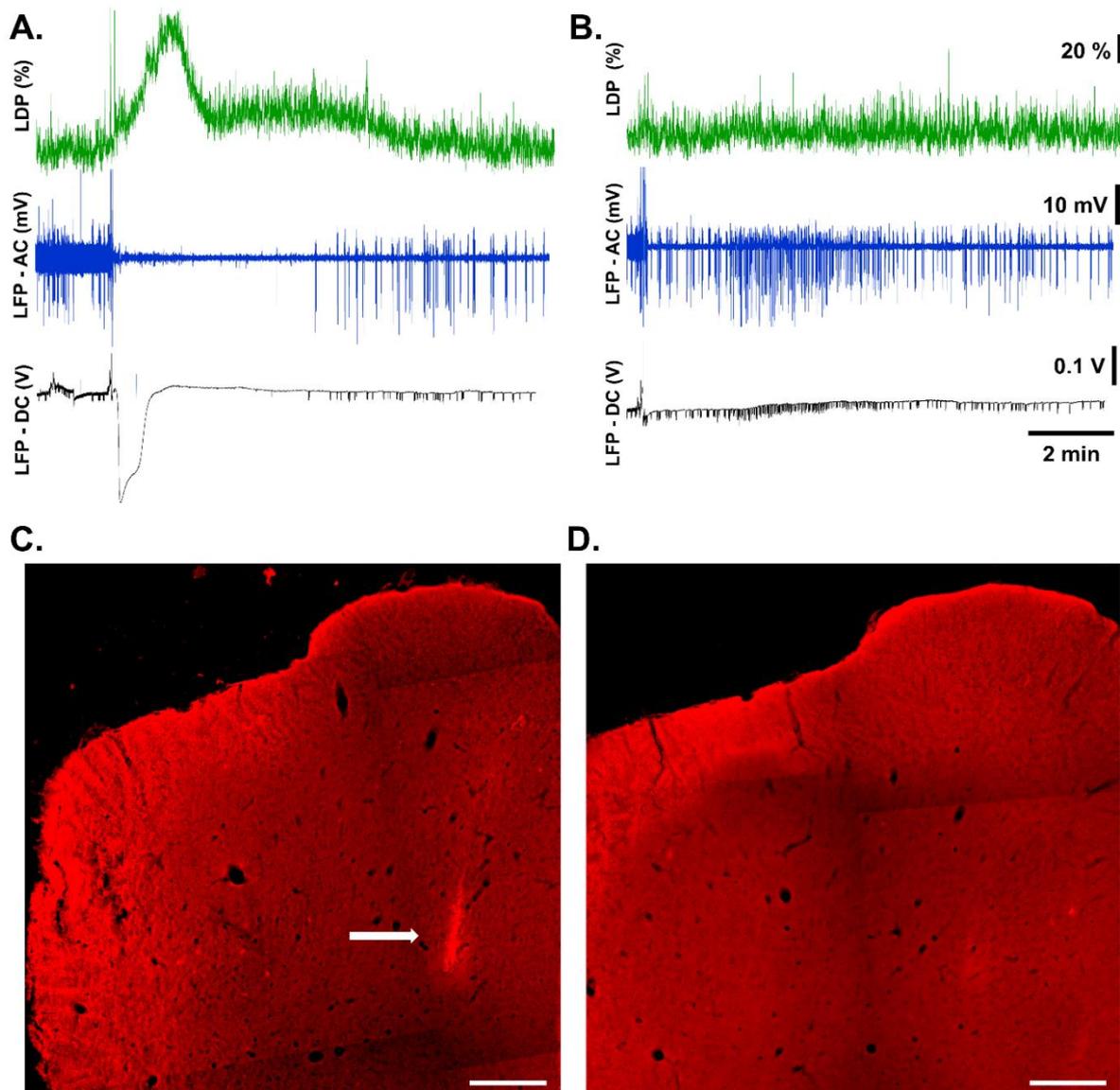


Figure II-13. Évaluation de l'impact physiologique de l'implantation d'un biocapteur. Réponses électrocorticographiques AC (trace bleue) et DC (trace noire) et enregistrement de la perfusion cérébrale par laser Doppler (traces vertes) au cours de l'implantation d'un biocapteur avec un diamètre extérieur de 80-90 µm (A.) et un biocapteur ultra miniaturisé (B.). Notez la présence d'une SD évoquée par l'implantation d'un grand biocapteur, mais pas par un biocapteur ultra miniaturisé. L'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est évaluée par le marquage Evans Blue (injection i.p.) 2h après l'implantation d'une fibre optique commerciale (250 µm de diamètre) (C.) ou d'une microélectrode ultra miniaturisée dans le cortex frontal (D.). Notez la perturbation de la BHE autour de la fibre optique commerciale (flèche blanche) mais pas autour du biocapteur ultra miniaturisé. Barre d'échelle blanche, 0,5 mm.

2. L'oxygène

La PO₂ basale dans le cortex a été détectée par une microélectrode ultra miniaturisée (fibres de carbone platinées) et par une sonde optique commerciale de 250 µm de diamètre extérieur avec un espacement de 1 à 2 mm entre les deux capteurs. La FiO₂ a été changée de 100 % (oxygène pur inspiré), à 21 % (air ambiant), et de nouveau à 100 % (**Figure II-14 A.**). La PO₂ était constamment plus faible lorsque mesurée par nos microélectrodes ultra miniaturisées (43,2 ± 0,2 mmHg à 100 % O₂, 11,9 ± 0,1 mmHg dans l'air et 34,8 ± 0,3 mmHg revenant à 100 % O₂) par rapport aux fibres optiques plus grandes (92,3 ± 0,4 mmHg à 100 % O₂, 19,8 ± 0,2 mmHg dans l'air, 79,2 ± 0,4 mmHg revenant à 100 % O₂). Cette différence de PO₂ était significative dans les trois conditions (P = 0,002, P = 0,045, P = 0,001 respectivement ; n = 7 ; **Figure II-14 C.**).

Afin de tester la réponse de nos capteurs aux changements transitoires rapides de la PO₂, nous avons induit des SD dans le cortex. Les SD induisent une réponse multiphasique caractérisée par une première phase de diminution de la PO₂ correspondant à la forte demande métabolique générée par la dépolarisation, suivie d'une seconde phase d'augmentation de la PO₂ liée à la vasodilatation des capillaires cérébraux ^[248]. Le schéma de PO₂ peut parfois être décrit avec une ou deux phases ultérieures supplémentaires correspondant à la constriction des vaisseaux sanguins et à la stabilisation de la perfusion sanguine cérébrale à une valeur inférieure à sa valeur initiale ^[249]. Les deux capteurs ont détecté les deux premières phases avec des formes très différentes. La diminution initiale de la PO₂ (**Figure II-14 B.**, phase I) était plus nette avec des microélectrodes ultra miniaturisées qu'avec la fibre optique. La diminution en pourcentage entre la ligne de base et le pic de diminution était de 74,8 ± 6,0 % pour les grandes sondes et de 87,1 ± 4,3 % pour les petites (P = 0,001 ; n = 7 ; **Figure II-14 D.**). Ensuite, la récupération de la PO₂ vers sa valeur initiale a été plus rapide avec de petits biocapteurs par rapport à des biocapteurs conventionnels. Le pourcentage d'augmentation de la PO₂ pendant la phase II était de 85,1 ± 9,8 % (par rapport à la ligne de base initiale) pour les petits capteurs et de 54,9 ± 5,9 % pour les grands capteurs (P = 0,003 ; n = 7 ; **Figure II-14 E.**). Il est intéressant de noter que la PO₂ est revenue à sa valeur de référence initiale au cours de la phase II, alors qu'elle est demeurée nettement inférieure à son niveau initial lorsqu'elle a été mesurée par des fibres optiques plus volumineuses. A la fin de la phase II, les fibres optiques présentaient une PO₂ inférieure de 19,86 ± 9,9 % par rapport à la ligne de base et les biocapteurs ultra miniaturisés 2,05 ± 22,0

% ($P = 0,057$). Dans l'ensemble, les microélectrodes ultra miniaturisées ont détecté des changements plus marqués de la PO_2 en réponse aux SD et des changements plus importants de la PO_2 par rapport aux sondes plus grandes.

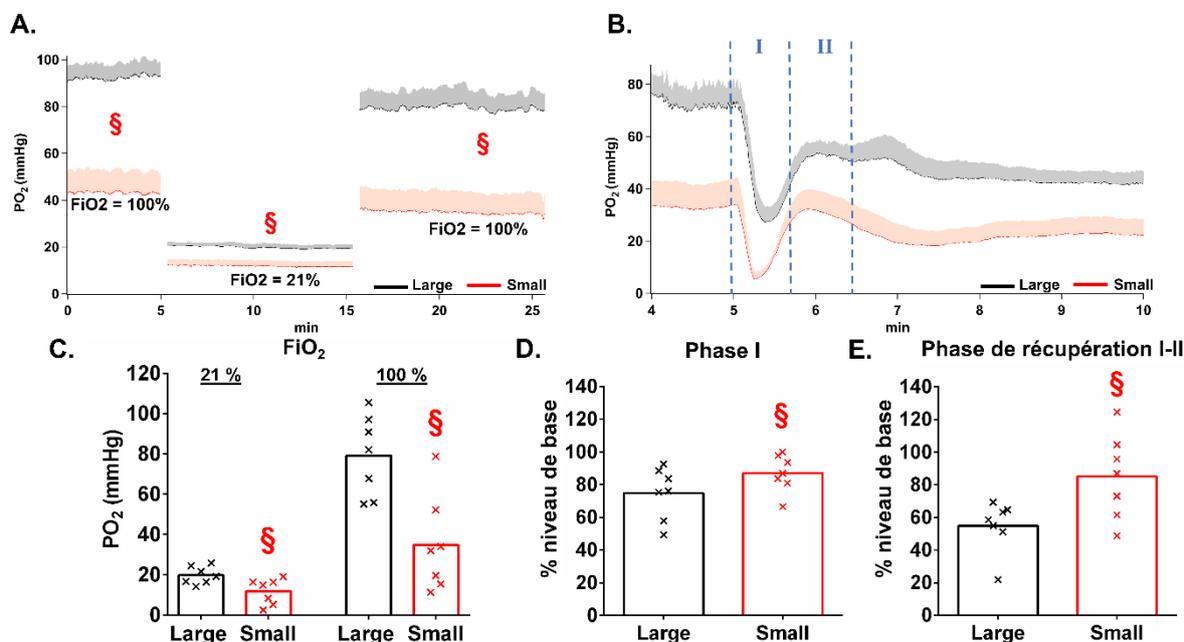


Figure II-14. Mesures de la PO_2 *in vivo*.

Mesures *in vivo* de la PO_2 basale avec une FiO_2 de 21 % et de 100 % (A.). Détection de la PO_2 pendant l'induction d'une SD dans le cortex (B.). Les réponses de la PO_2 aux SD sont analysées en quatre phases distinctes séparées par des lignes bleues en pointillés. Les biocapteurs ultra miniaturisés (7 μm de diamètre ; trace rouge) détectent des niveaux de PO_2 plus faibles que les larges fibres optiques commerciales (250 μm de diamètre ; trace noire) (La moyenne est représentée par une ligne continue et la SEM par un ombrage de couleur claire ; $n = 7$). (C.) Niveau basal moyen de PO_2 inférieur à 100 % ou 21 % de FiO_2 . (D.) Pourcentage de diminution de la PO_2 pendant la phase initiale de la réponse de la PO_2 aux SD (phase I). (E.) Pourcentage de récupération de la PO_2 de la phase I à II (% de la PO_2 initiale de référence). (Moyenne et écart-type standard ; § : différence significative ; $n = 7$).

3. Le glucose

Nous avons ensuite testé des biocapteurs enzymatiques à partir de nos microélectrodes ultra miniaturisées *in vivo* et les avons comparés à des microélectrodes plus grandes (80-90 μm de diamètre extérieur) pour la détection du glucose, du lactate et de la D-sérine dans le cortex. La détection du glucose a été effectuée au travers de trois conditions distinctes : (1) quantification de la concentration extracellulaire de glucose de base, (2) de la diffusion du glucose à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Figure II-15 A.1), et

(3) des changements transitoires rapides de glucose extracellulaire évoqués par une SD (**Figure II-15 B.1**). Après 1h de stabilisation suivant l'implantation, les deux biocapteurs ont détecté des niveaux de glucose similaires et stables dans le cortex. Il n'y avait qu'une tendance non significative pour des niveaux supérieurs de glucose détectés par les biocapteurs ultra miniaturisés (biocapteurs ultra miniaturisés : $1,62 \pm 0,29$ mM, biocapteurs conventionnels : $1,25 \pm 0,11$ mM ; $P = 0,246$; $n = 18$; **Figure II-15 A.2**). Cependant, il y avait une nette différence dans la vitesse de diffusion du glucose à travers la BHE. Elle a été estimée en injectant 1 mmol de glucose par voie intraveineuse après que sa concentration ait été abaissée par une injection d'insuline (50 U/kg). Dans ces conditions, la glycémie avait diminué à 35-40 mg.dL⁻¹ et le niveau interstitiel de glucose dans le cerveau avait diminué à environ $0,63 \pm 0,15$ mM (estimé par d'ultra petits biocapteurs) ou $0,44 \pm 0,07$ mM (estimé par des biocapteurs conventionnels ; $P = 0,083$; $n = 11$). L'injection intraveineuse de glucose a provoqué une augmentation rapide de la glycémie interstitielle cérébrale. Nous avons estimé sa vitesse de diffusion à travers la BHE comme étant l'augmentation en $\mu\text{M.s}^{-1}$ de la concentration extracellulaire de glucose au cours des 10 premières secondes suivant l'injection. La pente de l'augmentation de la concentration de glucose était de $14,83 \pm 2,93$ $\mu\text{M.s}^{-1}$ pour les biocapteurs conventionnels et de $6,50 \pm 1,68$ $\mu\text{M.s}^{-1}$ pour les petits biocapteurs ($P = 0,01$; $n = 7$; **Figure II-15 A.3**). Cette augmentation reflète probablement une perturbation locale de la BHE autour des biocapteurs conventionnels, comme l'indique déjà la coloration par diffusion de l'Evans Blue.

La réponse glycémique aux SD était également différente lorsqu'elle était évaluée à l'aide d'un biocapteur ultra petit par rapport à un large biocapteur. Le glucose a diminué en réponse aux SD comme déjà décrit ^[206]. Cependant, la diminution était davantage prononcée autour du biocapteur ultra miniaturisé. La concentration extracellulaire minimale de glucose après induction SD était de $135,1 \pm 64,7$ μM pour les biocapteurs ultra miniaturisés, mais de $292,6 \pm 52,1$ μM pour les biocapteurs conventionnels ($P = 0,042$; $n = 7$; **Figure II-15 B.2**). De plus, la durée jusqu'à ce que la glycémie atteigne 80 % de sa valeur de référence était de 518 ± 72 s avec les biocapteurs ultra miniaturisés et de 392 ± 54 s avec les biocapteurs conventionnels ($P = 0,017$; $n = 7$; **Figure II-15 B.3**). Il est possible que cette différence dans les changements rapides du glucose au cours de la SD soit due à une vitesse de diffusion du glucose plus lente à travers la BHE, et donc à une moins grande disponibilité du glucose autour biocapteur ultra miniaturisé, ou à une plus grande consommation de glucose autour

du biocapteur ultra miniaturisé grâce à la préservation. Nos résultats ne permettent pas de trancher entre ces deux hypothèses mais confirment néanmoins qu'une nette différence dans le profil des changements de la glycémie en réponse aux SD existe en fonction de la taille du biocapteur utilisé pour la détection.

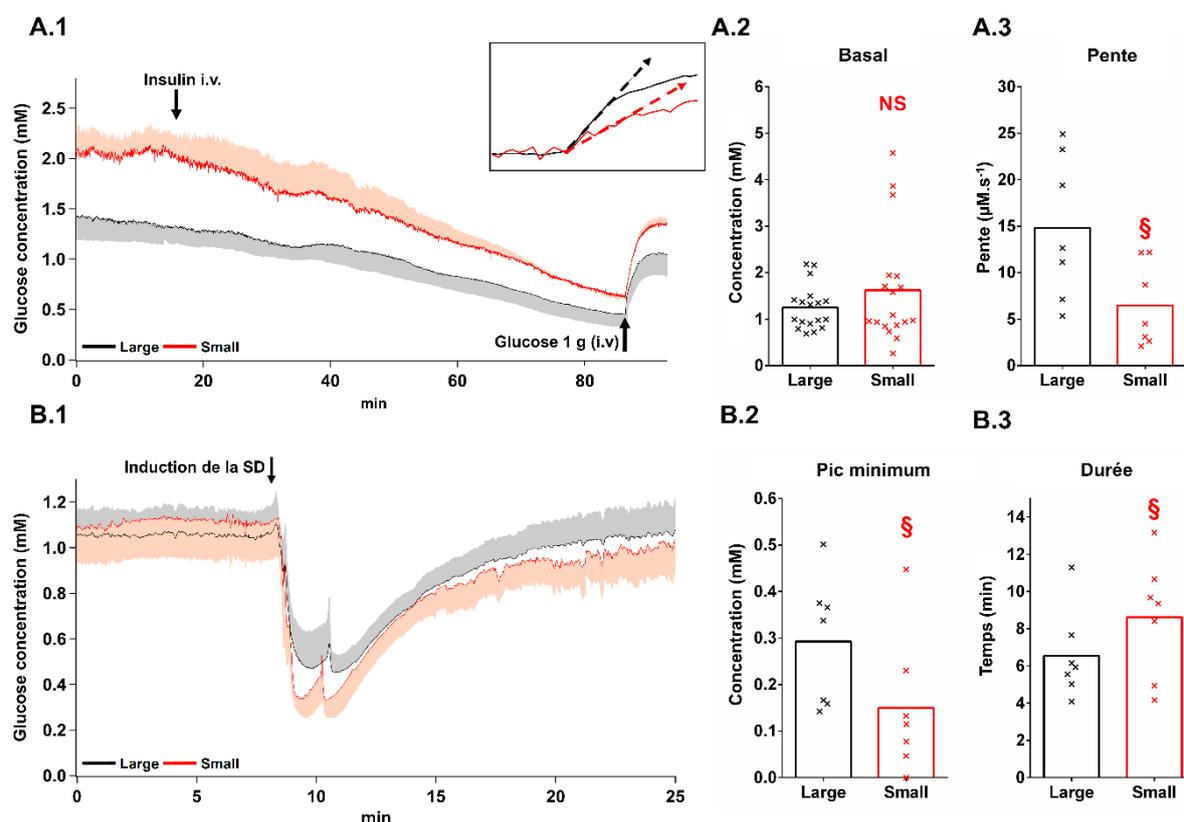


Figure II-15. Mesures du glucose *in vivo*.

Détection du glucose avec des biocapteurs conventionnels (80-90 μm de diamètre ; trace noire) et des biocapteurs ultra miniaturisés (12-15 μm de diamètre ; trace rouge) après injection intraveineuse d'insuline suivie d'une injection de 1 mmol de glucose (A,1) et de l'induction d'une SD dans le cortex (B,1) (La moyenne est représentée par une ligne continue et la SEM par un ombrage de couleur claire $n = 7$). L'encadré A,1 montre les pentes des variations de glucose après l'injection intraveineuse de glucose. A,2 Concentration moyenne de glucose extracellulaire basale sur 5 minutes avant l'injection d'insuline A,3 Pente moyenne après l'injection intraveineuse de glucose B,2 Concentration minimale atteinte après l'induction de la SD. B,3 Délai de la récupération de la concentration de glucose jusqu'à 80 % de sa valeur de base (Moyenne et écart-type standard; NS : Non significatif ; § : différence significative ; $n = 7$).

4. Le lactate

En complément du glucose, le lactate est un métabolite important du cerveau capable de fournir de l'énergie aux neurones et aux cellules gliales. Le lactate extracellulaire du cerveau a été suivi à l'aide de biocapteurs enzymatiques basés sur la lactate oxydase en utilisant une configuration similaire comprenant un biocapteur ultra miniaturisés basé sur une microélectrode en fibre de carbone platiné implantée à 1-2 mm d'un biocapteur plus grand avec un diamètre extérieur de 80-90 μm . Une condition typique pour induire des changements dans le lactate extracellulaire est une modification de FiO_2 [250]. Nous avons donc quantifié les niveaux de lactate de base dans le cortex des animaux respirant de l' O_2 pur ($\text{FiO}_2 = 100\%$) ou de l'air ambiant ($\text{FiO}_2 = 21\%$). Nous avons également étudié les changements transitoires rapides de lactate extracellulaire évoqués par la SD. Les biocapteurs ultra miniaturisés ont constamment détecté des niveaux de lactate inférieurs : $1,24 \pm 0,37 \text{ mM}$ vs $2,11 \pm 0,85 \text{ mM}$ à 100% FiO_2 , $2,02 \pm 0,60 \text{ mM}$ vs $2,78 \pm 0,98$ à 21% FiO_2 , et $1,25 \pm 0,24 \text{ mM}$ vs $1,96 \pm 0,36 \text{ mM}$ retournant à 100% FiO_2 (**Figure II-16 A.**). La différence était statistiquement significative pour la condition 100% FiO_2 ($P = 0,049$; lorsqu'on revient à 100% , $P = 0,013$; $n = 7$) mais pas pour 21% FiO_2 ($P = 0,156$; $n = 7$; **Figure II-16 A.**). Les changements dans la concentration extracellulaire de lactate étaient également plus faibles lorsqu'ils étaient mesurés à l'aide de biocapteurs ultra miniaturisés. Les SD évoquaient constamment une vague d'augmentation de la concentration de lactate dans le liquide interstitiel, conformément aux études antérieures [206], mais l'aire sous la courbe était beaucoup plus petite pour les biocapteurs ultra miniaturisés : $2,63 \pm 0,57 \text{ M.s}$ vs $4,34 \pm 0,85 \text{ M.s}$ ($P = 0,029$; $n = 7$; **Figure II-16 B.**).

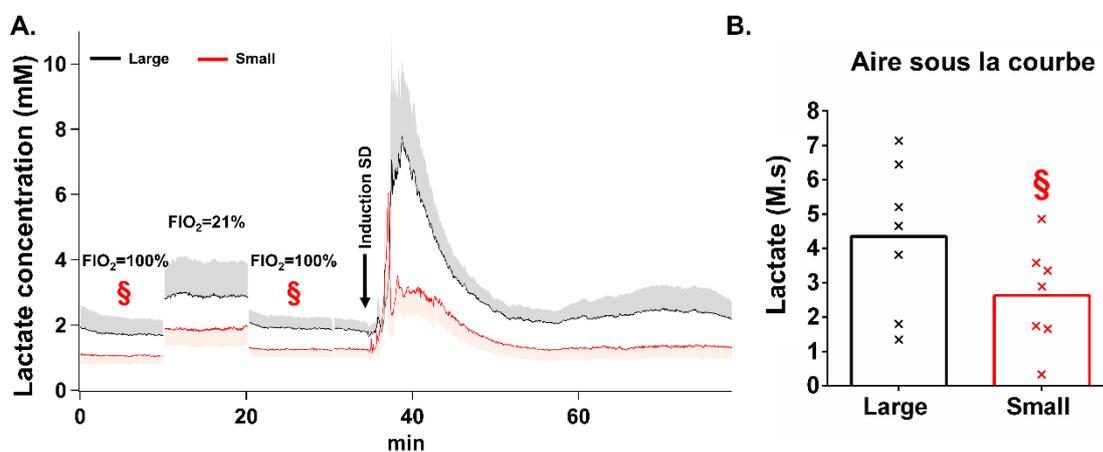


Figure II-16. Mesures du lactate *in vivo*.

A. Mesures des niveaux de base avec une FiO_2 de 21 % et 100 %, suivie de l'induction d'une SD provoquant une augmentation de concentration extracellulaire de lactate (5 min de temps de stabilisation après que les changements de FiO_2 ont été retirés de l'enregistrement). Des biocapteurs conventionnels (80-90 μm de diamètre ; trace noire) et des biocapteurs ultra miniaturisés (12-15 μm de diamètre ; trace rouge) ont été implantés en parallèle (La moyenne est représentée par une ligne continue et la SEM par un ombrage de couleur claire ; $n = 7$).

B. Aire sous la courbe pendant 20 min après l'induction de la SD. Notons les concentrations significativement plus faibles détectées par les microélectrodes ultra miniaturisées (Moyenne et écart-type standard ; § : différence significative ; $n = 7$).

5. La D-sérine et le glutamate

D-sérine.

Nos biocapteurs ultra miniaturisés ont également été testés pour la détection de la D-sérine. Après 1 heure de stabilisation suivant l'implantation des biocapteurs, la concentration extracellulaire de base de D-sérine a été calculée sur une durée de 5 minutes. Aucune différence significative n'est ressortie avec des concentrations moyennes de $5,2 \pm 2,8 \mu\text{M}$ pour les biocapteurs conventionnels et de $4,9 \pm 7,2 \mu\text{M}$ pour nos biocapteurs ultra miniaturisés ($P = 0,46$; $n = 7$; **Figure II-17 B.**).

Par la suite une injection intraveineuse de 1,5 mL de D-sérine (1g/kg) a été réalisée (**Figure II-17 A.**). Suite à cette injection, une lente augmentation de la concentration extracellulaire de D-sérine a été observée sur une durée de 1 h 30. Le niveau de concentration de D-sérine mesuré sur une durée de 5 minutes après un délai de 1 h 20 suivant l'injection a été de $12,8 \pm 5,6 \mu\text{M}$ pour les biocapteurs plus larges et de seulement $4,9 \pm 5,5 \mu\text{M}$ pour nos biocapteurs ultra miniaturisés (**Figure II-17 B.**). De la même manière que pour le glucose, une différence significative entre les deux types de biocapteurs a été observée. Dans ce cas, l'augmentation de la D-sérine à la suite de l'injection intraveineuse a montré une augmentation significativement plus rapide aux alentours des biocapteurs plus larges ($P = 0,023$; $n = 7$).

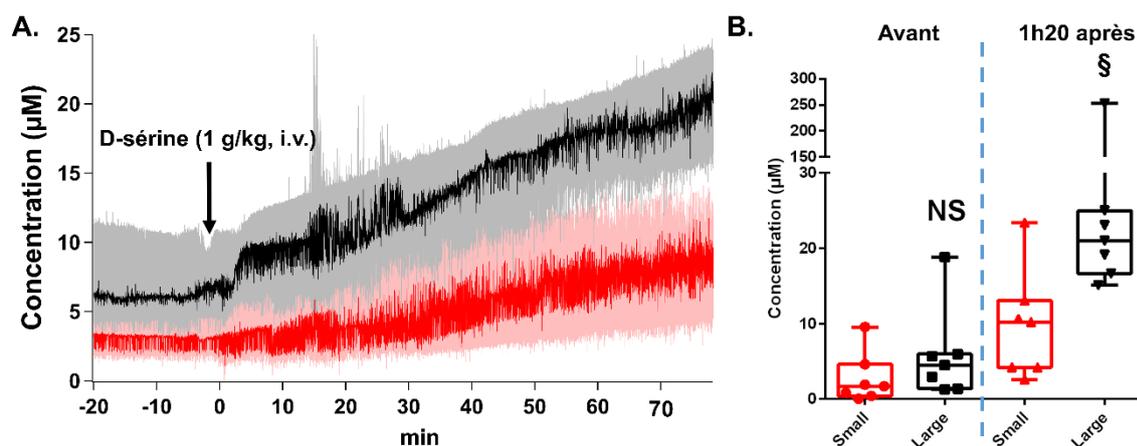


Figure II-17. Mesures de la D-sérine *in vivo*.

A. Détection en parallèle de la D-sérine avec des biocapteurs conventionnels (80-90 μm de diamètre ; trace noire) et des biocapteurs ultra miniaturisés (12-15 μm de diamètre ; trace rouge) après injection intraveineuse de D-sérine (1g/kg). (La moyenne est représentée par une ligne continue et la SEM par un ombrage de couleur claire ; $n=7$). **B.** Concentration moyenne de glucose extracellulaire basale sur 5 minutes avant et 1h20 après l'injection de D-sérine (Moyenne et écart-type standard; NS : Non significatif ; § : différence significative ; $n = 7$).

SD - D-sérine et glutamate.

Les changements transitoires rapides de la D-sérine et du glutamate extracellulaire évoqués par une SD ont aussi été mesurés. La D-sérine et le glutamate n'étant présents qu'en faible concentration dans le fluide interstitiel, il était nécessaire d'utiliser des biocapteurs avec une excellente sensibilité à l' H_2O_2 . Malheureusement, comme cela a été vu précédemment, la faible reproductibilité du dépôt par pulvérisation n'a permis la fabrication que d'un nombre limité de microélectrodes. En conséquence, il a été réalisé qu'un nombre insuffisant d'expérimentation *in vivo* pour une étude statistiquement fiable de la D-sérine et du glutamate lors de l'induction de SD ($n = 5$ pour la D-sérine et $n = 2$ pour le glutamate). De plus, il faut noter que l'appareil de stéréotaxie utilisé au cours des expérimentations *in vivo* ne comportait que deux bras manipulateurs. Cela nous a donc conduit à n'implanter que les biocapteurs enzymatiques (l'ultra miniaturisé et le conventionnel) sans les biocapteurs contrôles recouverts de BSA. Il est donc difficile avec les résultats obtenus de savoir ce qui est physiologique ou non de ce que l'on a détecté. Malgré tout, que ce soit pour la D-sérine et le glutamate, les deux types de biocapteurs ont mesurés une augmentation de la concentration extracellulaire, bien qu'une tendance semble indiquer que les biocapteurs ultra miniaturisés détectaient des pics de concentration plus élevés. Pour la D-sérine, l'augmentation détectée par les biocapteurs ultra miniaturisés était de $69 \pm 16,8 \mu\text{M}$ comparé

à $31,8 \pm 13,3 \mu\text{M}$ avec des biocapteurs conventionnels (**Figure II-18 A.**), et respectivement de $414,5 \pm 332,3 \mu\text{M}$ contre $65,7 \pm 34,5 \mu\text{M}$ pour le glutamate (**Figure II-18 B.**). De plus, les biocapteurs ultra miniaturisés détectent une diminution en dessous de leur niveau de concentration basal suite au pic de D-sérine et de Glutamate. Et cet évènement n'est pas détecté pas des biocapteurs plus larges.

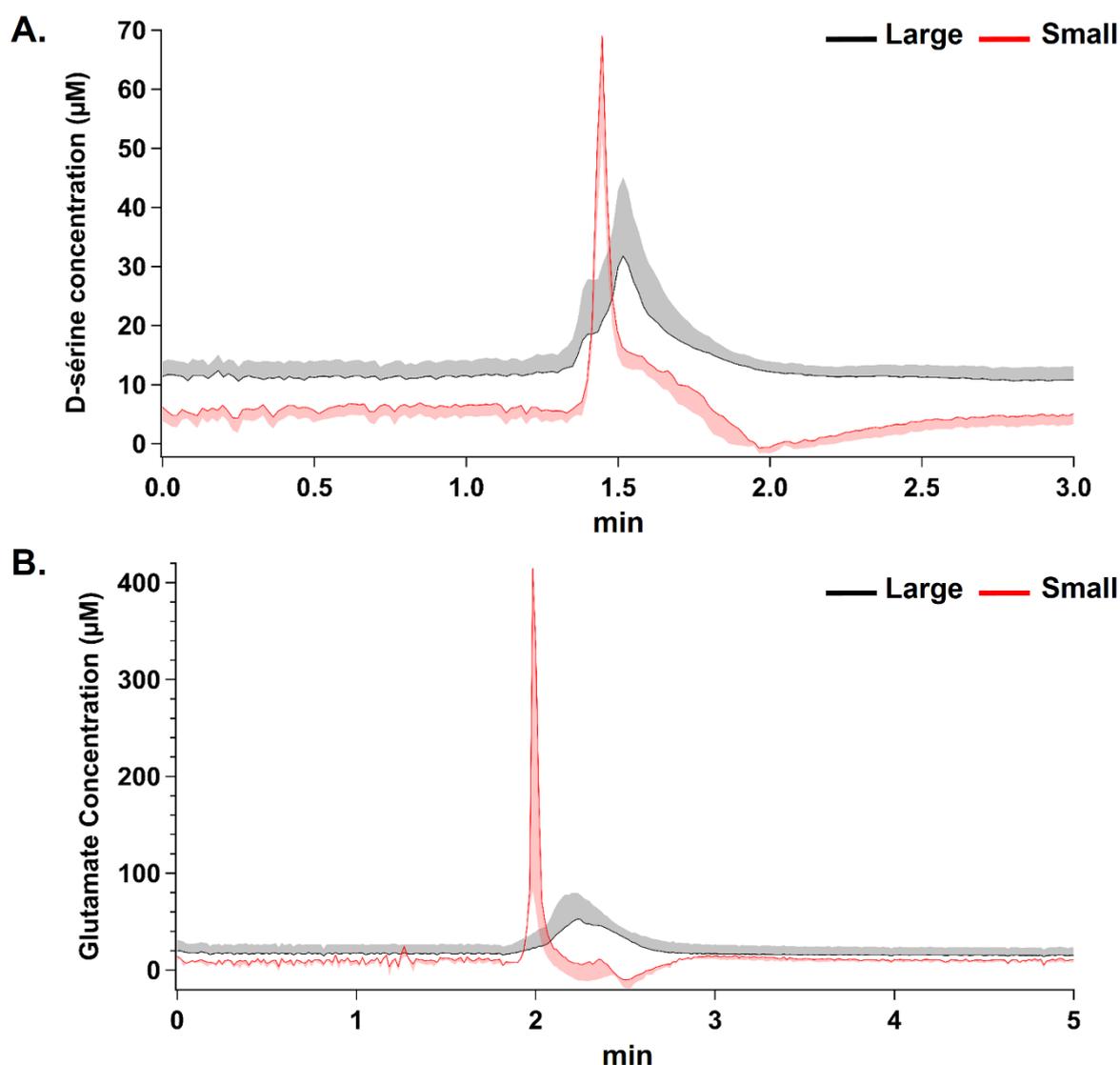


Figure II-18. Mesures *in vivo* de la D-sérine et du glutamate lors de SD.

Les mesures de concentration de D-sérine (**A.**) et de glutamate (**B.**) ont été réalisées à l'aide de deux biocapteurs implantés en parallèle, l'un ultra miniaturisé et l'autre de dimension conventionnel sans biocapteurs contrôles (BSA).

V. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre, des fibres de carbone de 7 μm de diamètre ont été platinées par dépôt physique en phase vapeur pour améliorer leur activité catalytique pour l'oxydation du H_2O_2 et la réduction de l' O_2 . Le dépôt de Pt est une procédure courante parmi les technologies bioMEMs, mais il est généralement réalisé sur des substrats planaires en silicium [103]. Malgré leur géométrie cylindrique et leur faible diamètre, des fibres de carbone ont été recouvertes avec succès d'une couche uniforme de Pt qui adhère à la structure fibreuse sous-jacente de la fibre de carbone et a ainsi permis de détecter le H_2O_2 à partir de 0,2 V et d'améliorer leur sensibilité au H_2O_2 comparé à celle des fils de Pt massifs commerciaux. Les raisons de cette amélioration de la sensibilité pourraient être expliquées à la surface de Pt rugueuse et poreuse déposée par les procédés de dépôt physique en phase vapeur, qui impliquerait une surface active plus grande que celle d'un fil de Pt massif. En effet, les images au microscope électronique ont révélé une telle rugosité sur la surface des couches de Pt obtenues par pulvérisation cathodique et évaporation, ce qui appuie cette hypothèse. Alternativement, l'activité catalytique du Pt concernant l'oxydation du H_2O_2 est connue pour être médiée au moins en partie par des radicaux de Pt(OH) [251], et il est possible que la concentration de ces radicaux puisse différer entre le Pt massif et les couches de Pt déposées par dépôt physique en phase vapeur. Un problème significatif avec les fibres de carbone platinées fut la forte diminution de la sensibilité au H_2O_2 après l'électro-polymérisation de la PPD. Il est intéressant de noter que ce phénomène n'a pas été observé avec les fils de Pt massif. Des observations réalisées par d'autres auteurs montrent que les couches de Pt obtenues par dépôt physique en phase vapeur ont une affinité accrue à l'encrassement biologique des microélectrodes par l'albumine ou bien par d'autres milieux biologiques [252], ce phénomène pourrait donc expliquer la détérioration de la détection du H_2O_2 par la PPD. Dans l'ensemble, la sensibilité des microélectrodes ultra miniaturisées au H_2O_2 est restée supérieure à celle des fils de Pt massifs après la fonctionnalisation avec la PPD.

Malgré les avantages que présentent cette fonctionnalisation des fibres de carbone par le dépôt de Pt en phase vapeur, un problème de reproductibilité a clairement été observé dans le cas du dépôt par pulvérisation cathodique. En accord avec d'autres travaux [246,253], l'influence des paramètres de dépôt du Pt par pulvérisation cathodique sur ses propriétés catalytiques a été étudiée comme la pression, la puissance ou encore l'épaisseur de Pt déposée. Le fait de faire varier la pression dans le bâti lors du dépôt a montré une influence

significative. Il a été aussi possible de visualiser une influence de la puissance et de l'épaisseur du dépôt sur la sensibilité des microélectrodes à l' H_2O_2 . Les matériaux employés comme couche d'accroche, la méthode de dépôt, mais aussi les paramètres intrinsèques à la méthode employée ne sont donc pas anodins vis-à-vis des propriétés électrochimiques du Pt. Il apparaît donc important de mieux comprendre la relation entre la structure du Pt déposé et les performances électrochimiques qui en découlent afin de réaliser des microélectrodes optimales en termes de sensibilité au H_2O_2 . Car si des molécules comme le glucose ou le lactate, présentes en forte concentration, peuvent être aisément détectées *in vivo* à l'aide de biocapteurs présentant de faibles sensibilités. Des sensibilités plus élevées sont nécessaires afin d'être capables de détecter précisément des molécules présentes en plus faible concentration dans le cerveau (*id est* le glutamate, la D-sérine, ou encore la choline). Dans un premier temps, il serait important de diminuer la variabilité entre les microélectrodes par exemple en utilisant les technologies MEMS pour une fabrication en parallèle de ces microélectrodes et s'abstraire de leur fabrication à la main. Enfin, des caractérisations plus avancées des dépôts de Pt pourront être réalisées comme des analyses des éléments présents sur la surface des fibres par spectrométrie aux rayons X (XPS) ou encore des analyses de la morphologie de la surface par microscope à force atomique (AFM) afin de mieux comprendre la structure physico-chimique des dépôts de platine obtenus dans notre étude. Ces analyses permettraient d'avoir une meilleure compréhension des éléments qui entrent en jeu dans le fonctionnement électrochimique du Pt en couche mince, mais aussi d'exclure la possibilité de contamination de celui-ci lors des dépôts.

En utilisant ces fibres de carbone platinées biofonctionnalisées avec de la PPD et des enzymes, il a été possible d'obtenir des biocapteurs électrochimiques ultra miniaturisés d'un diamètre extérieur inférieur à 15 μm qui peuvent détecter le glucose, le lactate, ou la D-sérine en utilisant respectivement la glucose oxydase, la lactate oxydase, la DAAO oxydase, la glutamate oxydase, ou bien encore avec uniquement un revêtement de Nafion pour détecter la réduction de l' O_2 dans le cerveau. La petite taille de ces dispositifs a induit des différences significatives pour l'analyse du liquide interstitiel cérébral :

(1) l'implantation de la sonde pouvait être réalisée sans induire de forte déformation mécanique des tissus ou générer de SD corticale ;

(2) la BHE ne montre pas de rupture : le bleu d'Evans ne diffuse pas vers le parenchyme cérébral et la diffusion du glucose et de la D-sérine à travers la BHE est plus lente, autour du biocapteur ultra miniaturisé ;

(3) la concentration extracellulaire basale d'O₂ et de lactate dans le tissu cérébral est apparue inférieure à celle rapportée par des sondes plus larges ;

(4) les changements neurochimiques transitoires évoqués par des SD étaient différents avec des microélectrodes ultra miniaturisées (de plus faibles libérations de lactate, de plus grandes diminutions de glucose, des changements plus grands et rapides de PO₂, et des libérations de D-sérine et de glutamate qui semblent plus rapides et plus importantes).

En plus du fait que la BHE était préservée aux alentours des biocapteurs ultra miniaturisés, qui a été clairement indiqué par la coloration bleue d'Evans et d'un taux de diffusion du glucose et de D-sérine plus lent autour de ces biocapteurs ultra miniaturisés, il est possible de supposer que des sondes plus larges de 80-90 µm étaient entourées d'une couche de tissu mort ou compromis. La diminution de la consommation d'O₂ autour de la sonde pourrait expliquer pourquoi des sondes plus larges ont détecté une PO₂ plus grande qu'avec des électrodes ultra miniaturisées. De plus, l'O₂ pourrait diffuser le long de la tige des sondes implantées, et ce phénomène pourrait être amplifié avec des sondes plus larges que nos microélectrodes ultra miniaturisées. Par exemple, Ledo *et al.* ont implanté une sonde triangulaire en silicium pour mesurer la PO₂ dans différentes zones du cerveau du rat, hippocampe, striatum et cortex, et ont obtenu des valeurs plus élevées dans les zones plus superficielles du cerveau où la sonde était plus large (cortex, Hippocampe zone CA1) que dans les zones plus profondes où l'O₂ a été détecté avec la pointe de la sonde (gyrus denté) ^[172]. Cela appuierait l'idée selon laquelle l'O₂ pourrait diffuser à l'intérieur d'une couche de tissu cérébral compromis le long de la tige de sondes volumineuses et contribuer à des valeurs de PO₂ détectées plus élevées. De plus, la dynamique plus rapide du glucose ainsi que l'éventail plus large des variations du glucose évoquées par les SD est également cohérent avec une couche de cellules inactives agissant comme un filtre passe-bas sur les changements de concentration de glucose. Enfin, les concentrations extracellulaires de lactate plus élevées détectées par les sondes plus grandes pourraient refléter les premières étapes d'une réaction inflammatoire au niveau des cellules et des vaisseaux sanguins qui ont été blessés pendant l'implantation. Un taux élevé de lactate cérébral a souvent été associé à une inflammation cérébrale, par exemple dans le contexte de l'encéphalopathie du SIDA ^[254],

du syndrome de Leigh ^[255] ou de la démyélinisation inflammatoire du SNC ^[256]. Il est supposé que le lactate est synthétisé à partir de réserves astrocytaires de glycogène et libéré dans le milieu interstitiel en réponse à une forte demande d'énergie du cerveau ^[257], et cette voie biochimique pourrait également être sollicitée lors d'une lésion locale produite par l'implantation d'une sonde. Pour la D-sérine et le glutamate, bien que des différences aient pu être observées selon les dimensions du biocapteur implanté, les expérimentations sont à reproduire avec des biocapteurs contrôles afin de différencier les artefacts des effets physiologiques dus aux SD. Dans l'ensemble, le concept d'une couche de tissu cérébral compromise autour de dispositifs implantés plus larges comme les sondes de microdialyse ou les sondes fabriquées à l'aide des technologies MEMS a déjà été documenté par d'autres laboratoires. Par exemple, les sondes de microdialyse cérébrale qui ont généralement un diamètre de 200-500 μm sont entourées de tissus compromis dans lesquels la libération de dopamine est altérée et les concentrations de dopamine sous-estimées ^[193,258]. L'analyse structurale des tissus cérébraux entourant une sonde de microdialyse a révélé la présence de mort cellulaire neuronale jusqu'à 400 μm de la sonde et de perturbation tissulaire comme des axones gonflés ou des corps cellulaires en dégénérescence jusqu'à 1,2 mm ^[60]. De plus, les interleukines sont élevées près des sondes de microdialyse, une caractéristique de l'inflammation des tissus cérébraux ^[259]. Des altérations similaires des tissus cérébraux ont également été décrites en réponse à l'implantation de sondes en silicium pour des enregistrements électrophysiologiques multisites ^[186,187]. De telles lésions primaires produites lors de l'implantation cérébrale sont considérées comme un déterminant clé dans l'induction de la réponse à un corps étranger. Cette réponse est initiée par la lésion initiale des capillaires cérébraux conduisant à la diffusion de l'albumine plasmatique et des monocytes à la surface du dispositif implanté, et finalement, à la formation d'une capsule de collagène autour de la sonde après quelques jours d'implantation ^[62]. Ici, nos microélectrodes ultra miniaturisées avaient un diamètre extérieur inférieur à 15 μm (la distance moyenne entre les capillaires cérébraux ^[189] et on s'attend donc à des dommages vasculaires minimes lors de l'implantation de ces dispositifs dans le parenchyme cérébral. Étant donné que la lésion vasculaire est le déclencheur initial de la réaction à un corps étranger, on peut s'attendre à une réduction de cette réaction sur plusieurs jours d'implantation chronique. Par conséquent, une perspective intéressante de la présente étude serait de tester ces biocapteurs

électrochimiques ultra miniaturisés sur plusieurs jours d'implantation pour déterminer si leur durée de vie *in vivo* est améliorée.

Il est intéressant de noter que les microélectrodes en fibre de carbone permettent une détection fiable de la dopamine jusqu'à plusieurs semaines *in vivo* [260,261], soutenant l'idée que de petits dispositifs implantés montrent une biocompatibilité accrue et une longévité opérationnelle plus longue *in vivo*. Cependant, le suivi neurochimique à l'aide de microélectrodes en fibre de carbone est limité aux molécules oxydables comme la dopamine ou la sérotonine [75]. Le dépôt de Pt sur des fibres de carbone par dépôt physique en phase vapeur et leur fonctionnalisation enzymatique étend maintenant le champ d'application des microélectrodes en fibre de carbone aux molécules non oxydables. En particulier, les biocapteurs basés sur des microélectrodes en fibre de carbone platinée restent plus petits que la distance moyenne entre les capillaires cérébraux, ce qui est un seuil important pour éviter une perturbation majeure du parenchyme cérébral. Il est probable que ces nouveaux dispositifs contribueront à l'avenir de manière significative à l'analyse neurochimique du liquide interstitiel cérébral.

Chapitre III - Association de biocapteurs électrochimiques et optiques pour l'analyse du milieu neurochimique de glioblastomes

Ce chapitre porte sur le développement d'une microsonde multiphysique intégrant sur un même dispositif une mesure de fluorescence et une mesure ampérométrique pour le suivi des neurotransmetteurs et métabolites en profondeur dans le cerveau. L'objectif principal de ce travail est de réduire le nombre d'implantation d'une telle double mesure, électrochimique et optique, en les associant sur une unique aiguille implantable. Dans le cadre de ce chapitre, cet outil est destiné à être utilisé pour monitorer la composition chimique du milieu interstitiel au voisinage ou à l'intérieur de glioblastomes de souris afin de comprendre la nature des espèces chimiques libérées par la tumeur. Pour cela, un modèle murin de cellules tumorales modifiées avec des protéines fluorescentes vertes (GFP) a été employé afin de pouvoir réaliser ce suivi de manière localisé grâce à une mesure de leur fluorescence. Une microsonde en silicium a été fabriquée en salle blanche avec deux microélectrodes en platine à l'extrémité de la partie implantable et fonctionnalisées avec une enzyme afin de détecter, par exemple, du glucose, du lactate, de la D-sérine ou du glutamate. De plus, une fibre optique a été insérée dans un canal au centre de la sonde pour l'excitation lumineuse et la détection de la position des glioblastomes par fluorescence. Dans ce chapitre, nous verrons qu'il a été possible de fabriquer un tel dispositif présentant des performances pour la détection du lactate comparables à celles obtenues lors du chapitre précédent et avec de bonnes performances pour une détection précise de la fluorescence. De plus, le choix du placement de la fibre optique par rapport aux microélectrodes sur la microsonde a permis de limiter voire de prévenir des perturbations pouvant provenir d'une exposition des biocapteurs à une excitation optique.

I. Introduction

Les vingt dernières années ont vu un essor remarquable des techniques optiques pour interroger ou manipuler le cerveau. Par exemple, l'expression de canaux ioniques sensibles à la lumière comme la channelrhodopsine ou l'halorhodopsine permet de stimuler ou d'inhiber spécifiquement des populations de neurones manipulées génétiquement [262,263]. De plus, l'expression de protéines fluorescentes comme la « green fluorescent protein », la « enhanced cyan fluorescent protein » ou la « red fluorescent protein » permettent de marquer spécifiquement des populations de neurones pour ensuite les localiser *in vivo* [264-266]. L'association de ces techniques optiques avec un suivi électrochimique du fluide interstitiel serait une avancée considérable pour la compréhension du fonctionnement physiologique et pathologique du cerveau. A notre connaissance, une telle combinaison entre mesure optique de fluorescence (ou de stimulation optique) et mesure enzymatique sur un même dispositif n'a encore jamais été réalisée. La plupart des travaux ont associé différents capteurs pouvant exciter par voie optique des neurones pour l'optogénétique, et équipées d'électrodes pour l'électrophysiologie [267,268], et seuls certains d'entre eux ont développé des outils pouvant réaliser une détection de fluorescence couplée à un biocapteur électrochimique mais non-enzymatique [269]. L'association d'une mesure enzymatique avec une mesure optique implique des problématiques supplémentaires comparées à ces capteurs comme la biofonctionnalisation de l'électrode et l'exposition de l'enzyme à l'excitation optique pouvant entraîner un échauffement et ainsi altérer sa réponse [270,271].

Pour ce travail, nous proposons un nouveau type de biocapteur qui associe une mesure de fluorescence par fibre optique avec une mesure électrochimique des concentrations de métabolites et de neurotransmetteurs d'intérêt. Afin de réduire le nombre d'implantation de biocapteurs, ces deux techniques de détection ont été intégrées sur une seule et unique microsonde en silicium. Cette microsonde est destinée à être testée sur un modèle de glioblastome murin (GL261 [272]) dans lequel les cellules cancéreuses expriment un marqueur fluorescent, « Green Fluorescent Protein » (GFP). Ce nouvel outil permettra de mieux comprendre les altérations de la composition du milieu interstitiel induites par la tumeur, telles qu'une surproduction de glutamate [273], le principal acide aminé excitateur du cerveau, ou de lactate [274,275]. En effet, des concentrations anormalement élevées de

glutamate peuvent être neurotoxiques. Le lactate, un métabolite énergétique résultant de la dégradation anaérobie du glucose pourrait avoir un rôle immunologique important pour la communication entre les macrophages et les cellules tumorales et ainsi un rôle dans la croissance et la prolifération des tumeurs ^[274,275]. Des concentrations anormalement élevées de lactate peuvent aussi acidifier le milieu interstitiel et provoquer une neurotoxicité. La libération de glutamate et de lactate par le glioblastome pourrait être un des mécanismes lui permettant de se propager en éliminant les neurones voisins.

Un tel dispositif opto-électrochimique ouvre la perspective de mettre en œuvre des analyses du milieu interstitiel dans les zones péri- ou intra-tumorales tout en contrôlant précisément le positionnement de la sonde par rapport aux cellules tumorales par la fluorescence de la GFP détectée provenant de ces dernières. Ainsi, cette technique permettra de quantifier pour la première fois et de façon très peu invasive, par l'intégration de plusieurs biocapteurs sur une seule microsonde implantable, les concentrations de métabolites (glucose et lactate) et d'acides aminés excitateurs (glutamate et D-sérine) à l'intérieur et autour de la tumeur par un positionnement précis des biocapteurs enzymatiques.

Ce chapitre est structuré en trois parties. La première introduit le matériel et les méthodes utilisés en décrivant les cellules tumorales modifiées et leurs propriétés de fluorescence, le système optique et le protocole *in vitro* pour l'électrochimie. La seconde présente la microsonde en passant par les spécifications requises, sa conception et sa fabrication. Enfin la troisième partie présente la caractérisation des performances *in vitro* de la partie électrochimique et optique de la microsonde, ainsi que les perturbations induites par l'excitation optique sur la détection électrochimique.

II. Matériels et méthodes

1. Les cellules tumorales fluorescentes

Les cellules tumorales de gliome de souris, 261 (GL261) sont fréquemment utilisées dans la recherche de traitements expérimentaux des glioblastomes car elles présentent une très bonne capacité à croître rapidement *in vitro* et *in vivo*. De plus, les tumeurs GL261 se développent de manière agressive dans leur hôte syngénique, la souris C75BL/6 ^[272]. Ainsi, nous avons choisi de travailler avec ce modèle murin de glioblastome dans lequel les cellules tumorales ont été rendues fluorescentes par l'expression de la protéine GFP. Ces cellules nous ont été fournies par le biais d'une collaboration avec l'Institut Neuro-Myogène (Lyon, France).

1.1. La fluorescence

La fluorescence est un processus de luminescence dans lequel des molécules émettent de la lumière à partir d'états électroniques excités, créés par un mécanisme physique (par exemple, par l'absorption de la lumière), mécanique (par friction) ou chimique. La génération de luminescence par excitation d'une molécule par des photons ultraviolets ou de lumière visible est un phénomène appelé photoluminescence, qui est divisé en deux catégories, la fluorescence et la phosphorescence. La fluorescence est la propriété de certains atomes et molécules d'absorber la lumière à une longueur d'onde particulière et d'émettre après absorption une lumière de longueur d'onde plus grande sur un bref intervalle de temps, appelé durée de vie de la fluorescence (de l'ordre de 0,5 à 20 nanosecondes). Le processus de phosphorescence se produit d'une manière similaire à la fluorescence, mais avec une durée de vie de l'état excité beaucoup plus importante.

Lorsqu'un composé absorbe de la lumière (*id est* de l'énergie), les électrons des atomes dudit composé passent d'un état de base (stable) à un état excité. Les électrons retournent à l'état de base par diverses transitions qui peuvent impliquer l'émission d'un photon (radiatif). Cet effet est à la base de la fluorescence (**Figure III-1 A.**). De l'énergie peut également être perdue par des processus non radiatifs et éventuellement dissipée sous forme de chaleur (phonons).

La différence entre les maxima dans les longueurs d'onde d'absorption et d'émission connue sous le nom de décalage de Stokes est une propriété essentielle de la fluorescence, et est en partie lié au fait que le photon émis aura toujours une énergie inférieure à celle du photon absorbé. (**Figure III-1 B.**). Chaque fluorophore a un décalage de Stokes singulier. Ainsi, plus le décalage de Stokes est élevé, plus le décalage spectral entre la lumière excitatrice et la lumière émise est grande.

La catégorie de molécules capables de subir des transitions électroniques qui aboutissent à la fluorescence sont connues sous le nom de sondes fluorescentes, fluorochromes ou simplement colorants. Les fluorochromes qui sont conjugués à une macromolécule plus grosse (comme un acide nucléique, un lipide, une enzyme ou une protéine) par absorption ou par des liaisons covalentes sont appelés fluorophores. En général, les fluorophores sont divisés en deux grandes classes, dites intrinsèques et extrinsèques. Les fluorophores intrinsèques, tels que les acides aminés aromatiques, les porphyrines et les protéines fluorescentes vertes (communément connues sous le sigle de GFP, « Green Fluorescent Protéine »), sont présents naturellement. Les fluorophores extrinsèques sont des colorants synthétiques ou des produits biochimiques modifiés qui sont ajoutés à un échantillon pour produire une fluorescence ayant des propriétés spectrales spécifiques. Lorsqu'on excite un fluorochrome à la longueur d'onde correspondante à son pic maximum d'absorption, le fluorochrome émet des photons sur tout son spectre d'émission avec une intensité maximale. D'un autre côté, si l'on excite ce même fluorochrome avec une longueur d'onde de son spectre d'absorption différente de son maximum d'absorption, il émettra des photons également sur tout son spectre d'émission mais avec une plus faible intensité. Il est donc important d'optimiser le choix de la longueur d'onde utilisée pour l'excitation.

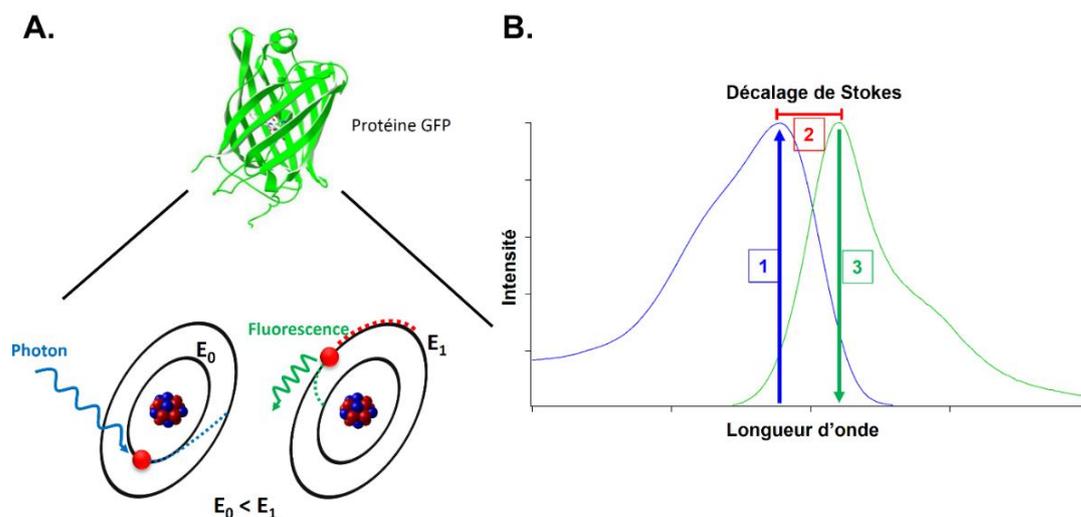


Figure III-1. Concept physique du principe de fluorescence.

A. Représentation de la structure d'une protéine fluorescente verte et de son comportement électronique lors d'une excitation par un photon externe provoquant l'émission d'un autre photon par la protéine à une longueur d'onde supérieure, la fluorescence. **B.** Représentation spectrale des intensités d'excitation et d'émission en fonction de la longueur d'onde. 1. En bleu, le spectre d'absorption ; 2. En rouge, l'écart entre les pics d'intensité d'absorption et d'émission, le décalage de Stokes, est représenté. 3. En vert, le spectre d'émission de la fluorescence. (Certains éléments de cette figure sont sous licence Creative Commons Attribution-Share Alike 4,0 International license).

1.2. Photo-blanchiment

La plupart des fluorophores peuvent répéter leur cycle d'excitation et d'émission des centaines à des milliers de fois avant que la molécule ne soit « photo-blanchie », entraînant la destruction de sa capacité à fluorescer. La conséquence du photo-blanchiment est une réduction significative et irréversible de la quantité de photons émis. Ce phénomène doit donc être pris en compte en premier lieu lors de la conception et de l'exécution des études sur la fluorescence.

Le photo-blanchiment (aussi appelé décoloration) se produit lorsqu'un fluorophore perd de façon permanente sa capacité de fluorescence en raison de dommages chimiques induits par les photons, des modifications des liaisons covalentes, ou encore par des molécules aux alentours (**Figure III-2 A.**)^[276]. Ces modifications irréversibles des liaisons covalentes sont causées par le passage d'un état stable à un état excité des fluorophores. Cela implique que chaque réaction de fluorescence peut entraîner un photo-blanchiment. Le nombre moyen de cycles d'excitation et d'émission, avant le photo-blanchiment, pour un fluorophore particulier dépend de la structure moléculaire et de l'environnement local de

celui-ci. Certains fluorophores photo-blanchissent rapidement après avoir émis seulement quelques photons, tandis que d'autres, plus robustes, peuvent subir des milliers voire des millions de cycles avant le photo-blanchiment. La perte d'activité causée par le photo-blanchiment peut être atténuée en réduisant l'intensité ou la durée d'exposition à la lumière (**Figure III-2 B.**), ou en augmentant la concentration des fluorophores, ou en réduisant la fréquence d'excitation et donc son énergie photonique, ou en utilisant des fluorophores plus robustes au photo-blanchiment.

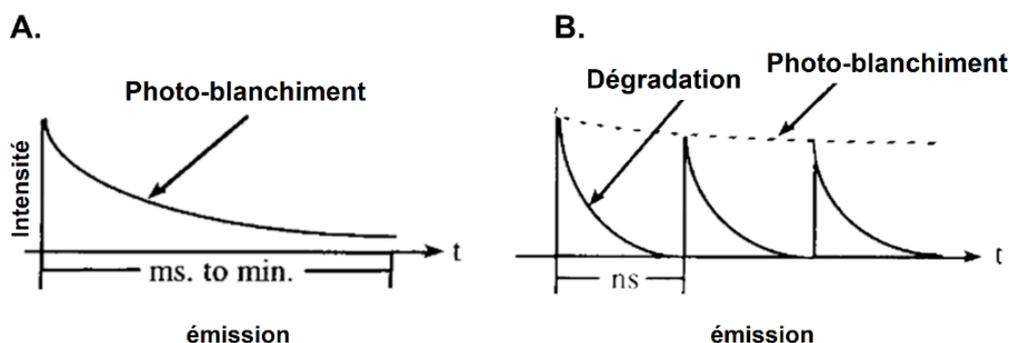


Figure III-2. Représentation graphique du photo-blanchiment.

A. Photo-blanchiment d'un fluorophore exposé à une lumière en continue. **B.** Photo-blanchiment d'un fluorophore exposé à des pulses de lumière de quelques nanosecondes. (Traduit de L. Song *et al.*, 1995 ^[277]).

Pour réaliser une détection de fluorescence, plusieurs précautions sont à prendre afin d'optimiser la mesure. La première est d'induire la fluorescence par le biais d'une excitation pulsée des fluorophores afin de réduire le photo-blanchiment ^[277]. La seconde est de choisir un fluorophore ayant un décalage de Stokes suffisamment important dans l'objectif de pouvoir observer distinctement la longueur d'onde d'émission et celle d'excitation.

1.3. Protéine fluorescente verte (GFP) et fluorescéine (FITC)

Les protéines exprimées sur la membrane des cellules tumorales sont des GFP non modifiées (« wild type » en anglais, wGFP) qui absorbent la lumière bleue avec un maximum en longueur d'onde à 488 nm et qui émettent de la lumière verte avec un maximum en longueur d'onde à 509 nm (**Figure III-3**). Ces protéines fluorescentes présentent l'avantage d'être l'un des fluorophores les plus utilisés de sorte que de nombreuses données sont disponibles à leur sujet. Plus particulièrement, sa stabilité, sa non-toxicité et surtout sa capacité à être relativement robuste au photo-blanchiment fait de la GFP un candidat de choix ^[278] (<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>).

Dans ce chapitre, un second fluorophore a été utilisé, la fluorescéine (FITC). Elle a été utilisée afin de réaliser la plupart des tests et calibrations *in vitro* du système optique et des biocapteurs. La FITC a l'avantage d'être disponible en plus grande quantité, d'être moins coûteuse, mais surtout d'être plus aisément quantifiable en termes de concentration. Elle a donc été choisie comme alternative aux cellules tumorales fluorescentes car elle présentait un spectre de fluorescence similaire aux GFP (avec un maximum d'absorption à 494 nm et un maximum d'émission à 512 nm, dans l'eau ; **Figure III-3**).

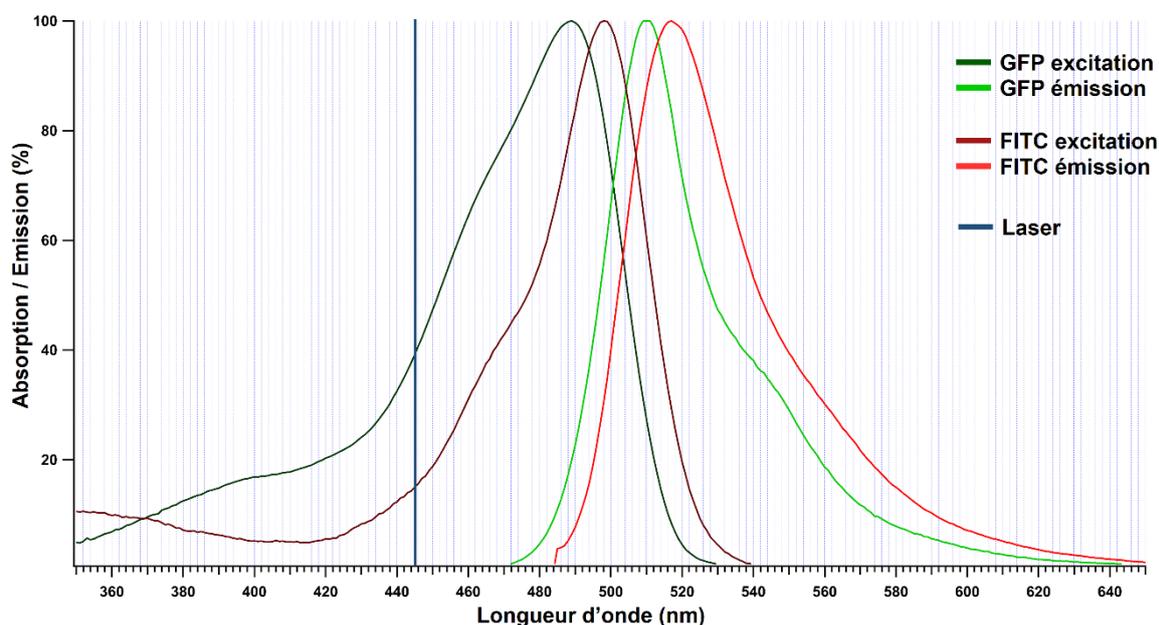


Figure III-3. Comparaison des spectres d'absorption et d'émission de la GFP et de la FITC.

1.4. Fluorescence endogène

Dans le cadre de la détection de fluorescence dans le cerveau, il est important de noter que plusieurs fluorophores sont présents de manière endogène dans le cerveau. Ces composés fluorescents endogènes peuvent être des protéines structurales, comme le collagène et l'élastine, des acides aminés, ou encore des protéines jouant un rôle dans le cycle respiratoire telles que le NADH et les flavines ^[279]. Leur plage de longueur d'onde d'absorption se situe de 200 à 500 nm et de 300 à 700 nm pour l'émission. Concernant la détection de la GFP, seules les flavines (avec un maximum d'absorption à 450 nm et un maximum d'émission à 520 nm) provoquent une fluorescence endogène. La fluorescence émise par les flavines pourra être soustraite du signal obtenu par les microsondes en réalisant

des expérimentations *in vivo* similaires sur des animaux contrôles dans lesquelles aucun glioblastome n'aura été injecté.

2. Le système optique

Le dispositif optique pour la détection de fluorescence décrit dans cette partie sera utilisé pour la globalité des mesures expérimentales de ce chapitre. Ce système a été conçu à l'intérieur d'une boîte noire, optiquement isolante, afin de pouvoir être placé dans la salle de chirurgie. Il se compose de deux parties. La première partie consiste en l'excitation par le biais de l'émission de la lumière provenant de la source, le laser. La seconde concerne la collecte des signaux de fluorescences, ainsi que leur transmission au détecteur afin d'être mesurés.

2.1. Signal d'excitation

Le signal d'excitation est produit par une diode laser refroidie (RGLase©) par convection thermique émettant avec un pic de longueur d'onde à 445 nm, une largeur de pic de 10 nm et une puissance de 50 mW (**Annexe 1**).

La forme elliptique du faisceau, dû au composant semi-conducteur de la diode laser, à la sortie du laser (2,6 mm x 1,3 mm) influence la qualité du signal transmis. Pour un couplage optimum du faisceau dans la fibre optique, il a été nécessaire de le concentrer à l'aide d'une lunette comportant deux lentilles convergentes. Par la suite, le faisceau traverse un miroir dichroïque (10XM35-465, Newport) agissant comme un filtre passe bande centré à 460 nm, avec une largeur de bande de ± 35 nm, permettant ainsi une transmission de 75 % du faisceau provenant du laser, avec une transmission de moins de 0,0001 % de toute longueur d'onde supérieure à 495 nm. Le faisceau d'excitation arrive dans un coupleur de fibre optique (F-915, Newport) doté d'un objectif de microscope 10X afin de concentrer et d'injecter le faisceau dans la fibre optique (**Figure III-4**). Finalement, une perte en transmission de 46,8 % a été mesurée en sortie de la fibre optique insérée dans le coupleur provenant principalement du miroir dichroïque. Enfin, la fibre optique est connectée à une seconde fibre (celle provenant du capteur) afin de ne pas avoir à aligner le coupleur à chaque

changement de capteur. Cette connexion est réalisée à l'aide d'un porte-fibre en V (HFV002, Thorlabs) et apporte une perte additionnelle de 18,64 %.

Même suite aux pertes optiques dues au miroir dichroïque et au porte-fibre, la puissance d'émission du laser reste trop élevée pour des applications de fluorescence, d'autant plus pour des applications *in vivo*. Pour cela un atténuateur de puissance a été fabriqué nous permettant ainsi de pouvoir régler la puissance de sortie du laser entre 1,62 μW et 17,28 mW. De plus, le laser peut fonctionner en mode pulsé via un connecteur haute fréquence. Celui-ci est relié à une carte d'acquisition (PowerLabs, ADInstruments) et contrôlé via le logiciel LabChart©. Une fonction programmée dans le logiciel LabChart permet de générer des signaux pulsés entre 1 et 100 Hz et avec une durée de pulse comprise entre 0,001 et 10 secondes.

2.2. Détection de la fluorescence

Le signal de fluorescence est collecté par la fibre optique utilisée pour l'excitation. Après être ressorti du coupleur, le signal collecté est dévié par le miroir dichroïque afin d'être dirigé vers un filtre coloré (10CGA-495, Newport). Ce filtre est passe-haut avec une longueur d'onde de coupure à 50 % de transmission à 495 nm. Enfin, une photodiode en Si, avec une large surface active de 13 mm² et un spectre de détection de 350 à 1100 nm (SM05PD1A, Thorlabs), est placée derrière le filtre afin de mesurer le signal collecté (**Figure III-4**). Le courant de la photodiode est amplifié à l'aide d'un amplificateur de photodiode (PDA200C, Thorlabs). Cet amplificateur peut détecter des courants de 100 nA à 10 mA avec une résolution de 10 pA lorsqu'un courant de l'ordre de 100 nA est mesuré (**Annexe 1**). Enfin, le signal est acquis à l'aide d'une carte d'acquisition PowerLabs et du logiciel LabChart©.

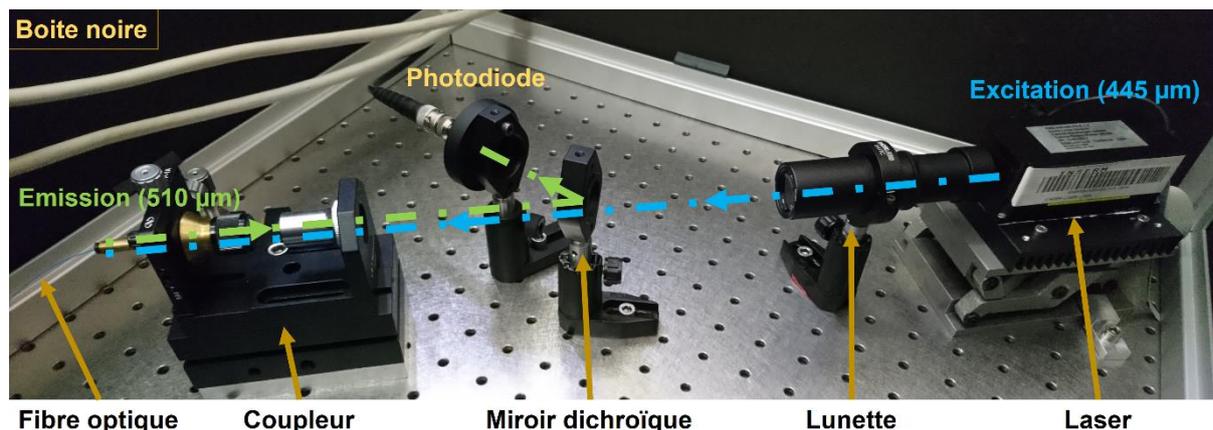


Figure III-4. Photographie du système optique à l'intérieur de la boîte noire.

Le chemin optique du signal d'excitation à 445 nm est représenté en bleu et celui de l'émission de fluorescence à 510 nm en vert.

Afin d'aligner les composants optiques pour la détection de la fluorescence, une diode laser avec une longueur d'onde d'émission proche des GFP et de la FITC a été utilisée afin de simuler le signal de fluorescence. La diode laser utilisée a une longueur d'onde d'émission de 520 nm. Le signal de cette diode laser a ensuite été injecté à l'aide un coupleur de fibre optique, constitué d'un porte-fibre et d'un objectif de microscope 10X, dans la fibre optique reliée au dispositif décrit précédemment.

2.3. Fibre optique

La fibre optique utilisée pour l'ensemble des manipulations décrites dans ce chapitre est une fibre multimode avec un cœur de $200 \pm 8 \mu\text{m}$ de diamètre, un diamètre extérieur final de $240 \pm 5 \mu\text{m}$, et une ouverture numérique de $0,22 \pm 0,02$ (FG200LCC, Thorlabs). De plus, il faut noter que l'atténuation maximale de cette fibre est de 10 dB/km, de sorte que, avec les longueurs de fibre utilisées (de l'ordre de 2-3 m), aucune perte significative de signal optique n'est causée par la fibre.

3. Mesures électrochimiques

Les mesures électrochimiques ont été réalisés avec le matériel et les méthodes présentés lors du Chapitre II (voir **Chapitre II – Partie I. 3.**). Pour rappel, les étalonnages *in vitro* ont été effectués en appliquant un potentiel de +500 mV entre les microélectrodes et une pseudo-référence en Ag/AgCl dans une solution de PBS standard (0,01 M, pH 7,4).

III. La microsonde

1. Spécifications

Indépendamment de leur association, la localisation des cellules tumorales par fluorescence et la mesure enzymatique des neurotransmetteurs ou métabolites ont chacune des spécifications à respecter. Pour la localisation par fluorescence, il est nécessaire d'avoir une forte résolution spatiale et de maintenir cette résolution tout en travaillant avec des puissances d'excitation faibles (de l'ordre du mW en sortie de fibre optique) et des durées d'impulsion courtes (de l'ordre de la dizaine de millisecondes). Ces ordres de grandeur seront justifiés par la suite. Il est indispensable de pouvoir réaliser un système de détection de la fluorescence dans ces conditions afin de limiter le photo-blanchiment des fluorophores, et *in vivo*, d'éviter la détérioration des tissus par une élévation trop importante de leur température locale due à l'absorption du signal optique. Concernant la mesure enzymatique, il faut veiller à ce que la surface des microélectrodes ait de bonnes performances à l'oxydation du H_2O_2 et que leur placement et leur conception limitent la diffusion du H_2O_2 produit par les enzymes d'une électrode à l'autre.

L'association de ces deux types de mesure implique une spécification supplémentaire. Il est essentiel de limiter l'exposition des biocapteurs enzymatiques à l'excitation optique, particulièrement afin de limiter l'échauffement de l'enzyme qui impliquerait une augmentation de sa réponse en courant ainsi que sa détérioration.

1.1. Propagation de la lumière dans les tissus

La pénétration de la lumière dans les tissus est décrite par la loi de Beer-Lambert, qui est fonction du coefficient de diffusion optique du milieu (μ_s) et du coefficient d'absorption (μ_A). Dans le cerveau, l'atténuation de la lumière à travers le tissu se produit du fait de l'absorption par le chromophore tissulaire et des diffusions multiples dues à la microstructure tissulaire. Le coefficient de diffusion est dépendant de la longueur d'onde de la lumière, il augmente quand cette dernière diminue. Que ce soit par simulation ou par le biais d'expérimentations *in vivo*, la littérature montre que la lumière visible (400 à 700 nm) ne se propage généralement pas à plus d'un millimètre de profondeur dans le cerveau. De plus, avec des longueurs d'onde d'excitation de l'ordre de 473 nm, l'intensité de la lumière émise

est atténuée de 80-90 % aux alentours de 0,5 mm ^[280-282]. Cette faible profondeur de diffusion de la lumière dans le cerveau implique donc l'implantation de la source d'excitation (par exemple, une fibre optique) si l'on souhaite émettre de la lumière dans des zones profondes du cerveau.

Dans notre cas, la présence de glioblastomes pouvant se situer dans des zones profondes du cerveau nécessitait de devoir implanter correctement et localement notre source d'excitation lumineuse.

1.2. Effets photoélectriques

Le développement des méthodes optogénétiques et des protéines fluorescentes a induit un besoin de dispositifs bioélectroniques alliant la détection électrique et optique. L'optogénétique est une technique qui implique l'utilisation de lumière pour contrôler les cellules de tissus vivants, généralement des neurones, qui ont été génétiquement modifiés pour exprimer des canaux ioniques sensibles à la lumière. Il s'agit d'une méthode de neuromodulation qui utilise une combinaison de techniques optiques et génétiques dans le but de contrôler et de surveiller les activités de neurones individuels dans les tissus vivants, afin de mesurer précisément les effets de ces manipulations en temps réel par le biais de microélectrodes par exemple ^[283]. Bien que les premières équipes ayant combiné l'électronique et l'optique furent particulièrement enthousiastes, il a été rapidement montré que des précautions devaient être prises afin de prévenir des artefacts pouvant impacter de manière sévère les données et compliquer leur interprétation ^[284-288]. Ces artefacts sont souvent rassemblés sous le terme d'effets photoélectriques (**Figure III-5**), composé majoritairement des effets d'origine photoconductrice et photothermique générés par l'onde lumineuse.

Un effet photoconducteur est l'augmentation de la conductivité électrique d'un matériau par l'absorption de lumière. Dans le cas des conducteurs métalliques, le courant généré est proportionnel à la surface du matériau exposée à la lumière et à l'intensité de cette dernière.

Un effet photothermique intervient généralement lorsqu'un photon transfère son énergie à un électron, et que l'énergie absorbée par le matériau exposé entraîne une production de chaleur.

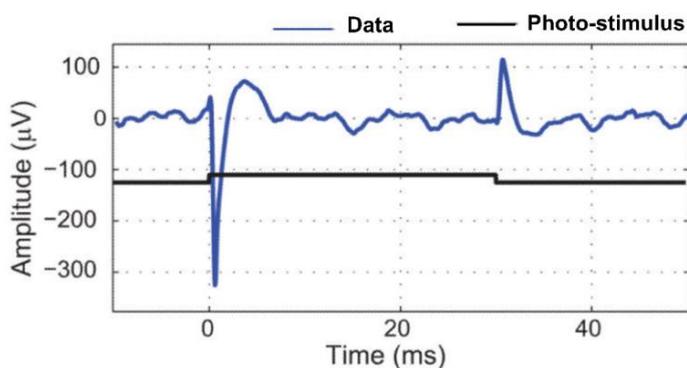


Figure III-5. Exemple de perturbations photoélectriques.

Sur une électrode en tungstène implantée à une profondeur de 200 µm dans le cortex lors d'une stimulation optique délivrée par une fibre optique placée à la source du cerveau couplée avec un source laser (473 nm) et avec une puissance en sortie de fibre de 1 mW. (T. Kozai et A. L. Vasquez, 2015 ^[286]).

D'un côté, les effets photoconducteurs se révèlent généralement par une variation conséquente du courant mesuré en réponse à l'excitation lumineuse. L'interaction entre l'onde électromagnétique de la lumière et les électrodes peut donc entraîner des artefacts de mesure masquant l'effet physiologique étudié si la dynamique de ce dernier est rapide. D'un autre côté, les effets photothermiques peuvent altérer la réponse du biocapteur par une augmentation de la température de l'enzyme à la surface de la microélectrode.

Plusieurs méthodes peuvent être employées afin de limiter, voire de supprimer ces artefacts. Une première est d'éloigner suffisamment la source d'excitation lumineuse des microélectrodes afin qu'elles ne soient plus exposées à l'onde lumineuse. Une autre méthode est d'utiliser la source d'excitation optique de manière pulsée avec une durée de pulse d'excitation inférieure à la dynamique de l'évènement que l'on souhaite mesurer, et d'entraîner qu'une brève exposition de la zone étudiée. Enfin, les microélectrodes peuvent être protégées de l'onde optique par des matériaux absorbants. Une énergie plus importante provenant des photons serait donc nécessaire afin de déclencher un effet photoélectrique.

2. Conception de la microsonde

La microsonde proposée est représentée schématiquement sur la **Figure III-6**. Une structuration en forme de pointe a été choisie à l'extrémité de la partie implantable afin de faciliter l'insertion de l'aiguille de manière précise dans le tissu cérébral, et de minimiser les dommages engendrés par son implantation. Le silicium (Si) a été choisi comme matériau de base pour la structure de la sonde en raison de ses propriétés mécaniques qui offrent une rigidité nécessaire pour pénétrer les tissus et une excellente résistance à la flexion. En outre, comparativement à une structure en céramique, le Si peut être facilement structuré à l'aide

des technologies de fabrication MEMS. Par exemple, le Si peut être gravé de manière précise afin de définir l'épaisseur mais aussi la forme que l'on souhaite, alors que les plaques de céramique possèdent une épaisseur fixe, généralement de l'ordre de la centaine de micromètres. Enfin, pour minimiser les interférences pouvant survenir entre la mesure ampérométrique et la mesure de fluorescence (*id est* les effets photoélectriques), la fibre optique est insérée le long de l'aiguille sur la face opposée aux microélectrodes.

Notre prototype comprend une partie implantable, la micro-aiguille, d'une longueur de 6 mm, d'une largeur de 340 μm et d'une épaisseur de 60 μm . La longueur de la micro-aiguille permet donc de l'implanter dans n'importe quelle zone du cerveau d'une souris ou d'un rat. A l'extrémité de l'aiguille, deux électrodes en platine de 7850 μm^2 ont été micro-structurées à 340 μm de l'extrémité de l'aiguille et avec un espacement de 200 μm (**Figure III-8 D**). Afin d'augmenter la résistance mécanique du dispositif, l'aiguille est solidaire du corps par le biais d'extrémités arrondies, dont l'épaisseur a été conservée sur des zones de renforcement. (**Figure III-6 encart**). Le confinement des enzymes destinées à la reconnaissance moléculaire est assuré par des micro-puits, obtenus par photolithographie à partir d'une couche de résine photosensible de type SU-8. Les puits limitent également la diffusion du H_2O_2 entre les électrodes ^[103]. La couche de résine SU-8 assure aussi l'isolation électrique par rapport au substrat en Si des lignes de contact en platine qui conduisent le courant des électrodes vers les plots de contact. De plus, un canal a été gravé tout le long de l'aiguille afin d'y insérer une fibre optique d'un diamètre extérieur de 240 μm . La résine SU-8 a été utilisée pour ses propriétés d'isolation électrique, son excellente résistance mécanique et chimique, ses capacités de réticulations permettant de réaliser des structures avec un fort rapport d'aspect en hauteur, et enfin pour sa biocompatibilité ^[289-292]. Les structures en anneaux de chaque côté du corps de la sonde servent au maintien de celle-ci lors de l'insertion de la fibre optique dans le canal.

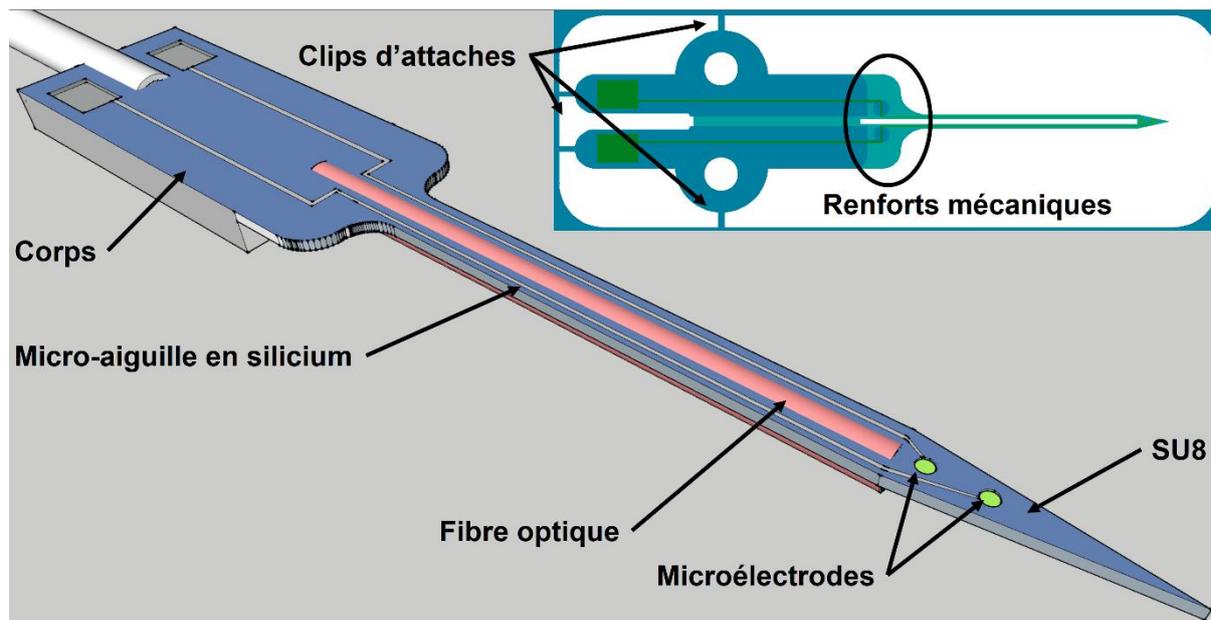


Figure III-6. Schéma 3D de la microsonde.

Réalisé avec le logiciel SketchUp (encart : masque de photolithographie réalisé sous CleWins).

3. Fabrication

Les sondes ont été fabriquées à partir de plaques de silicium <100> de diamètre 4 pouces et de 250 μm d'épaisseur, poli sur les deux faces. L'ensemble des étapes de fabrication qui vont suivre ont été réalisées au sein de la plateforme Nanolyon (Lyon) et de celle de MIMENTO (Besançon). Une couche de SiO_2 a été formée sur les deux faces par croissance thermique (**Figure III-7 A.**). Sur la face supérieure, les motifs des microélectrodes pour la détection électrochimique, des pistes conductrices et des plots de contact ont été structurés par photolithographie sur une résine photosensible AZ5214 en mode négatif (**Figure III-7 B.**). Cette étape a été suivie par des dépôts de 15 nm de Cr et de 100 nm de Pt par pulvérisation cathodique ou de 15 nm de Ti et de 100 nm de Pt par évaporation selon les lots (**Figure III-7 C.**). Le lift-off de la résine non développée a été effectué dans de l'acétone, et les substrats ont ensuite été nettoyés à l'éthanol (**Figure III-7 D.**). Puis, les plaques ont été séchées sur une plaque chauffante à 200°C pendant 10 minutes afin d'évaporer toute molécule d'eau restant sur la surface. Puis, une couche d'isolation de SU-8,2005 de 4,8 μm d'épaisseur a été déposée par centrifugation (« spin-coating », en anglais) et illuminée à travers un second masque formant des micro-puits autour des microélectrodes et des plots de contact (**Figure III-7 E.**). La forme de la micro-aiguille a été

définie en utilisant un troisième masque par photolithographie d'alignement double face avec des couches positives de 3,4 μm d'épaisseur d'AZ ECI 3027 sur le dessus et le dessous de la plaque. L'oxyde non protégé a été éliminé par gravure humide dans une solution de BHF (acide fluorhydrique tamponné), la micro-aiguille de silicium de 60 μm d'épaisseur dotée de son canal pour la fibre optique a ensuite été libérée par gravure ionique réactive profonde (DRIE, de l'anglais Deep Reactive Ion Etching) lors des étapes suivantes sur le dessus et le dessous (Figure III-7 F.). Après avoir enlevé la résine résiduelle AZ ECI 3027, les plaques ont été nettoyées dans de l'eau dé-ionisée bouillante ainsi qu'à l'acétone et à l'éthanol (les conditions précises de chaque étape de fabrication sont indiquées dans l'Annexe 2). De fines parties de Si ont été laissées sur chaque côté du corps et au niveau de la partie arrière de la microsonde afin d'être rompues et ainsi de pouvoir détacher facilement les microsondes des plaques (Figure III-6 encart). Cela présente également l'avantage de pouvoir conserver le plus longtemps possible les microsondes fixées à la plaque de silicium, et ainsi d'éviter que les aiguilles ne se brisent par une manipulation individuelle.

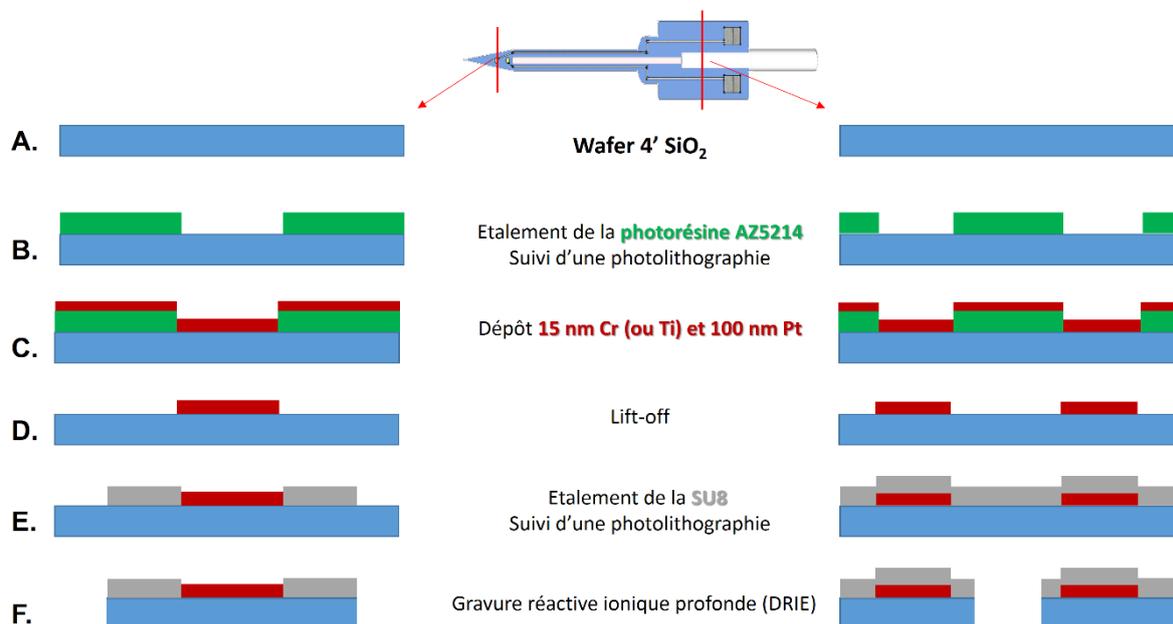


Figure III-7. Protocole de fabrication de la microsonde.

La fabrication de 32 microsondes a été réalisée avec succès (Figure III-8 A.). La photographie 8 B. et la photographie au microscope électronique à balayage (MEB) III.8 C. montrent que la structure de l'aiguille a résisté au décrochage du substrat et que les contacts électriques ont bien été fabriqués. La Figure III-8 D. permet de voir que la résine

SU-8 a été étalée de manière homogène et sans fissure apparente sur sa surface, de plus la **Figure III-8 E.** montre une surface homogène de Pt et un alignement correct d'une microélectrode.

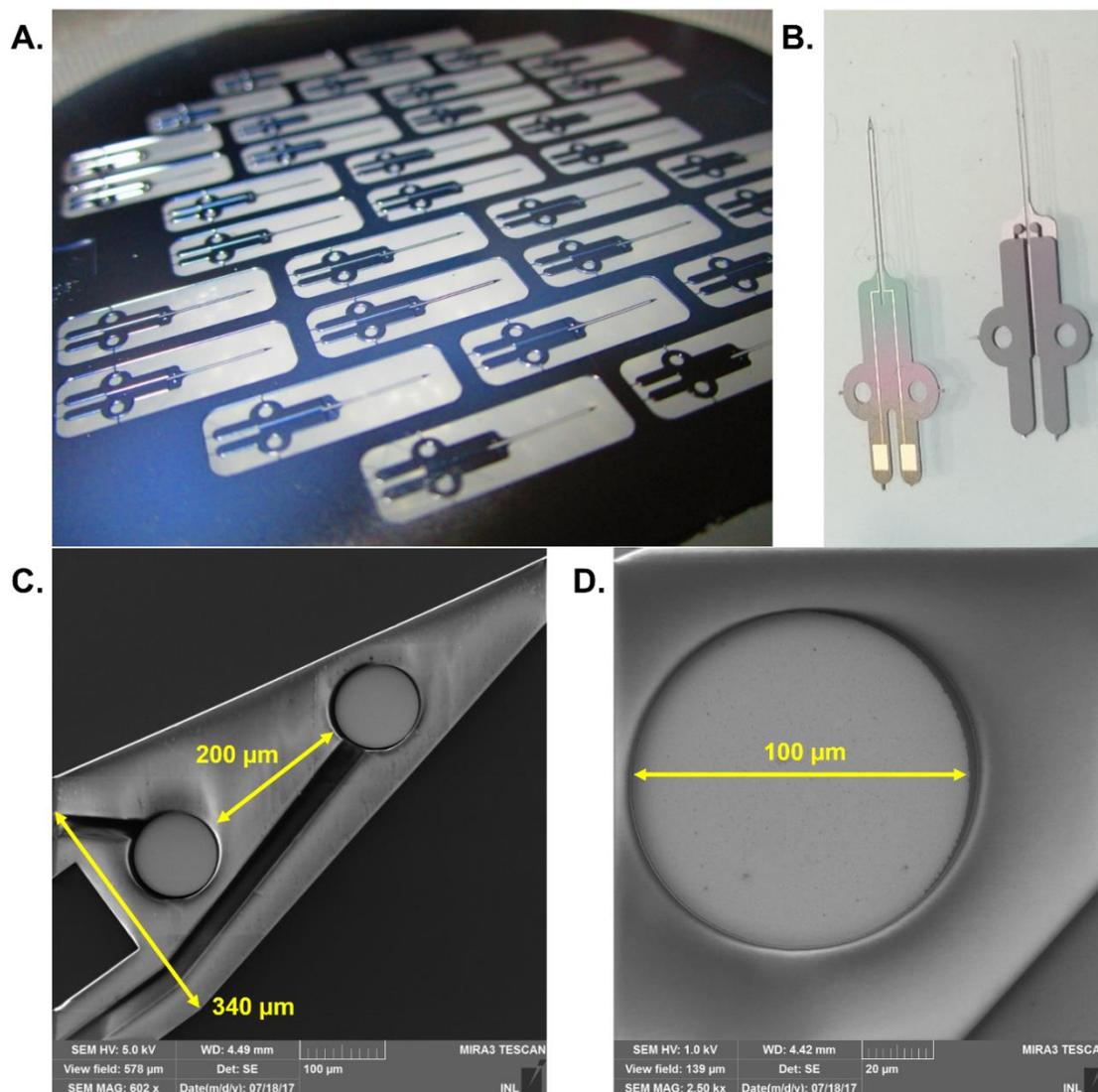


Figure III-8. Microsondes fabriquées.

A. Photographie d'un substrat face arrière post fabrication. **B.** Photographie de deux microsondes, l'une face avant, l'autre face arrière. Photographies MEB de la pointe avec les deux microélectrodes (**C.**) et d'un zoom sur une microélectrode (**D.**).

Une fois détachée, une fibre optique dénudée sur toute la longueur de la sonde est insérée et alignée le long du canal, puis fixée à l'aide d'une colle époxy au corps de la sonde (**Figure III-9 A.**). Enfin, les microsondes sont montées sur des plaques en céramique dotées de pistes en cuivre et de connecteurs. Une liaison est créée entre les plots de contact de la sonde et les pistes par des fils d'aluminium de 35 μm de diamètre à l'aide d'une machine de « bonding » (K&S, Model 4523) au sein de la plateforme PTA (Grenoble). Ces connexions sont par la

suite isolées électriquement à l'aide d'une colle époxy sensible aux UV (Epotecny NOA 61) (**Figure III-9 B.**). La **Figure III-9 C.** montre une microsonde prête à être biofonctionnalisée.

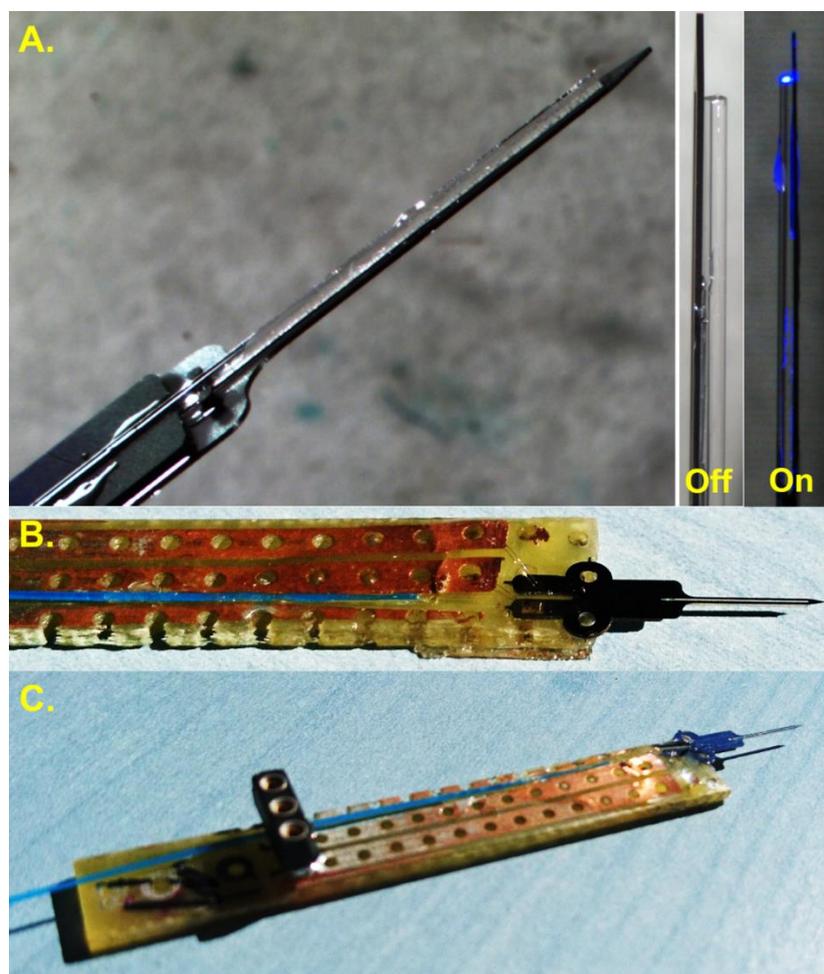


Figure III-9. Photographies des différentes étapes du montage d'une microsonde.
A. Insertion d'une fibre optique dans le canal prévu à cet effet le long de l'aiguille, avec un test d'injection optique provenant du laser. **B.** Connexion à l'aide de microfils d'aluminium des plots de contact électrique d'une microsonde sur une plaque en céramique recouverte de pistes en cuivres. **C.** Vue d'ensemble de la microsonde et de son support.

IV. Caractérisation du système

La mission de notre dispositif est de réaliser une double mesure simultanée : une mesure électrochimique (ici, une détection de concentration de lactate en temps réel) et une mesure optique (une détection de fluorescence). La **Figure III-10** résume l'ensemble du système de mesure. Les niveaux basaux de lactate dans le fluide interstitiel sont de l'ordre du mM et de plus fortes concentrations sont attendues aux alentours des cellules. Le choix de la mesure du lactate dans un premier temps a été motivé par un besoin en sensibilité moins

important de la part des biocapteurs électrochimiques comparé à une mesure du glutamate par exemple.

Les données présentées dans cette partie sont sous la forme de la moyenne \pm écart-type. La comparaison entre plusieurs groupes de données a été effectuée par test d'analyse de la variance (one-way ANOVA) suivi d'un test post-hoc de comparaison multiple de Tukey dont le seuil de significativité a été fixé à $P < 0,05$.

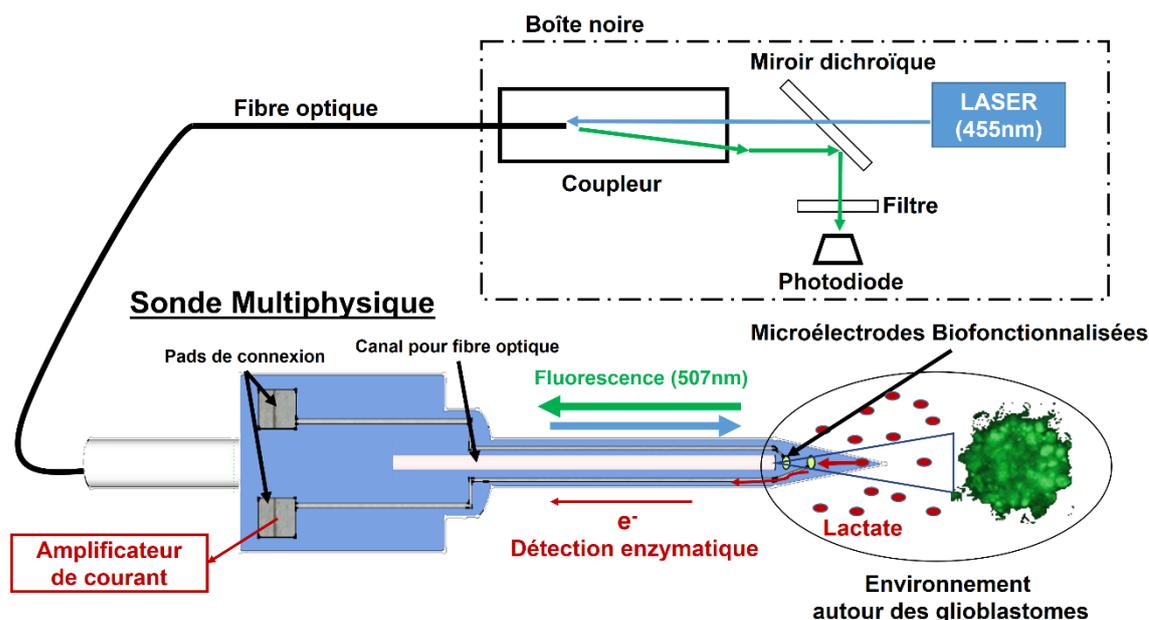


Figure III-10. Schéma récapitulatif du principe de la mesure opto-électrochimique de notre système.

1. Détection enzymatique du lactate au moyen de microélectrodes planes en platine

Le suivi de la concentration de lactate autour des cellules tumorales est réalisé par le biais des microélectrodes, et plus précisément par l'oxydation du H_2O_2 produit par la réaction enzymatique sur la microélectrode (comme décrit au **Chapitre I – Partie III. 1**). Dans cette partie, les mêmes protocoles d'étalonnage qu'employés au **Chapitre II** ont été utilisés.

1.1. Détection du H₂O₂

Tout comme au **Chapitre II**, les performances des microélectrodes sont évaluées en fonction de leur capacité à oxyder le H₂O₂. La procédure de fabrication des microélectrodes fut identique à celle employée par Vasylieva *et al.*^[103] à la différence près que la surface de nos microélectrodes était inférieure de seulement 150 μm² (8000 μm² contre 7850 μm²) et qu'une dilution légèrement différente de la résine SU-8 a été utilisée (la SU-8,2005 au lieu de la SU-8,2002). Ce changement de dilution de la résine SU-8 a été motivé par le fait que l'on ait obtenu des étalements plus reproductibles et plus uniformes avec la SU-8,2005 dû à une plus faible viscosité.

Suite à la fabrication des microsondes et à leur montage, les microélectrodes ont été testées au H₂O₂ par le biais de trois injections successives à 1 μM dans une solution tampon de phosphate salin (PBS) (0,01 M, pH 7,4). Mais aucun courant de base ne circulait entre les microélectrodes et la référence (Ag/AgCl), et aucune oxydation du H₂O₂ ne se produisait sur leur surface (**Figure III-11**). Cela laissait supposer que leur surface n'était pas en contact avec la solution et que des résidus de SU-8 pouvaient être encore présents. Les substrats ont donc été immergés pendant 5 minutes dans de l'acide sulfurochromique (H₂SO₄ - (K₂/Na₂) Cr₂O₇) dans le but d'enlever d'éventuels résidus de SU-8 sur les microélectrodes et les plots de contact. Ce nettoyage a permis l'apparition de courants de base et l'oxydation du H₂O₂. Les microélectrodes montraient un comportement normal avec une réponse en courant linéaire en fonction de la concentration au H₂O₂ et leur sensibilité moyenne était de $5,10 \pm 1,27 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ au H₂O₂ (n = 10). Ensuite, les microélectrodes ont été nettoyées et activées par voltamétrie cyclique dans une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 1 M. Ce traitement a été réalisé en appliquant un potentiel cyclique entre -1 V et 1 V (vs Ag/AgCl) 20 - 30 fois avec une vitesse de 100 mV.s⁻¹ jusqu'à ce que leur réponse soit stable. Cette procédure a permis d'augmenter significativement leur sensibilité à $7,64 \pm 0,64 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ (n = 10). Mais ces sensibilités étaient tout de même significativement inférieures, bien que du même ordre de grandeur, à celles obtenues par Vasylieva *et al.*^[103], $12,5 \pm 2,5 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ (n = 6 ; test one-ANOVA suivi par un test post-hoc de Tukey, F = 126,0, P < 0,001).

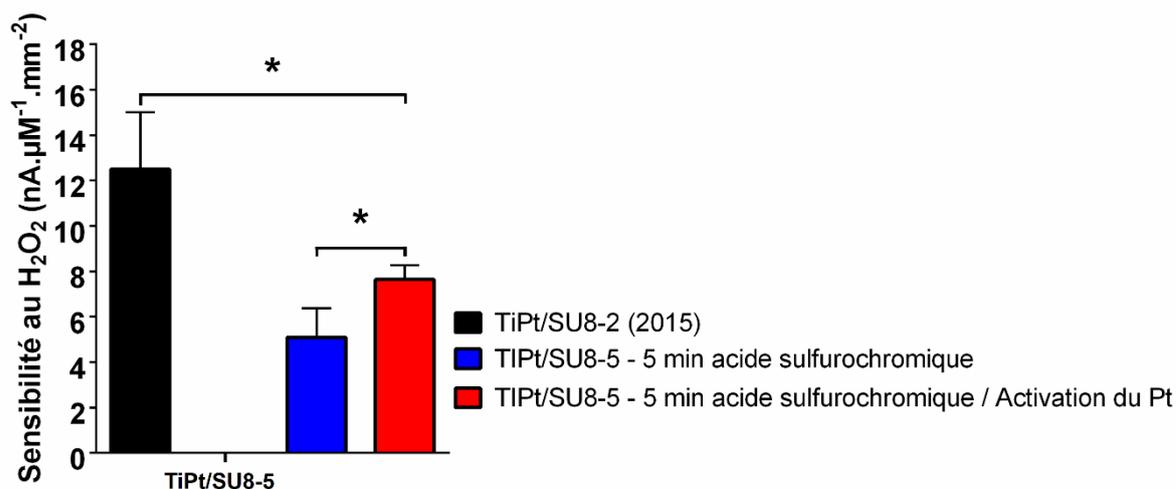


Figure III-11. Comparaison de la sensibilité au H₂O₂ des microélectrodes après avoir subi certains traitements.

Il faut noter que les microélectrodes de la première colonne (noire) ont subi une activation du Pt par voltamétrie cyclique dans une solution d'acide sulfurique à 1 M, mais pas d'attaque à l'acide sulfurochromique comme dans le cas de ce travail (* : différence significative ; test one-ANOVA suivi par un test post-hoc de Tukey, F = 126,0, P < 0,001).

En outre, les microélectrodes n'ayant subi aucun nettoyage ont été immergées dans une solution de ferricyanure de potassium (K₃[Fe(CN)₆]) à 10 mM dans 0,5 M de chlorure de potassium (KCl) à température ambiante (25°C). Des tests par balayage de potentiel à 100 mV.s⁻¹ entre -0,5 V et 0,5 V (vs Ag/AgCl) ont été réalisés. Lors de l'utilisation de ferricyanure, on parle généralement du couple redox ferricyanure/ferrocyanure. Ce couple a l'avantage de présenter une réaction redox réversible et dont la réaction se produit très facilement sur la plupart des matériaux conducteurs. La **Figure III-12 A.** présente un exemple d'un cycle de balayage d'une microélectrode non nettoyée et d'un fil de platine massif. Si l'on suppose que le problème de détection du H₂O₂ et l'absence de courant de base provenait uniquement du fait de l'obstruction par la SU-8 de la surface de la microélectrode, nous ne devrions pas observer de réaction redox du couple ferricyanure/ferrocyanure. Au contraire, on voit clairement apparaître un pic d'oxydation et de réduction caractéristique du couple. De plus, des microélectrodes ont été fabriquées en remplaçant la résine SU-8 par une autre résine photosensible, l'AZ5214. Sans aucun traitement appliqué à ces microélectrodes, un courant de base était présent et le H₂O₂ pouvait s'oxyder. Des voltammogrammes cycliques sur des microélectrodes avec de la résine SU-8 et AZ5214 ainsi qu'avec des électrodes nues ont aussi été réalisés dans une solution d'acide sulfurique à 1 M avec une vitesse de balayage de 100 mV.s⁻¹ entre -0,2 V et 1,5 V (**Figure**

III-12 B.). Aucun courant d'oxydation ni de réduction n'a été observé sur les microélectrodes avec SU-8 comparé à celles avec AZ5214 et à nu. Ces résultats révèlent donc que le problème de performance électrochimique des microélectrodes ne provient pas d'un développement incomplet de la résine SU-8 lors de la fabrication, mais semble indiquer une interaction de nature chimique entre le Pt et la résine SU-8 (la voltamétrie cyclique a été réalisée au sein du laboratoire Ampère).

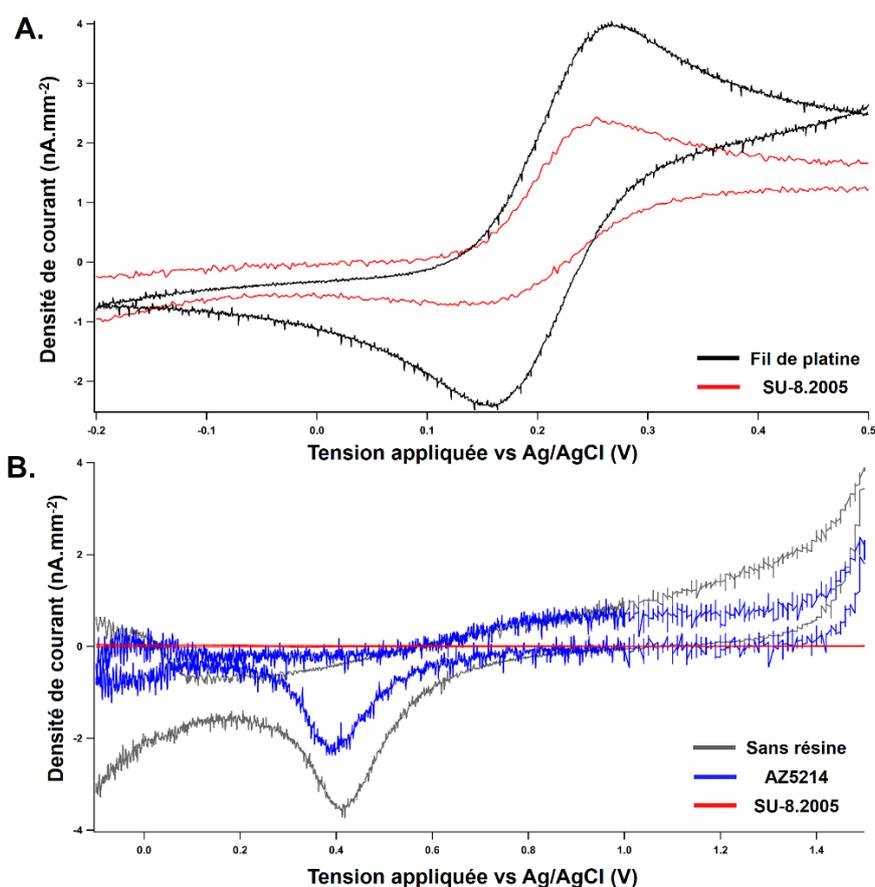


Figure III-12. Exemples de cycles par voltamétrie.

A. D'un fil de platine massif et d'une microélectrode avec un puits en SU-8,2005 n'ayant subi aucun traitement dans une solution de $K_3[Fe(CN)_6]$ à 10 mM dans 0,5 M de KCl à température ambiante et à l'air. **B.** D'une microélectrode à nu (sans puits), d'une deuxième avec un puits en résine AZ5214, et d'une troisième avec un puits en SU-8,2005 dans une solution d'acide sulfurique à 1 M dans du PBS (0,01 M, pH 7,4). Aucune de ces microélectrodes n'a subi de traitements.

Ces observations liées aux interactions entre des composés chimiques contenus dans la solution aqueuse de SU-8 et des électrodes ont été rapportées pour des électrodes en or [289]. La résine SU-8 est enrichie avec trois principaux éléments. Le monomère SU-8 constitue la base de la résine, il est mélangé à un solvant, le cyclopentanone, et à des photo-

générateurs d'acide (PAG), des sels de triarylsulfonium et d'hexafluoroantimoniate, qui auront le rôle d'initier la polymérisation suite à une insolation aux UV. Le procédé de structuration de la SU-8 se décompose en 4 étapes :

- L'étalement, par « spin-coating » ;
- Le premier recuit « soft-bake », permettant d'évaporer partiellement le solvant et ainsi, de commencer à solidifier la résine ;
- L'insolation aux UV, phase durant laquelle les sels (PAG) se décomposent dans les zones insolées générant un acide fort de Bronsted qui initialise la polymérisation cationique ;
- Le second recuit « hard-bake », ayant pour rôle d'activer la réticulation et de durcir la résine.

Bien que des paramètres spécifiques pour réaliser chacune de ces étapes soient stipulés de manière précise dans la documentation selon la formulation de résine choisie et l'épaisseur souhaitée, une optimisation sur chacune de ces phases est nécessaire. Dans sa thèse, C. Christophe montre que les électrodes présentaient une diminution de leur sensibilité après avoir subi des balayages en potentiel directement dans une solution de résine SU-8. De surcroît, l'étape de « hard-bake » semble avoir une influence particulière sur cette modification de surface. Il ressort des travaux de C. Christophe que des composés contenus dans la solution de résine SU-8 pourraient passiver l'électrode sous-jacente selon le type de SU-8 et les conditions avec lesquelles la résine a été structurée.

La sensibilité au H_2O_2 de nos microélectrodes inférieure à celle obtenue par Vasylieva et al.^[103] pourrait donc provenir d'une passivation de la surface du Pt par des composés électro-actifs contenus dans la résine. Par exemple, les paramètres du second recuit (hard bake) tels que la durée et la température ne sont peut-être pas optimaux et par conséquent la polymérisation et la réticulation ont peut-être été incomplètes. Des éléments électro-actifs pourraient donc encore être présents amenant ainsi la couche de SU-8 à ne pas être totalement inerte électrochimiquement et à passiver irréversiblement la surface du Pt lorsqu'un potentiel y est appliqué.

2. Biofonctionnalisation

Afin de rendre sélectives les microélectrodes aux molécules autres que le H_2O_2 , une couche de polyphénylènediamine (PPD) a été déposée par électro-polymérisation de m-phénylènediamine (100 mM dans une solution de PBS à 0,01 M et pH 7,4) en appliquant un potentiel de 700 mV (vs Ag/AgCl) pendant 20 minutes. Dans le même sens que ce qui a été observé dans le **Chapitre II - III.1** sur les fibres de carbone platinées, l'électro-polymérisation de la m-PD a induit une diminution significative de la sensibilité au H_2O_2 . Une perte de sensibilité de $86 \pm 12 \%$ a été observée après fonctionnalisation avec la PPD, et une sensibilité au H_2O_2 finale de $0,76 \pm 0,93 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ($n = 5$) a ainsi été obtenue. Cette diminution de la sensibilité au H_2O_2 suite à la fonctionnalisation avec la PPD n'ayant pas été observé sur des fils de Pt massifs mais lors de dépôts de Pt en couche mince quelle que soit la géométrie (planaire ou cylindrique (voir **Chapitre II - III.1**)) semble indiquer un lien entre l'état physique de la couche de Pt et sa détérioration par l'électro-polymérisation de la PPD. Il faut aussi remarquer qu'un fort écart-type entre les microélectrodes, même entre celles d'une même microsonde, est apparu après la fonctionnalisation avec la PPD.

Bien que la sensibilité au H_2O_2 des microélectrodes après fonctionnalisation avec la PPD soit faible, elle reste suffisante pour les fortes concentrations de lactate attendues *in vivo*. Pour les expérimentations *in vivo*, une microélectrode sera biofonctionnalisée pour la détection du lactate et la seconde avec de la BSA pour en faire un biocapteur contrôle. Dans la suite de ce chapitre, les deux microélectrodes ont été biofonctionnalisées pour une détection du lactate afin d'évaluer les caractéristiques *in vitro* de la microsonde. Ce choix a été fait afin d'évaluer si la distance des microélectrodes par rapport à la fibre optique aurait un impact sur les perturbations photoélectriques provenant de l'excitation optique. Dans ce sens, et pour limiter la diffusion de l' H_2O_2 d'une électrode à l'autre, les enzymes doivent être déposées de manière très précise et en petite quantité afin d'être présentes uniquement au sein des puits en SU-8. Pour cela, un dépôt de 3 gouttes de 1 nL de solution contenant l'enzyme oxydase a été délivré à l'aide d'une pico-pompe sur les deux microélectrodes. Le système était composé d'un capillaire en verre étiré avec une ouverture de l'ordre de 40 μm de diamètre qui contenait la solution enzymatique et d'une picopompe pneumatique capable de délivrer des impulsions d'azote contrôlées (en pression et en durée) afin d'éjecter la quantité désirée d'enzymes. De même qu'au **Chapitre II**, la solution enzymatique était composée de 60 mg/mL de lactate oxydase de *Pediococcus sp* dans 0,01 mL de PBS à pH

7,4 avec 1% de glycérol, 60 mg/mL de BSA et 20 mg/mL de PEGDE qui servait d'agent d'immobilisation de l'enzyme. La réaction d'immobilisation a ensuite été induite en plaçant les microsondes dans une étuve à 57°C pendant 2 heures. De fortes concentrations de lactate étant attendues *in vivo*, de l'ordre du mM, des couches de polyuréthane dilué à 5% dans le tétrahydrofurane (THF) ont été déposées de manière localisée à l'aide de la picopompe pour éviter de recouvrir la fibre optique. Dans le même sens que dans le **Chapitre II**, ces couches de polyuréthane permettaient d'augmenter la gamme de réponse linéaire de la détection des biocapteurs. En fonction de la gamme de linéarité obtenue (calculée comme la constante de Michaelis $K_m^{App}/10$, voir **Chapitre I – Partie III. 3.**), des couches successives ont été déposées après évaporation complète du solvant (10 min à température ambiante ; **Figure III-13**). Après biofonctionnalisation, les microélectrodes présentaient une sensibilité au lactate de $0,17 \pm 0,29 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ et une plage linéaire, K_m^{App} , de $2,51 \pm 0,38 \text{ mM}$ ($n = 6$). On peut remarquer que ces caractéristiques enzymatiques pour la détection du lactate sont similaires à celles obtenues dans le **Chapitre II** avec des biocapteurs en fibre de carbone platinée ($0,20 \pm 0,04 \text{ nA} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$) et des biocapteurs conventionnels en fils de platine ($0,14 \pm 0,03 \text{ nA} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$). Malgré la différence de sensibilité au H_2O_2 des microélectrodes comparées à celles réalisées par Vasylieva *et al.*^[103], des microélectrodes pour la détection *in vivo* avec des sensibilités au lactate comparables ont été réalisées.

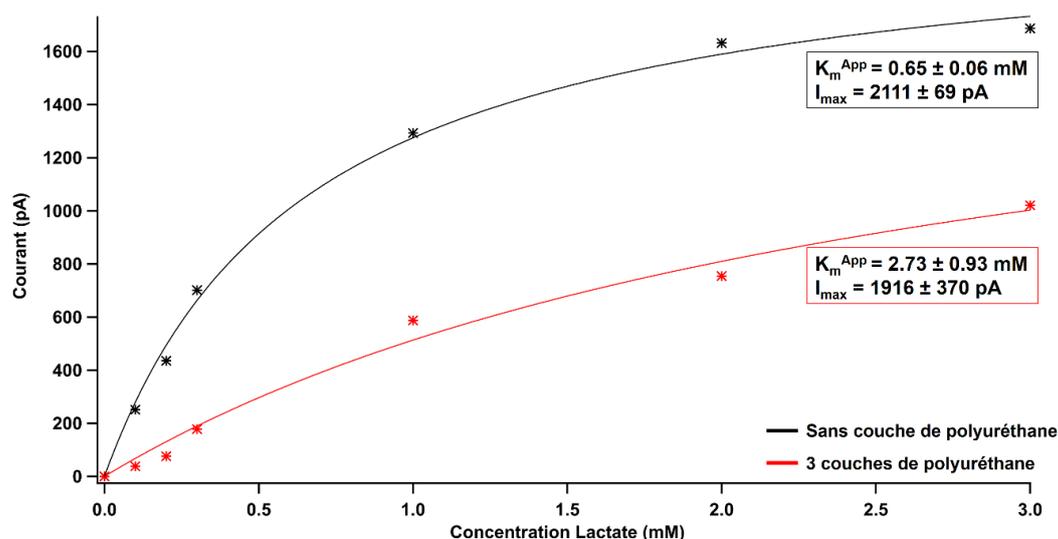


Figure III-13. Exemple d'étalonnage d'une microélectrode biofonctionnalisée.

Correction de la gamme linéaire de la détection du lactate par l'ajout de 3 couches de polyuréthane à 5 % par-dessus l'enzyme. La sensibilité a diminué et la gamme de réponse linéaire a été étendue. Étalonnage réalisé par l'ajout successif de lactate dans une solution de PBS (0,01 M, pH 7,4).

3. Localisation par fluorescence de cellules tumorales modifiées

3.1. Échauffement des tissus

Il a été montré au cours d'expérimentations d'optogénétique, qu'une exposition prolongée du tissu neuronal à une forte intensité de lumière peut causer des changements de température physiologique non négligeables [293,294]. Or, la température est une variable non négligeable pour le bon fonctionnement d'un certain nombre de fonctions du cerveau. Des travaux ont observé sur des tranches de cerveau que l'augmentation ou la diminution de la température des tissus entraîne des changements du potentiel de repos des membranes neuronales et gliales, de leur résistance électrique, de l'activité synaptique, et peut même induire des pics d'activité spontanée [295-297]. Ainsi, les données de la littérature suggèrent qu'un changement de la température induit par une illumination laser peut être suffisant pour modifier l'activité neuronale et hémodynamique [294,298].

Stujenske et al. [299] ont développé un modèle de transport de la lumière dans les tissus cérébraux afin de simuler les changements de température induits par une illumination, qu'ils ont par la suite validé *in vivo*. Ils ont simulé la propagation de manière aléatoire d'un paquet de photons provenant d'une fibre optique par le biais d'un algorithme de Monte Carlo à travers un espace tridimensionnel. Ils ont considéré que les photons pénétraient dans les tissus avec une énergie initiale qui était par la suite absorbée lorsqu'ils se déplaçaient de manière stochastique à travers les tissus, entraînant à la fois l'atténuation de la lumière et l'accumulation de chaleur au sein des tissus traversés. Ils ont ainsi développé un modèle simulant les effets d'une illumination provenant d'une fibre optique sur la température des tissus en prenant en compte la perfusion par les vaisseaux sanguins, la production de chaleur métabolique, ainsi que la diffusion de la chaleur et la convection thermique (**Figure III-14 A**). Ce modèle ainsi que des travaux similaires prédit le phénomène d'échauffement du tissu en réponse à une illumination qui pouvait être décrit par ces différents paramètres et que l'exposition des tissus à une lumière pulsée diminuait drastiquement l'augmentation de température induite par une lumière d'une puissance similaire mais dont l'illumination serait continue temporellement [280,281].

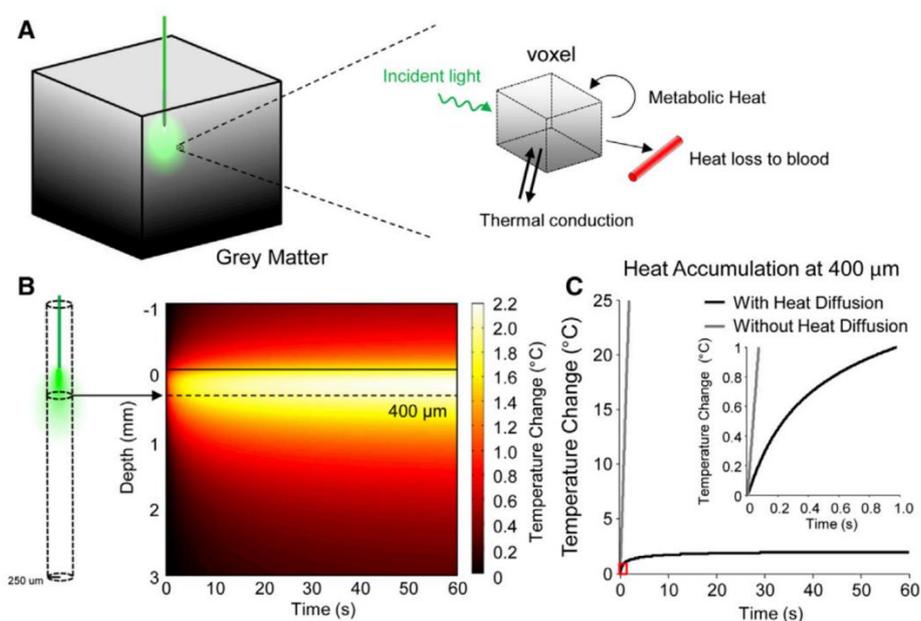


Figure III-14. Modèles de changements de température d'un corps biologique induits par de la lumière.

A. Représentation des paramètres pris en compte pour la simulation Monte-Carlo d'un bloc homogène de cerveau. **B.** Changements de température prédits par le modèle pour une longueur d'onde de 532 nm provenant d'une fibre optique (62 µm, NA 0,22), représentés en fonction de la profondeur de diffusion et du temps d'excitation. La température a été calculée comme une moyenne de la température d'un cercle de rayon de 250 µm. **C.** Variation de la température en fonction de la prise ou non de la diffusion de la chaleur (Reproduit de l'article de Stujenske et al 2015 ^[299]).

Nous avons donc choisi d'utiliser le programme Matlab (disponible dans la version internet de l'article) développé par Stujenske *et al.*^[299] afin de simuler les changements de température qu'induirait l'émission de lumière dans nos conditions (une fibre optique avec un cœur de 200 µm de diamètre et avec une ouverture numérique de 0,22 ; une longueur d'onde d'émission de 445 nm). Des puissances d'excitation de 0,5 mW, 1 mW, 5 mW et 10 mW ont été simulées avec une durée d'impulsion de 1 seconde. Ces puissances sont du même ordre de grandeur que celles utilisées en optogénétique, elles ont donc été choisies afin d'étudier l'échauffement des tissus sur une large gamme d'intensités utilisées. De plus, la durée d'impulsion de 1 seconde est justifiée par la motivation d'évaluer l'impact de ces puissances dans un cas extrême. La **Figure III-15** présente les résultats des changements de température en fonction du temps et de la profondeur (illustré par la **Figure III-14 B**) dans ces quatre cas. Dans la littérature, il a été observé qu'une augmentation de la température supérieure à 1°C peut être suffisante pour produire des changements physiologiques ^[295,300]. A la vue des résultats des simulations, on peut observer que ce n'est

qu'à partir d'une exposition de 1 seconde à 10 mW que la température des tissus augmente au-dessus de 1°C. Alors qu'avec une puissance de 5 mW, la température augmenterait seulement entre 0,5 et 1°C. En nous basant sur les résultats de cette simulation, nous avons opté pour une puissance d'excitation de 5 mW. Ainsi, à la vue de ces résultats et à partir de la littérature, il a été choisi arbitrairement de réaliser la suite des travaux avec des impulsions de 10 ms à 5 mW, qui induirait donc une augmentation de température négligeable et sans impact sur la physiologie des tissus exposés.

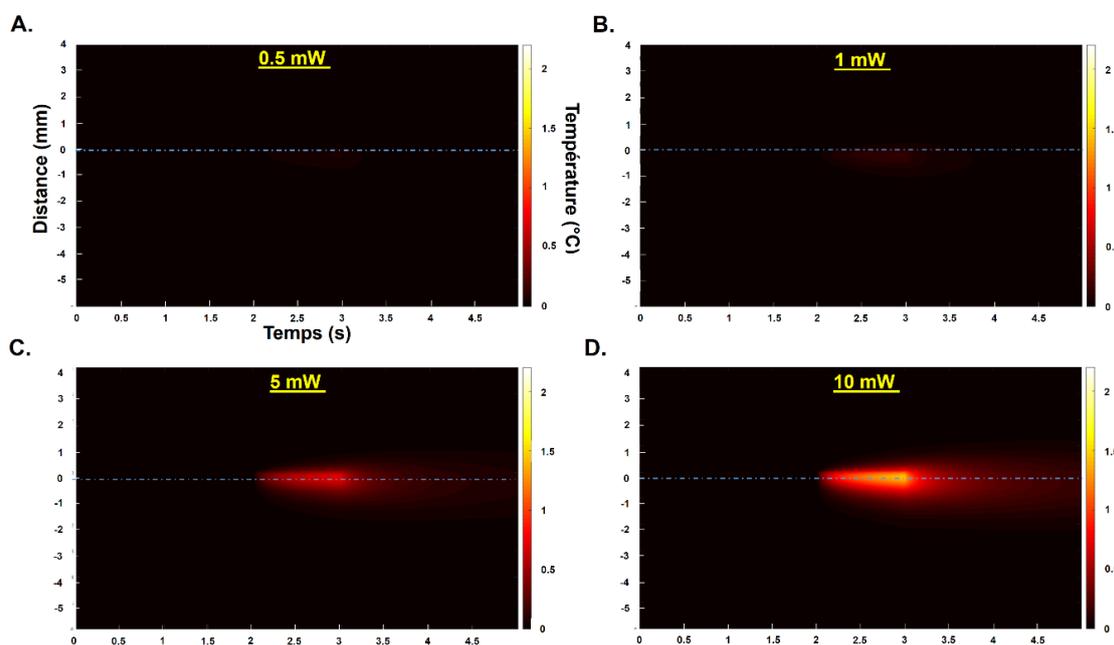


Figure III-15. Simulation de l'effet de la puissance d'excitation sur l'augmentation de la température d'une zone de cerveau exposée par une fibre optique.

Dans les différents cas, la simulation a été réalisée avec une fibre optique dont le cœur a un diamètre de 200 μm et une NA de 0,22, avec une durée d'exposition de 1 seconde. La puissance du laser (445 nm) a été variée entre 0,5 mW (A.), 1 mW (B.), 5 mW (C.) et 10 mW (D.).

3.2. Performance de la détection de fluorescence

Lors de la biofonctionnalisation des microélectrodes, l'aiguille ainsi que la fibre optique sont immergées dans une solution de m-PD. Bien que la PPD ne s'électropolymérise que sur les microélectrodes, le monomère, la m-PD, induit en séchant une teinte brune susceptible de bloquer la transmission de la lumière. Effectivement, il a été noté une

légère atténuation de la transmission du signal d'excitation et de fluorescence de 2 à 3 % après immersion dans la m-PD à 100 mM.

Nous avons ensuite évalué les performances de la détection de la fluorescence de notre système à l'aide de FITC et de cellules gliales exprimant la GFP avec les paramètres d'excitation déterminés précédemment, une puissance d'excitation de 5 mW et une durée d'impulsion de 10 millisecondes. Avec ces paramètres, la sensibilité du système optique pour la détection de la FITC était de $44,2 \pm 5,3 \text{ pA} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ ($n = 5$) avec une détection limite de 275 nM (3 fois le bruit ; $n=5$). Pour les cellules tumorales, différentes quantités de cellules mélangées avec du fluide cérebrospinal artificiel (aCSF) ont été disposées dans des puits de 200 μL . Ces puits ont été peints en noir afin d'éviter toute réflexion de la lumière. Enfin, notre biocapteur a été immergé à quatre reprises dans chacun des puits. La **Figure III-16** montre que le système optique a pu détecter le signal de fluorescence de GFP provenant de faibles différences de concentrations de cellules GL 261 de glioblastomes (test one-ANOVA suivi par un test post-hoc de Tukey, $F = 104,8$, $P = 0,001$), mais surtout que la mesure était reproductible.

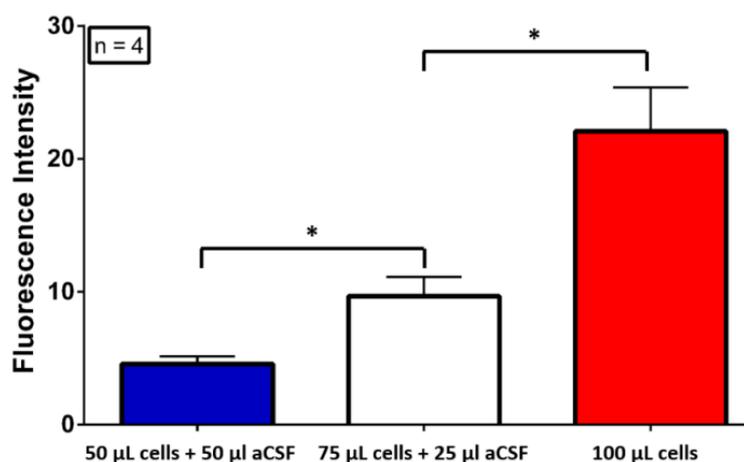


Figure III-16. Détection *in vitro* de fluorescence provenant de glioblastomes dans une solution d'aCSF.

Les différentes colonnes montrent la reproductibilité de la détection de fluorescence sur 4 mesures (* : Différence significative ; test one-ANOVA suivi par un test post-hoc de Tukey, $F = 104,8$, $P = 0,001$).

3.3. Modèle *in vitro* de la localisation par fluorescence de cellules tumorales

Un dispositif d'étalonnage de la détection de la position des cellules tumorales par rapport à la microsonde a été expérimenté. Avec l'intention de simuler des conditions proches de celles *in vivo*, un modèle simplifié des tissus du cerveau a été réalisé à partir d'un

gel d'agarose à 0,6 %. Ce modèle présente des propriétés mécaniques similaires aux tissus [301,302] et un indice de réfraction de 1,33 [303] en comparaison d'un indice de 1,35 dans le cerveau [304]. Ce modèle ne tient pas compte des propriétés de diffusion et d'absorption de la lumière.

Ce dispositif d'étalonnage visait principalement à connaître le comportement de notre capteur optique dans un cas proche de la situation *in vivo*. Nous avons confiné 20 μ L de cellules tumorales dans ce gel d'agarose, puis la microsonde a été déplacé de plus en plus proche de cette agglomération de cellules à l'aide d'un micromanipulateur (**Figure III-17 A.**). La courbe de l'intensité de fluorescence en fonction de la distance entre les cellules et la microsonde obtenue montre une augmentation de manière exponentielle de l'intensité de la fluorescence en fonction de la proximité de la microsonde des cellules. Elle atteint son maximum une fois la fibre optique entièrement immergée dans l'amas de cellule (**Figure III-17 B.**). Ce modèle nous fournit donc des informations sur l'allure du signal de fluorescence que l'on pourrait obtenir *in vivo* en fonction de la distance à laquelle se situe la microsonde du glioblastome. En ajoutant les paramètres de diffusion et d'absorption des tissus à notre modèle, on pourrait s'attendre à une allure similaire mais avec une pénétration de la lumière plus faible impliquant ainsi une limite de la distance de détection plus faible.

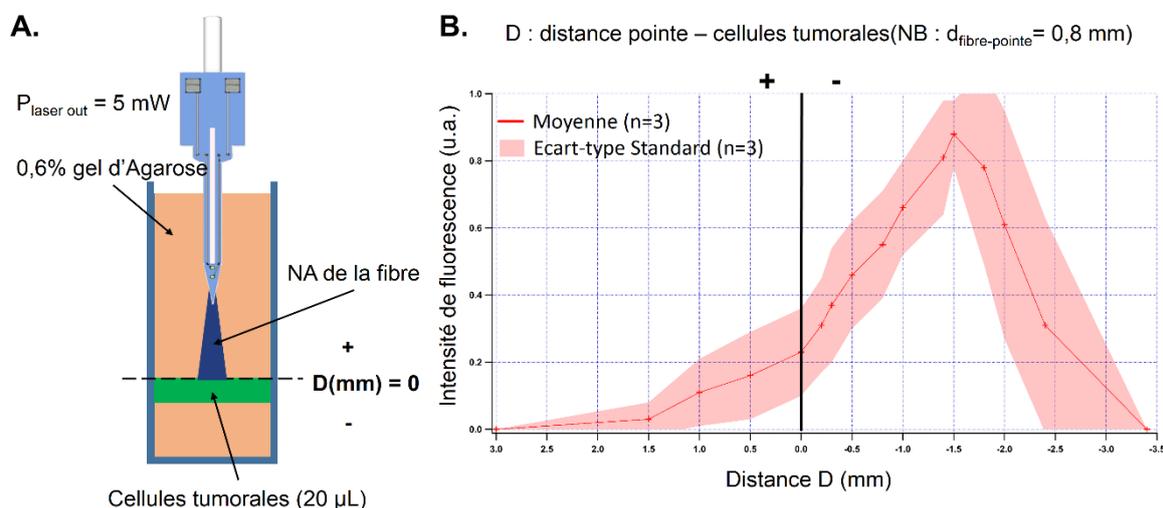


Figure III-17. Modèle d'étalonnage *in vitro* du capteur de position des glioblastomes.

A. Représentation schématique de la procédure de calibration. **B.** Moyenne sur trois exemples de mesures de fluorescence en fonction de la distance entre la pointe de la microsonde et la surface de l'amas de cellules tumorales.

Il est important de retenir que nous ne connaissons pas la concentration de cellules tumorales marquées à la GFP à laquelle on pourrait s'attendre après plusieurs semaines

d'incubation des cellules injectées dans le cerveau de l'animal. En l'absence de la réalisation de tests *in vivo*, ces mesures restent préliminaires et ne peuvent donner qu'un aperçu des performances de notre système *in vivo*. Si nécessaire, un photomultiplicateur (PMT) est prévu afin de remplacer la photodiode et d'augmenter ainsi significativement la sensibilité de la détection de fluorescence. Par ailleurs, ce PMT pourra être couplé avec un filtre diélectrique à faible bande passante (10 ± 2 nm) et avec un fort taux de transmission (80 %). De plus, la double mesure, optique et électrochimique, n'a pas été réalisée dans le cadre de ces expérimentations car nous n'avons pu réussir à faire survivre les glioblastomes dans un tel gel d'Agarose. Ce dernier point appuie l'intérêt de réaliser des expérimentations sur l'animal.

4. Perturbation de la mesure enzymatique par l'excitation optique

Cette dernière partie présente le comportement de la microsonde dans le cas d'une mesure simultanée du lactate et de la fluorescence *in vitro*. Comme cela a été indiqué dans la partie sur la biofonctionnalisation, il a été choisi de réaliser un biocapteur de lactate sur chaque microélectrode. Par convention, la microélectrode située au plus près de la fibre optique sera nommée « Biocapteur A » et la seconde, vers la pointe de l'aiguille, « biocapteur B ».

La fibre optique a été placée sur la face opposée aux microélectrodes dans un objectif de limiter les perturbations provenant de l'excitation optique sur la mesure enzymatique. Ce choix a été fait afin de limiter l'échauffement de l'enzyme qui entraînerait une élévation du courant mesuré et détériorerait son activité. Afin d'évaluer la capacité de la microsonde à atténuer ces perturbations par rapport à un même type de mesure réalisé avec des dispositifs indépendants, la réponse à une excitation optique d'une microsonde avec deux microélectrodes planaires biofonctionnalisées pour la détection du lactate a été comparée à celle de deux électrodes filaires conventionnelles, l'une avec enzyme et l'autre sans, soumises à une exposition lumineuse par une fibre optique placée à 1 mm de la partie sensible de ces dernières (fabriquée à partir de fils de platine de 75 μ m comme décrit au **Chapitre II - Partie I 2.**). Les électrodes étaient immergées dans une solution de 10 μ M de lactate dans du PBS (0,01 M, pH 7,4) et la microsonde dans une solution de 10 μ M de lactate

et 30 μM de FITC dans du PBS. Des FITC ont été rajoutées à la solution avec la microsonde pour simuler une mesure en simultanée de lactate et de fluorescence *in vitro*. Dans les deux configurations, les biocapteurs ont été soumis à une première brève impulsion optique de 10 millisecondes avec une puissance en sortie de fibre optique de 5 mW et à une autre de 1 seconde avec la même puissance. La première, de courte durée, représentait les conditions avec lesquelles nous envisagions de réaliser la détection de fluorescence *in vivo*, et la seconde à une condition extrême de plus longue durée qui a permis de mieux visualiser les perturbations provenant d'une excitation optique sur des mesures électrochimiques. Rappelons que notre objectif est de pouvoir limiter le photo-blanchiment des fluorophores utilisés et de réduire la dynamique temporelle des perturbations photoélectriques.

La **Figure III-18** montre la réponse à une excitation optique des électrodes conventionnelles. Indifféremment de la durée de l'impulsion, une nette élévation du courant mesuré par le biocapteur de lactate a été observée sur la durée de l'impulsion suivie d'un retour à son niveau de base plus ou moins long selon la durée de l'impulsion (**Figure III-18 A. et B.**). Cette augmentation du courant mesuré et le temps de retour au niveau de base étaient d'autant plus élevés que la durée du pulse lumineux était longue. L'allure de ces perturbations suggère un comportement d'échauffement et de refroidissement de l'enzyme, proche d'un comportement du premier ordre, c'est-à-dire à une perturbation de nature photothermique. De plus, la réponse observée dans les mêmes conditions pour une électrode sans enzyme était nettement différente. En particulier, le comportement photothermique n'a pas été observé. Lors des pulses de 10 millisecondes et 1 seconde, des pics transitoires de courant ont été observés avec la même intensité quelle que ce soit la durée d'exposition (**Figure III-18 C. et D.**). Par ailleurs, on note un courant supérieur sur toute la durée de l'impulsion d'une seconde avec un retour direct au niveau de base en fin d'exposition optique suggérant un effet photoconducteur (**Figure III-18 D.**).

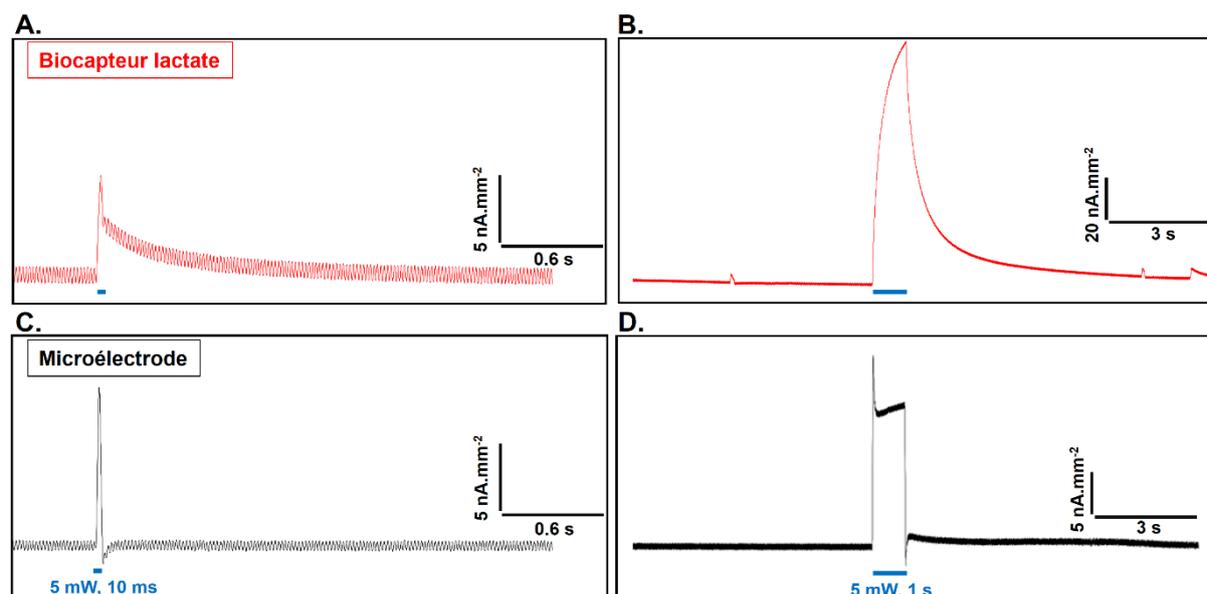


Figure III-18. Exemples de perturbations par l'excitation optique sur des dispositifs conventionnels.

Densité de courant mesurée par un biocapteur conventionnel à fil de Pt biofonctionnalisé avec une enzyme pour la détection du lactate et par une même électrode conventionnelle sans enzyme. Les parties sensibles ont été exposées directement à une excitation optique au moyen d'une fibre optique (240 μm de diamètre, NA : 0,22) placée à 1 mm, avec une impulsion soit de 10 ms à 5 mW (respectivement **A.** et **C.**) soit de 1 s à 5 mW (respectivement **B.** et **D.**). Les deux capteurs étaient immergés dans une solution de 10 μM de lactate dans du PBS (0,01 M, pH 7,4). Les dispositifs ont été fabriqués à partir de fils de platine de 75 μm en suivant la procédure décrite au **Chapitre II – Partie I 2.**

Les réponses des biocapteurs conventionnels mettent en évidence des perturbations de la détection enzymatique suite à l'une excitation optique. De la même manière que cela a été observé avec l'électrode conventionnelle sans enzyme, des effets photoélectriques ont été observés avec la microsonde sous la forme d'un couple de pics transitoires lors du démarrage de l'impulsion et à l'arrêt de celle-ci sur les microélectrodes (**Figure III-19 A.**). Des perturbations comparables en termes de forme et d'allure temporelle (à la montée et la descente des impulsions optiques) ont été observées dans des travaux réalisés en optogénétique [284,286,287]. Deux explications de l'origine de ces signaux perturbateurs peuvent être avancées. Tout d'abord, ces signaux pourraient ne pas être d'origine photoélectrique. Les soudaines montées et descentes d'un fort courant lors de la mise en marche et l'arrêt du laser induit un champ électromagnétique qui pourrait être détecté par les microélectrodes à cause de leur forte sensibilité et de leur forte impédance. Mais cette hypothèse est peu probable due à la distance entre le poste de mesure et le laser (environ 2 mètres) ainsi qu'à la cage de Faraday dans laquelle les mesures sont effectuées. La seconde

explication de l'origine des pics transitoires de courant pourrait être un effet photoélectrique. Comparé au biocapteur conventionnel, aucun effet photothermique n'a été mesuré avec la microsonde quel que soit l'emplacement des biocapteurs sur l'aiguille et lors des deux conditions d'impulsion optique (**Figure III-19 B.**). Seulement une très faible augmentation du courant de base a été mesurée lors de l'impulsion d'une seconde, de l'ordre de 7 % pour le biocapteur A et de 25 % pour le biocapteur B. On pourrait comparer ces perturbations à celles observées sur l'électrode conventionnelle sans enzyme mais avec une intensité beaucoup plus faible qui pourrait être expliqué par une exposition plus faible des microélectrodes à l'onde lumineuse. De plus, la différence d'élévation de courant du biocapteur A par rapport à celle du biocapteur B pourrait être due à une plus faible sensibilité du biocapteur A, mais aussi par une exposition du biocapteur B au flux optique plus importante. L'ouverture numérique de la fibre optique étant faible, le biocapteur A, plus près de la fibre optique, est en effet moins exposé que le B. Enfin, lors de l'impulsion de 1 seconde, une diminution progressive du signal de fluorescence a été mesurée suggérant un photo-blanchiment des FITC soumis à une telle excitation (**Figure III-19**).

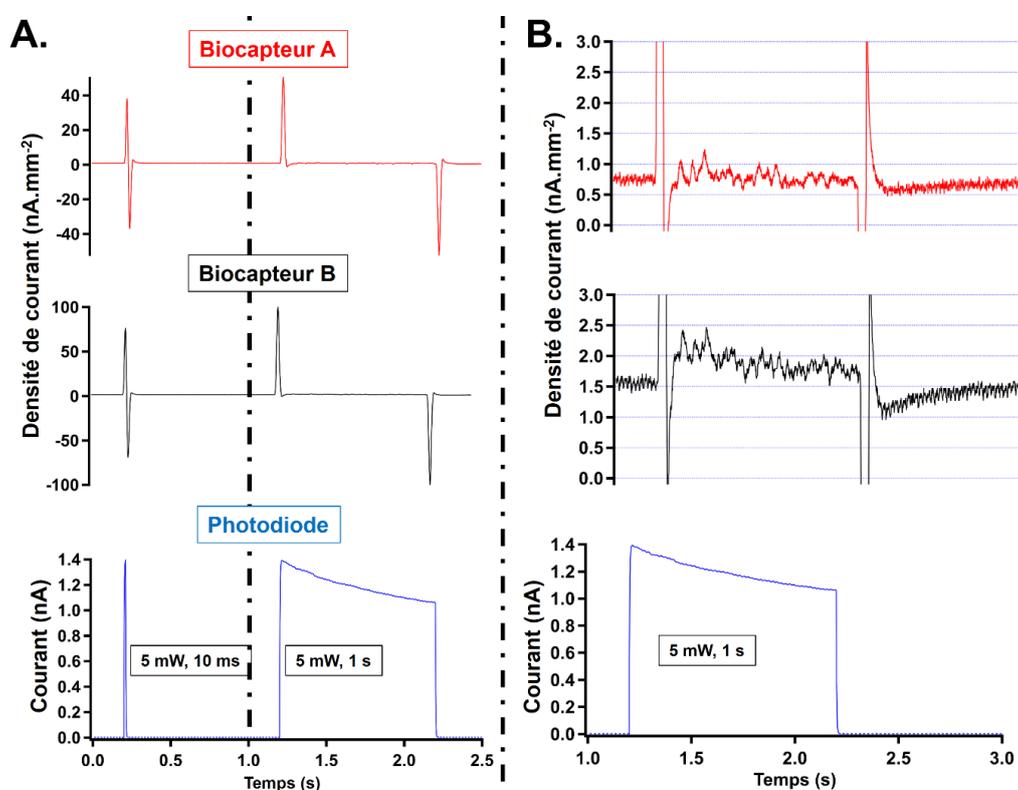


Figure III-19. Perturbations opto-électrique sur une microsonde *in vitro*.

A. Densité de courant mesurée par les biocapteurs d'une microsonde (le biocapteur A en rouge ; le biocapteur B en noir) et courant provenant de la photodiode (en bleu) lors de deux

impulsions de lumière à 5 mW dans une solution de 10 μM de lactate et 30 μM de FITC, la première d'une durée de 10 ms et la seconde d'une durée de 1 s. **B.** Agrandissement du signal mesuré des biocapteurs de lactate lors de l'impulsion de 1 s. Le biocapteur A correspond à la microélectrode biofonctionnalisée la plus proche de la fibre optique et le biocapteur B à la seconde au niveau de la pointe de l'aiguille.

L'intégration de mesures optiques et électrochimiques sur une même microsonde permet la réduction du nombre d'implantation *in vivo*. Et cette étude, a permis de mettre en évidence que, grâce au positionnement de la fibre optique sur la microsonde, on supprime quasiment les effets photothermiques et on réduit les perturbations d'origine photoélectrique dues à l'excitation optique sur la mesure enzymatique. Dans le cadre de l'application *in vivo*, les biocapteurs de lactate ont pour objectif de mesurer la concentration basale du lactate péri- et intratumorale, et non des événements dynamiques. Ces concentrations basales seraient calculées en réalisant la moyenne des mesures sur des durées de l'ordre de 5 à 10 minutes alors que la durée d'un pulse de lumière et donc des perturbations induites sera de l'ordre de la dizaine de millisecondes. Les perturbations photoélectriques observées ne présentent donc pas un problème majeur pour le suivi de lactate basal dans l'environnement de glioblastomes *in vivo*.

V. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons démontré le fonctionnement d'une nouvelle microsonde multiphysique en silicium permettant une détection en temps réel électrochimique enzymatique et optique en fluorescence dans des zones profondes du cerveau. L'intégration d'une fibre optique et de microélectrodes en Pt sur une même micro-aiguille de 6 mm de longueur a été réalisée avec succès à l'aide des technologies MEMS. Le système optique réalisé a permis une détection de la fluorescence performante et reproductible. De plus, ce système possède un large choix de réglages en puissance et en durée d'excitation. Malgré la microfabrication des microélectrodes visuellement satisfaisante, les microélectrodes présentaient des sensibilités à la détection du H_2O_2 de même ordre de grandeur, mais plus faibles en comparaison de travaux précédemment réalisés. Les conditions avec lesquelles la résine SU-8,2005 a été structurée semblent avoir passivé la surface de Pt des microélectrodes, probablement à cause de composés électro-actifs contenus dans la résine. De plus, les sensibilités au H_2O_2 ont fortement diminué à la

suite de l'électro-polymérisation de la PPD comme cela a aussi pu être observé dans le **Chapitre II** avec des fibres de carbone platinées, impliquant donc davantage la structure du Pt exposé à cette fonctionnalisation que sa géométrie. Les sensibilités après fonctionnalisation avec la PDD de seulement certaines microélectrodes ont été suffisantes pour réaliser des biocapteurs de lactate. Enfin, la faisabilité d'une double mesure de lactate et de fluorescence avec la microsonde a été démontrée *in vitro*. Comparées à des dispositifs conventionnels fabriqués à partir de fils de platine, les perturbations d'origine photothermique semblent avoir été supprimées, principalement en raison du positionnement de la fibre optique sur la face de l'aiguille opposée à celle des biocapteurs, de sorte qu'une illumination directe de l'enzyme (par la fibre optique) a été ainsi évitée. Mais des effets probablement photoélectriques, comparables à ceux publiés dans la littérature, ont été observés sous la forme de pics transitoires rapides en début et en fin d'impulsion lumineuse.

Bien que des biocapteurs de lactate suffisamment sensibles pour être utilisés *in vivo* aient été réalisés, une forte variabilité en termes de performance a été observée entre les microsondes biofonctionnalisés, mais aussi entre les microélectrodes d'une même aiguille. Il apparaît nécessaire d'optimiser la structuration de la SU-8,2005, et plus particulièrement la seconde phase de recuit le « hard-bake ». Pour cela, une étude des interactions physico-chimiques entre la SU-8 et le Pt est primordiale pour obtenir des microélectrodes plus sensibles au H₂O₂ et donc par conséquent plus sensible aux molécules d'intérêt. En outre, une meilleure connaissance de ces interactions permettrait de les fabriquer de manière plus reproductible. Un second point d'amélioration sera de limiter voire de supprimer les effets photoélectriques dus à l'excitation optique. Cela pourrait s'avérer utile si l'on souhaite mesurer des événements physiologiques dynamiques rapides nécessitant une haute résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. L'ajout d'un revêtement par un matériau isolant sur la face arrière pourrait bloquer les champs électromagnétiques provenant de la fibre optique. Enfin, au vu des bonnes performances de la détection de la fluorescence, il pourrait être envisagé de miniaturiser le capteur optique et ainsi de diminuer les dommages sur les tissus du cerveau lors de l'implantation soit en employant des fibres optiques avec des diamètres plus faibles, soit en la remplaçant par la microfabrication d'une guide d'onde en polymère.

Une fois l'optimisation des microélectrodes résolue, la mise en œuvre des capteurs opto-électrochimiques permettra d'obtenir une analyse quantitative des concentrations de

glucose, lactate, glutamate et D-sérine dans le milieu interstitiel (par électrochimie) et de déterminer précisément si la mesure est effectuée dans un tissu sain, à l'intérieur de la tumeur ou dans la zone péri-tumorale grâce à la mesure de fluorescence. Une donnée importante sera la distance à partir de laquelle il est possible de détecter électrochimiquement des différences de composition du milieu interstitiel au voisinage de la tumeur. Le calcul des concentrations de glucose, lactate, glutamate et D-sérine permettra aussi de déterminer dans quelle mesure le milieu interstitiel peut devenir toxique pour les neurones en raison d'un stress excitotoxique (excès de glutamate) ou d'une acidose (excès d'acide lactique).

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Ce manuscrit visait à démontrer l'importance de réduire les lésions induites au cerveau lors de l'implantation de dispositifs pour le suivi de neurotransmetteurs et de métabolites. Dans ce sens, deux pistes ont été explorées. La première fut la miniaturisation d'un biocapteur enzymatique à l'aide de fibres de carbone platinées et la seconde la réduction du nombre d'implantations par l'intégration de biocapteurs optiques et électrochimiques sur une unique micro-aiguille.

Des fibres de carbone de 7 μm de diamètre ont été platinées leur permettant ainsi de pouvoir être utilisées pour une détection électrochimique du H_2O_2 , et par conséquent, pour fabriquer des biocapteurs enzymatiques avec des diamètres externes inférieurs à 15 μm . Deux techniques de dépôt PVD ont été employées : l'évaporation et la pulvérisation cathodique. Les microélectrodes réalisées par évaporation ont montré des performances électrochimiques reproductibles et avec des sensibilités au H_2O_2 après fonctionnalisation avec la PPD similaires à des microélectrodes conventionnelles en fil de Pt/Ir massif, tandis que des sensibilités significativement plus élevées ont été obtenues à l'aide de la pulvérisation du Pt permettant potentiellement de fabriquer des biocapteurs pour détecter des molécules présentes à faible concentration dans le liquide interstitiel et nécessitant des sensibilités élevées comme la D-sérine ou le glutamate. Cependant, une faible reproductibilité entre les différents lots obtenus par pulvérisation a été observée. *In vivo*, la miniaturisation de ces biocapteurs a montré une réduction de l'impact physiologique induit par leur implantation avec, notamment, une préservation de la BHE. Ces biocapteurs ont donc le potentiel de fournir des mesures de concentrations de neurotransmetteurs et de métabolites plus proches de la physiologie réelle du cerveau.

L'intégration de biocapteurs optiques et enzymatiques sur une unique microsonde a été réalisée à l'aide des technologies MEMS. Ce dispositif a été caractérisé *in vitro* dans le cadre d'une détection simultanée de cellules tumorales fluorescentes par une fibre optique et de la concentration extracellulaire de lactate par électrochimie. D'une part, la partie optique a présenté de bonnes performances permettant la détection de faibles variations d'intensité de fluorescence provenant des cellules tumorales. De plus, le système élaboré permet une large plage de configuration en termes de puissance d'excitation et de paramètres d'impulsion. D'autre part, les microélectrodes ont montré des sensibilités au H_2O_2 plus faibles que celles obtenues lors de travaux similaires employant la même procédure de

fabrication. Il a été supposé que des composants de la résine SU-8, utilisée lors de la fabrication des microsondes, ont pu passiver la surface de Pt des microélectrodes. Cependant, des biocapteurs pour la détection du lactate ont pu être réalisés mais se sont montrés peu reproductibles vis-à-vis de leur sensibilité au lactate. Enfin, lors de mesures en simultané, il a été montré qu'aucun effet photothermique ne semblait apparaître sur les biocapteurs enzymatiques suite à une exposition optique. Seulement des effets, probablement photoélectriques, ont été observés. Et ils peuvent être un problème pour la mesure électrochimique si l'on souhaite observer des événements dont la dynamique est inférieure à celle de l'excitation. Nous avons donc réussi à réaliser un dispositif intégrant une mesure optique et enzymatique en limitant considérablement les perturbations pouvant être induites par la mesure de la fluorescence sur la mesure enzymatique.

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de montrer l'importance de développer des dispositifs implantables minimalement invasifs afin de réaliser des mesures intracérébrales proches de la physiologie du cerveau ainsi que la possibilité d'intégrer des biocapteurs électrochimiques et optiques sur une unique micro-aiguille implantable.

Perspectives

A la vue des résultats présentés, le problème de la reproductibilité du dépôt de Pt par pulvérisation des fibres de carbone et de la fabrication des microélectrodes des microsondes opto-électrochimiques montre la nécessité de réaliser des études plus approfondies de la physique et de la chimie des matériaux utilisés. Une meilleure compréhension de l'influence des différents paramètres de métallisation par pulvérisation cathodique sur les propriétés électrochimiques du Pt déposé ainsi que des interactions chimiques entre la résine photosensible de type SU-8 et le Pt est primordiale pour améliorer la sensibilité au H_2O_2 des biocapteurs développés.

Une optimisation des dépôts et une fabrication en parallèle de biocapteurs en fibre de carbone platinée par pulvérisation permettrait d'obtenir de fortes sensibilités au H_2O_2 et donc d'étudier de manière très précise d'importants neurotransmetteurs dont la concentration est très faible dans le milieu interstitiel comme le glutamate et la D-sérine. De plus, une fabrication en parallèle donnerait l'accès à des biocapteurs quasiment identiques et rendrait donc plus rigoureuse la comparaison entre le biocapteur enzymatique et son biocapteur contrôle-BSA.

La fabrication des microélectrodes des microsondes optiques et électrochimiques a besoin d'être optimisée, dans un souci d'augmenter leur sensibilité. Une optimisation des paramètres de recuit de la SU-8 ou le remplacement par une autre résine photosensible sont des possibilités dans ce sens. Une fois le concept de la détection opto-électrochimique validé *in vivo*, il pourra être envisagé une miniaturisation du dispositif par, dans un premier temps, le remplacement de la fibre optique par un guide d'onde composé de matériaux polymères biocompatibles et ayant des indices de réfraction de la lumière intéressants. Par exemple, le PMMA comme substrat et la SU-8 comme cœur permettraient de réduire la microsonde à des dimensions de l'ordre de la dizaine de microns. Dans un second temps, la dimension des microélectrodes une fois optimisées pourra être réduite en fonction de la taille du guide d'onde élaboré. Enfin, l'atténuation voire la suppression des interférences photoélectriques et thermiques est un axe de développement du dispositif essentiel si l'on souhaite augmenter son nombre d'applications possibles.

Chez l'animal, l'association d'une mesure de fluorescence et enzymatique est une voie importante afin de mieux positionner les biocapteurs par rapport à des cellules fluorescentes. Pour le moment, l'unique façon de se positionner est de manière géométrique

en se basant sur l'endroit supposé des cellules d'intérêt et en calculant l'angle et la profondeur de l'implantation à l'aide des bras de l'appareil stéréotaxique. Outre la détection de position de molécules fluorescentes, ce type de dispositif pourrait profiter à l'optogénétique ou encore au suivi de composés chimiques comme le calcium à l'aide de marqueur fluorescent. A long terme, ces biocapteurs pourraient être utilisés en clinique pour la surveillance de paramètres vitaux du cerveau lors de chirurgies sur des patients humains.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] F. A. C. Azevedo, L. R. B. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. L. Ferretti, R. E. P. Leite, W. J. Filho, R. Lent, S. Herculano-Houzel, *J. Comp. Neurol.* **2009**, *513*, 532–541.
- [2] G. Rajkowska, L. D. Selemon, P. S. Goldman-Rakic, *Arch. Gen. Psychiatry* **1998**, *55*, 215.
- [3] H. Hering, M. Sheng, *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 880–888.
- [4] C. Nicholson, P. Kamali-Zare, L. Tao, *Comput. Vis. Sci.* **2011**, *14*, 309–325.
- [5] R. Spector, S. Robert Snodgrass, C. E. Johanson, *Exp. Neurol.* **2015**, *273*, 57–68.
- [6] C. E. Johanson, J. A. Duncan, P. M. Klinge, T. Brinker, E. G. Stopa, G. D. Silverberg, *Cerebrospinal Fluid Res.* **2008**, *5*, 10.
- [7] F. Ding, J. O'Donnell, Q. Xu, N. Kang, N. Goldman, M. Nedergaard, *Science* **2016**, *352*, 550–5.
- [8] M. Frosini, B. Gorelli, M. Matteini, M. Palmi, M. Valoti, G. Pietro Sgaragli, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **1993**, *29*, 99–104.
- [9] A. S. Cunningham, R. Salvador, J. P. Coles, D. A. Chatfield, P. G. Bradley, A. J. Johnston, L. A. Steiner, T. D. Fryer, F. I. Aigbirhio, P. Smielewski, et al., *Brain* **2005**, *128*, 1931–1942.
- [10] H. Davson, M. B. Segal, *Physiology of the CSF and Blood-Brain Barriers*, CRC Press Boca Raton, **1996**.
- [11] K. Diem, C. Lentner, **1971**.
- [12] R. Spector, C. Johanson, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 2515–2524.
- [13] H. S. Wei, H. Kang, I. Y. D. Rasheed, S. Zhou, N. Lou, A. Gershteyn, E. D. McConnell, Y. Wang, K. E. Richardson, A. F. Palmer, et al., *Neuron* **2016**, *91*, 851–862.
- [14] Y. Tholance, G. K. Barcelos, A. Perret-Liaudet, E. Omar, R. Carrillon, S. Grousseau, T. Lieutaud, F. Dailler, S. Marinesco, *J Cereb Blood Flow Metab* **2016**, *37*, 2820–2832.
- [15] P. J. Hutchinson, I. Jalloh, A. Helmy, K. L. H. Carpenter, E. Rostami, B. M. Bellander, M. G. Boutelle, J. W. Chen, J. Claassen, C. Dahyot-Fizelier, et al., *Intensive Care Med.* **2015**, *41*, 1517–1528.
- [16] V. Parikh, R. Kozak, V. Martinez, M. Sarter, *Neuron* **2007**, *56*, 141–154.

- [17] L. M. Teles-Grilo Ruivo, K. L. Baker, M. W. Conway, P. J. Kinsley, G. Gilmour, K. G. Phillips, J. T. R. Isaac, J. P. Lowry, J. R. Mellor, *Cell Rep* **2017**, *18*, 905–917.
- [18] P. Pernot, C. Maucler, Y. Tholance, N. Vasylieva, G. Debilly, L. Pollegioni, R. Cespuoglio, S. Marinesco, *Neurochem Int* **2012**, *60*, 837–845.
- [19] C. Maucler, P. Pernot, N. Vasylieva, L. Pollegioni, S. Marinesco, *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 772–781.
- [20] C. Zou, S. Crux, S. Marinesco, E. Montagna, C. Sgobio, Y. Shi, S. Shi, K. Zhu, M. M. Dorostkar, U. C. Muller, et al., *EMBO J* **2016**, *35*, 2213–2222.
- [21] S. R. Batten, E. A. Matveeva, S. W. Whiteheart, T. C. Vanaman, G. A. Gerhardt, J. T. Slevin, *Brain Behav.* **2017**, *7*, e00795.
- [22] M. Malvaez, V. Y. Greenfield, A. S. Wang, A. M. Yorita, L. Feng, K. E. Linker, H. G. Monbouquette, K. M. Wassum, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12511.
- [23] K. M. Wassum, V. M. Tolosa, T. C. Tseng, B. W. Balleine, H. G. Monbouquette, N. T. Maidment, *J Neurosci* **2012**, *32*, 2734–2746.
- [24] N. Vasylieva, C. Maucler, A. Meiller, H. Viscogliosi, T. Lieutaud, D. Barbier, S. Marinesco, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2507–2515.
- [25] V. N. Murthy, T. Schikorski, C. F. Stevens, Y. Zhu, *Neuron* **2001**, *32*, 673–682.
- [26] C. Nicholson, E. Sykova, *Trends Neurosci* **1998**, *21*, 207–215.
- [27] R. Piet, L. Vargová, E. Syková, D. A. Poulain, S. H. R. Oliet, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 2151–2155.
- [28] N. Maeda, *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 1–15.
- [29] L. W. Lau, R. Cua, M. B. Keough, S. Haylock-Jacobs, V. W. Yong, *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 722–729.
- [30] H. Zhu, P. B. Barker, in (Eds.: M. Mado, J.W.M. Bulte), Humana Press, Totowa, NJ, **2011**, pp. 203–226.
- [31] M. Marjańska, E. J. Auerbach, R. Valabrègue, P. F. Van de Moortele, G. Adriany, M. Garwood, *NMR Biomed.* **2012**, *25*, 332–339.
- [32] I.-Y. Choi, S.-P. Lee, H. Merkle, J. Shen, *Magn. Reson. Med.* **2004**, *51*, 1115–1121.
- [33] D. Attwell, B. Barbour, M. Szatkowski, *Neuron* **1993**, *11*, 401–407.
- [34] O. P. Ottersen, *Anat Embryol* **1989**, *180*, 1–15.
- [35] M. A. Herman, C. E. Jahr, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 9736–9741.
- [36] N. D. Volkow, G.-J. Wang, F. Telang, J. S. Fowler, J. Logan, A.-R. Childress, M. Jayne, Y. Ma, C. Wong, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 6583–6588.

- [37] W. K. Schiffer, C. N. B. Liebling, C. Reiszal, J. M. Hooker, J. D. Brodie, S. L. Dewey, *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 6176–6185.
- [38] M. H. Rapaport, C. G. McAllister, D. Pickar, L. Tamarkin, D. G. Kirch, S. M. Paul, *Schizophr. Res.* **1997**, *25*, 123–129.
- [39] M. Mohsin, A. Ahmad, M. Iqbal, *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 1919–1928.
- [40] S. Okumoto, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 45–54.
- [41] S. Okumoto, L. L. Looger, K. D. Micheva, R. J. Reimer, S. J. Smith, W. B. Frommer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 8740–8745.
- [42] J. S. Marvin, B. G. Borghuis, L. Tian, J. Cichon, M. T. Harnett, J. Akerboom, A. Gordus, S. L. Renninger, T. W. Chen, C. I. Bargmann, et al., *Nat. Methods* **2013**, *10*, 162–170.
- [43] J. M. Rosa, R. Bos, G. S. Sack, C. Fortuny, A. Agarwal, D. E. Bergles, J. G. Flannery, M. B. Feller, *Elife* **2015**, *4*, 1–20.
- [44] M. P. Parsons, M. P. Vanni, C. L. Woodard, R. Kang, T. H. Murphy, L. A. Raymond, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11251.
- [45] Y. Cui, X. Chen, J. Zhang, X. Sun, H. Liu, L. Bai, C. Xu, X. Liu, *Cell Rep.* **2016**, *15*, 256–263.
- [46] M. Armbruster, E. Hanson, C. G. Dulla, *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 10404–10415.
- [47] A. San Martín, S. Ceballo, I. Ruminot, R. Lerchundi, W. B. Frommer, L. F. Barros, *PLoS One* **2013**, *8*, e57712.
- [48] R. Lerchundi, I. Fernández-Moncada, Y. Contreras-Baeza, T. Sotelo-Hitschfeld, P. Mächler, M. T. Wyss, J. Stobart, F. Baeza-Lehnert, K. Alegría, B. Weber, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 11090–11095.
- [49] U. UNGERSTEDT, *J. Intern. Med.* **1991**, *230*, 365–373.
- [50] P. Song, O. S. Mabrouk, N. D. Hershey, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 412–419.
- [51] A. G. Zestos, R. T. Kennedy, *AAPS J.* **2017**, *19*, 1284–1293.
- [52] J. Lazareff, J. Chen, P. Coutin-Churchman, M. Nuwer, *Surg. Neurol. Int.* **2012**, *3*, 165.
- [53] M. Wang, G. T. Roman, K. Schultz, C. Jennings, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5607–5615.
- [54] M. Wang, N. D. Hershey, O. S. Mabrouk, R. T. Kennedy, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2013–2023.

- [55] B. J. Venton, T. E. Robinson, R. T. Kennedy, S. Maren, *Eur. J. Neurosci.* **2006**, *23*, 3391–3398.
- [56] J. Lietsche, J. Gorka, S. Hardt, M. Karas, J. Klein, *J. Vis. Exp.* **2015**, 53048.
- [57] D. R. Groothuis, S. Ward, K. E. Schlageter, A. C. Itskovich, S. C. Schwerin, C. V. Allen, C. Dills, R. M. Levy, *Brain Res.* **1998**, *803*, 218–230.
- [58] J. M. Anderson, A. Rodriguez, D. T. Chang, *Semin Immunol* **2008**, *20*, 86–100.
- [59] J. M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, D. J. Burgess, *AAPS J* **2010**, *12*, 188–196.
- [60] K. L. Clapp-Lilly, R. C. Roberts, L. K. Duffy, K. P. Irons, Y. Hu, K. L. Drew, *J. Neurosci. Methods* **1999**, *90*, 129–142.
- [61] A. Jaquins-Gerstl, Z. Shu, J. Zhang, Y. Liu, S. G. Weber, A. C. Michael, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7662–7667.
- [62] T. D. Y. Kozai, A. S. Jaquins-Gerstl, A. L. Vazquez, A. C. Michael, X. T. Cui, *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 48–67.
- [63] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, *Sensors* **2008**, *8*, DOI 10.3390/s80314000.
- [64] C. Nicholson, *J. Neurosci. Methods* **1993**, *48*, 199–213.
- [65] M. Odijk, E. J. Van Der Wouden, W. Olthuis, M. D. Ferrari, E. A. Tolner, A. M. J. M. Van Den Maagdenberg, A. Van Den Berg, *Sensors Actuators, B Chem.* **2015**, *207*, 945–953.
- [66] F. Gonon, M. Buda, R. Cespuglio, M. Jouvet, J.-F. J.-F. Pujol, *Nature* **1980**, *286*, 902.
- [67] J. Cammack, B. Ghasemzadeh, R. N. Adams, *Neurochem. Res.* **1992**, *17*, 23–27.
- [68] R. D. O’Neill, J. P. Lowry, *Behav. Brain Res.* **1995**, *71*, 33–49.
- [69] L. Xiang, P. Yu, J. Hao, M. Zhang, L. Zhu, L. Dai, L. Mao, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3909–3914.
- [70] F. B. Bolger, J. P. Lowry, *Sensors* **2005**, *5*, 473–487.
- [71] A. Ledo, R. M. Barbosa, G. A. Gerhardt, E. Cadenas, J. Laranjinha, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 17483–17488.
- [72] T. Malinski, Z. Taha, *Nature* **1992**, *358*, 676–678.
- [73] C. Amatore, S. Arbault, Y. Bouret, B. Cauli, M. Guille, A. Rancillac, J. Rossier, *Chemphyschem* **2006**, *7*, 181–187.
- [74] A. L. Sanford, S. W. Morton, K. L. Whitehouse, H. M. Oara, L. Z. Lugo-Morales, J. G. Roberts, L. A. Sombers, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5205–5210.
- [75] D. L. Robinson, A. Hermans, A. T. Seipel, R. M. Wightman, *Chem. Rev.* **2008**, *108*,

- 2554–2584.
- [76] C. Yang, C. B. Jacobs, M. D. Nguyen, M. Ganesana, A. G. Zestos, I. N. Ivanov, A. A. Poretzky, C. M. Rouleau, D. B. Geohegan, B. J. Venton, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 645–652.
- [77] C. Yang, M. E. Denno, P. Pyakurel, B. J. Venton, *Anal. Chim. Acta* **2015**, *887*, 17–37.
- [78] R. Li, X. Liu, W. Qiu, M. Zhang, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 7769–7776.
- [79] M. Z. Wrona, G. Dryhurst, *J. Pharm. Sci.* **1988**, *77*, 911–917.
- [80] G. Dryhurst, A. Anne, M. Z. Wrona, D. Lemordant, *J Am Chem Soc* **1989**, *111*, 719–726.
- [81] B. P. Jackson, S. M. Dietz, R. M. Wightman, *Anal Chem* **1995**, *67*, 1115–1120.
- [82] P. Hashemi, E. C. Dankoski, J. Petrovic, R. B. Keithley, R. M. Wightman, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9462–9471.
- [83] R. Goyal, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *557*, 147–155.
- [84] M. D. Nguyen, A. E. Ross, M. Ryals, S. T. Lee, B. J. Venton, *Pharmacol. Res. Perspect.* **2015**, *3*, 1–12.
- [85] S. Majdi, E. C. Berglund, J. Dunevall, A. I. Oleinick, C. Amatore, D. E. Krantz, A. G. Ewing, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54*, 13609–13612.
- [86] P. Pyakurel, E. Privman Champaloux, B. J. Venton, *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 1112–1119.
- [87] G. Ertürk, B. Mattiasson, *Sensors (Switzerland)* **2017**, *17*, 1–21.
- [88] E. Llaudet, N. P. Botting, J. A. Crayston, N. Dale, *Biosens Bioelectron* **2003**, *18*, 43–52.
- [89] N. Vasylieva, B. Barnych, A. Meiller, C. Maucler, L. Pollegioni, J. S. Lin, D. Barbier, S. Marinesco, *Biosens Bioelectron* **2011**, *26*, 3993–4000.
- [90] D. Keilin, E. F. Hartree, *Biochem J* **1952**, *50*, 331–341.
- [91] N. Ohishi, K. Yagi, *Biochem Biophys Res Commun* **1979**, *86*, 1084–1088.
- [92] L. Pollegioni, A. Falbo, M. S. Pilone, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1120*, 11–16.
- [93] J. Arima, T. Tamura, H. Kusakabe, M. Ashiuchi, T. Yagi, H. Tanaka, K. Inagaki, *J Biochem* **2003**, *134*, 805–812.
- [94] K. Yorita, K. Janko, K. Aki, S. Ghisla, B. A. Palfey, V. Massey, *Biochemistry* **1997**, *94*, 9590–9595.
- [95] C. Enroth, B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino, E. F. Pai, *Proc Natl Acad*

- Sci U S A* **2000**, *97*, 10723–10728.
- [96] R. A. Marcus, N. Sutin, *BBA Rev. Bioenerg.* **1985**, *811*, 265–322.
- [97] L. C. Clark, C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
- [98] S. B. Hall, E. A. Khudaish, A. L. Hart, *Electrochim. Acta* **1999**, *44*, 2455–2462.
- [99] S. Marinesco, N. Dale, *Microelectrode Biosensors*, Humana Press, **2013**.
- [100] A. G. Hudetz, *Brain Res* **1999**, *817*, 75–83.
- [101] R. Valabregue, A. Aubert, J. Burger, J. Bittoun, R. Costalat, *J Cereb Blood Flow Metab* **2003**, *23*, 536–545.
- [102] B. Yu, N. Long, Y. Moussy, F. Moussy, *Biosens Bioelectron* **2006**, *21*, 2275–2282.
- [103] N. Vasylieva, S. Marinesco, D. Barbier, A. Sabac, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *72*, 148–155.
- [104] J. Wang, S. Li, J. W. Mo, J. Porter, M. M. Musameh, P. K. Dasgupta, *Biosens Bioelectron* **2002**, *17*, 999–1003.
- [105] M. Miele, M. Fillenz, *J Neurosci Methods* **1996**, *70*, 15–19.
- [106] H. Langemann, T. Feuerstein, A. Mendelowitsch, O. Gratzl, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2001**, *71*, 169–174.
- [107] M. C. Polidori, P. Mecocci, *J. Alzheimer's Dis.* **2002**, *4*, 517–522.
- [108] S. M. Euser, A. Hofman, R. G. Westendorp, M. M. Breteler, *Brain* **2009**, *132*, 377–382.
- [109] P. M. Kochanek, J. D. Verrier, A. K. Wagner, E. K. Jackson, in *Adenosine A Key Link between Metab. Brain Act.* (Eds.: S. Masino, D. Boison), Springer New York, New York, NY, **2013**, pp. 307–322.
- [110] C. L. Raison, R. Dantzer, K. W. Kelley, M. A. Lawson, B. J. Woolwine, G. Vogt, J. R. Spivey, K. Saito, A. H. Miller, *Mol. Psychiatry* **2010**, *15*, 393–403.
- [111] E. Thimm, D. Herebian, B. Assmann, D. Klee, E. Mayatepek, U. Spiekerkoetter, *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *102*, 122–125.
- [112] Carson, *Mol. Psychiatry* **2014**, *20*, 1–6.
- [113] S. Sorensen, A. Gjerris, M. Hammer, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **1985**, *48*, 50–57.
- [114] O. Beck, K. F. Faull, *Anal. Biochem.* **1985**, *149*, 492–500.
- [115] E. Eldrup, P. Mogensen, J. Jacobsen, H. Pakkenberg, N. J. Christensen, *Acta Neurol. Scand.* **1995**, *92*, 116–121.
- [116] A. J. Baker, M. H. Zornow, M. S. Scheller, T. L. Yaksh, S. R. Skilling, D. H. Smullin,

- A. A. Larson, R. Kuczenski, *J. Neurochem.* **1991**, *57*, 1370–1379.
- [117] C. Malitesta, F. Palmisano, L. Torsi, P. G. Zambonin, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2735–2740.
- [118] O. M. Schuvailo, O. O. Soldatkin, A. Lefebvre, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *573–574*, 110–116.
- [119] M. Quinto, I. Losito, F. Palmisano, C. G. Zambonin, *Fresenius J Anal Chem* **2000**, *367*, 692–696.
- [120] R. D. O’Neill, S. C. Chang, J. P. Lowry, C. J. McNeil, *Biosens Bioelectron* **2004**, *19*, 1521–1528.
- [121] G. A. Gerhardt, A. F. Oke, G. Nagy, B. Moghaddam, R. N. Adams, *Brain Res* **1984**, *290*, 390–395.
- [122] A. Belay, A. Collins, T. Ruzgas, P. T. Kissinger, L. Gorton, E. Csöregi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 93–105.
- [123] A. Lindgren, T. Ruzgas, L. Gorton, E. Csoregi, G. B. Ardila, I. Y. Sakharov, I. G. Gazaryan, *Biosens Bioelectron* **2000**, *15*, 491–497.
- [124] L. Zhu, R. Yang, J. Zhai, C. Tian, *Biosens Bioelectron* **2007**, *23*, 528–535.
- [125] A. A. Karyakin, O. V Gitelacher, E. E. Karyakina, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2419–2423.
- [126] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1720–1723.
- [127] F. Tian, N. Dale, in *Neuromethods* (Eds.: S. Marinesco, N. Dale), Humana Press, **2013**, pp. 69–93.
- [128] F. Tian, E. Llaudet, N. Dale, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6760–6766.
- [129] J. E. Frew, H. A. Hill, *Eur J Biochem* **1988**, *172*, 261–269.
- [130] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3512–3517.
- [131] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, *Anal Chem* **1994**, *66*, 2451–2457.
- [132] N. V Kulagina, L. Shankar, A. C. Michael, *Anal Chem* **1999**, *71*, 5093–5100.
- [133] W. H. Oldenziel, B. H. C. Westerink, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5520–5528.
- [134] W. H. Oldenziel, G. Dijkstra, T. I. Cremers, B. H. Westerink, *Brain Res* **2006**, *1118*, 34–42.
- [135] W. Putzbach, N. J. Ronkainen, *Sensors (Switzerland)* **2013**, *13*, 4811–4840.
- [136] Z. Zhu, L. Garcia-Gancedo, A. J. Flewitt, H. Xie, F. Moussy, W. I. Milne, *Sensors* **2012**, *12*, 5996–6022.
- [137] J. J. Burmeister, K. Moxon, G. A. Gerhardt, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 187–192.
- [138] L. I. Netchiporouk, A. A. Shul’ga, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, R. Olier, R.

- Cespuglio, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *303*, 275–283.
- [139] D. J. Strike, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, *Sensors Actuators B. Chem.* **1993**, *13*, 61–64.
- [140] O. Frey, T. Holtzman, R. M. McNamara, D. E. Theobald, P. D. van der Wal, N. F. de Rooij, J. W. Dalley, M. Koudelka-Hep, *Biosens Bioelectron* **2010**, *26*, 477–484.
- [141] C. P. McMahon, S. J. Killoran, R. D. O’Neill, *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *580*, 193–202.
- [142] F. Tian, A. V. Gourine, R. T. R. Huckstepp, N. Dale, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *645*, 86–91.
- [143] N. Vasylieva, S. Marinesco, in *Neuromethods* (Eds.: S. Marinesco, N. Dale), Humana Press, Totowa, NJ, **2013**, pp. 95–114.
- [144] B. A. Gregg, A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5970–5975.
- [145] A. Heller, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 664–672.
- [146] W. H. Oldenzien, W. Beukema, B. H. Westerink, *J Neurosci Methods* **2004**, *140*, 117–126.
- [147] J. Cui, N. V. Kulagina, A. C. Michael, *J. Neurosci. Methods* **2001**, *104*, 183–189.
- [148] J. J. Burmeister, V. A. Davis, J. E. Quintero, F. Pomerleau, P. Huettl, G. A. Gerhardt, *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 721–728.
- [149] R. Shacham, D. Avnir, D. Mandler, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 384–388.
- [150] T. Rozhanchuk, O. Tananaiko, I. Mazurenko, M. Etienne, A. Walcarius, V. Zaitsev, *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *625*, 33–39.
- [151] N. C. Foulds, C. R. Lowe, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **1986**, *82*, 1259.
- [152] S. Cosnier, C. Innocent, *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *328*, 361–366.
- [153] C. P. McMahon, R. D. O’Neill, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1196–1199.
- [154] Z. M. Zain, R. D. O’Neill, J. P. Lowry, K. W. Pierce, M. Tricklebank, A. Dewa, S. A. Ghani, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1454–1459.
- [155] J. Lowry, *J. Neurosci. Methods* **1997**, *71*, 177–182.
- [156] P. Pernot, J. P. Mothet, O. Schuvailo, A. Soldatkin, L. Pollegioni, M. Pilone, M. T. Adeline, R. Cespuglio, S. Marinesco, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1589–1597.
- [157] Y. Hu, G. S. Wilson, *J. Neurochem.* **2002**, *69*, 1484–1490.
- [158] E. Naylor, D. V. Aillon, B. S. Barrett, G. S. Wilson, D. A. Johnson, D. A. Johnson, H. P. Harmon, S. Gabbert, P. A. Petillo, *Sleep* **2012**, *35*, 1209–1222.

- [159] J. P. Lowry, R. D. O'Neill, *Electroanalysis* **1994**, *6*, 369–379.
- [160] M. R. Ryan, J. P. Lowry, R. D. O'Neill, *Analyst* **1997**, *122*, 1419–1424.
- [161] K. T. Kawagoe, J. A. Jankowski, R. Mark Wightman, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1589–1594.
- [162] K. N. Hascup, E. R. Hascup, O. M. Littrell, J. M. Hinzman, C. E. Werner, V. A. Davis, J. J. Burmeister, F. Pomerleau, J. E. Quintero, P. Huettl, et al., in *Neuromethods* (Eds.: S. Marinesco, N. Dale), Humana Press, New York, Heidelberg, Dordrecht, London, **2013**, pp. 27–54.
- [163] C. F. Lourenço, A. Ledo, G. A. Gerhardt, J. Laranjinha, R. M. Barbosa, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6764.
- [164] O. Frey, P. Van Der Wal, N. De Rooij, M. Koudelka-Hep, *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. - Proc.* **2007**, *2007*, 6039–6042.
- [165] J. J. Burmeister, F. Pomerleau, P. Huettl, C. R. Gash, C. E. Werner, J. P. Bruno, G. A. Gerhardt, *Biosens Bioelectron* **2008**, *23*, 1382–1389.
- [166] K. Najafi, J. Ji, K. D. Wise, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1990**, *37*, 1–11.
- [167] K. D. Wise, J. B. Angell, A. Starr, *IEEE Trans Biomed Eng* **1970**, *17*, 238–247.
- [168] A. C. Hoogerwerf, K. D. Wise, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1994**, *41*, 1136–1146.
- [169] A. Weltin, J. Kieninger, G. A. Urban, *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 4503–4521.
- [170] G. Sreenivas, S. S. Ang, I. Fritsch, W. D. Brown, G. A. Gerhardt, D. J. Woodward, *Anal Chem* **1996**, *68*, 1858–1864.
- [171] J. J. Burmeister, G. A. Gerhardt, *Anal Chem* **2001**, *73*, 1037–1042.
- [172] A. Ledo, C. F. Lourenço, J. Laranjinha, G. A. Gerhardt, R. M. Barbosa, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 12383–12390.
- [173] R. Gifford, J. J. Kehoe, S. L. Barnes, B. A. Kornilayev, M. A. Alterman, G. S. Wilson, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2587–2598.
- [174] A. Altuna, J. Berganzo, L. J. Fernández, *Front. Mater.* **2015**, *2*, 1–5.
- [175] R. J. Soto, J. R. Hall, M. D. Brown, J. B. Taylor, M. H. Schoenfisch, *Anal Chem* **2017**, *89*, 276–299.
- [176] S. D. Patil, F. Papadimitrakopoulos, D. J. Burgess, *Diabetes Technol Ther* **2004**, *6*, 887–897.
- [177] C. L. Kolarcik, K. Catt, E. Rost, I. N. Albrecht, D. Bourbeau, Z. Du, T. D. Y. Kozai, X. Luo, D. J. Weber, X. T. Cui, *J. Neural Eng. J. Neural Eng* **2015**, *12*, 16008–15.
- [178] Y. Zhong, R. V. Bellamkonda, *Brain Res.* **2007**, *1148*, 15–27.

- [179] S. G. Vallejo-Heligon, N. L. Brown, W. M. Reichert, B. Klitzman, *Acta Biomater.* **2016**, *30*, 106–115.
- [180] M. T. Frey, A. Engler, D. E. Discher, J. Lee, Y. L. Wang, *Methods Cell Biol.* **2007**, *83*, 47–65.
- [181] M. B. Browning, S. N. Cereceres, P. T. Luong, E. M. Cosgriff-Hernandez, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2014**, *102*, 4244–4251.
- [182] C. A. Cordeiro, M. G. de Vries, W. Ngabi, P. E. Oomen, T. I. Cremers, B. H. Westerink, *Biosens Bioelectron* **2015**, *67*, 677–686.
- [183] X. Liu, T. Xiao, F. Wu, M.-Y. Shen, M. Zhang, H. Yu, L. Mao, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*, 11802–11806.
- [184] S. H. Baxamusa, L. Montero, J. M. Dubach, H. A. Clark, S. Borros, K. K. Gleason, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2857–2862.
- [185] J. L. Skousen, M. J. Bridge, P. A. Tresco, *Biomaterials* **2015**, *36*, 33–43.
- [186] J. P. Seymour, D. R. Kipke, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3594–3607.
- [187] J. L. Skousen, S. M. E. Merriam, O. Srivannavit, G. Perlin, K. D. Wise, P. A. Tresco, *Prog. Brain Res.* **2011**, *194*, 167–180.
- [188] J. Paul, S. Strickland, J. P. Melchor, *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1999–2008.
- [189] P. S. Tsai, J. P. Kaufhold, P. Blinder, B. Friedman, P. J. Drew, H. J. Karten, P. D. Lyden, D. Kleinfeld, *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 14553–14570.
- [190] F. Tian, W. Wu, M. Broderick, V. Vamvakaki, N. Chaniotakis, N. Dale, *Biosens Bioelectron* **2010**, *25*, 2408–2413.
- [191] N. Wahono, S. Qin, P. Oomen, T. I. Cremers, M. G. de Vries, B. H. Westerink, *Biosens Bioelectron* **2012**, *33*, 260–266.
- [192] K. M. Wassum, V. M. Tolosa, J. Wang, E. Walker, H. G. Monbouquette, N. T. Maidment, *Sensors* **2008**, *8*, 5023–5036.
- [193] L. M. Borland, G. Shi, H. Yang, A. C. Michael, *J. Neurosci. Methods* **2005**, *146*, 149–158.
- [194] Y. Wang, A. C. Michael, *J. Neurosci. Methods* **2012**, *208*, 34–39.
- [195] H. Zhang, P. R. Patel, Z. Xie, S. D. Swanson, X. Wang, N. A. Kotov, *ACS Nano* **2013**, *7*, 7619–7629.
- [196] S. Felix, K. Shah, D. George, V. Tolosa, A. Tooker, H. Sheth, T. Delima, S. Pannu, *Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. EMBS* **2012**, 871–874.
- [197] S. Takeuchi, D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, T. Suzuki, *Lab Chip* **2005**, *5*, 519.

- [198] T. Suzuki, K. Mabuchi, S. Takeuchi, *Int. IEEE/EMBS Conf. Neural Eng. NER* **2003**, 2003–Janua, 154–156.
- [199] D. Khodagholy, T. Doublet, P. Quilichini, M. Gurfinkel, P. Leleux, A. Ghestem, E. Ismailova, T. Herve, S. Sanaur, C. Bernard, et al., *Nat Commun* **2013**, 4, 1575.
- [200] E. Welch, T. Doublet, C. Bernard, G. Malliaras, C. K. Ober, *J Polym. Sci, Part A Polym. Chem.* **2015**, 53, 372–377.
- [201] M. Ohtake, S. Morino, T. Kaidoh, T. Inoué, *Neuropathology* **2004**, 24, 219–227.
- [202] A. Cavender, *Clin. Biochem.* **2013**, 46, 1339–1352.
- [203] Y. Hu, G. S. Wilson, *J Neurochem* **1997**, 68, 1745–1752.
- [204] L. Netchiporouk, N. Shram, D. Salvert, R. Cespuglio, *Eur J Neurosci* **2001**, 13, 1429–1434.
- [205] N. Shram, L. Netchiporouk, R. Cespuglio, *Eur J Neurosci* **2002**, 16, 461–466.
- [206] B. Balança, A. Meiller, L. Bezin, J. P. Dreier, S. Marinesco, T. Lieutaud, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, 37, 1670–1686.
- [207] J. Victor Nadler, *Epilepsia* **2010**, 51, 17.
- [208] E. C. Rutherford, F. Pomerleau, P. Huettl, I. Stromberg, G. A. Gerhardt, *J Neurochem* **2007**, 102, 712–722.
- [209] K. Moussawi, A. Riegel, S. Nair, P. W. Kalivas, *Front. Syst. Neurosci.* **2011**, 5, 94.
- [210] K. N. Hascup, E. R. Hascup, F. Pomerleau, P. Huettl, G. A. Gerhardt, *J Pharmacol Exp Ther* **2008**, 324, 725–731.
- [211] M. van der Zeyden, W. H. Oldenzien, K. Rea, T. I. Cremers, B. H. Westerink, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2008**, 90, 135–147.
- [212] S. M. Onifer, J. E. Quintero, G. A. Gerhardt, *J. Neurosci. Methods* **2012**, 208, 146–154.
- [213] E. R. Hascup, K. N. Hascup, F. Pomerleau, P. Huettl, E. Hajos-Korcsok, J. Kehr, G. A. Gerhardt, *J. Neurochem.* **2012**, 122, 619–627.
- [214] J. M. Hinzman, T. C. Thomas, J. J. Burmeister, J. E. Quintero, P. Huettl, F. Pomerleau, G. A. Gerhardt, J. Lifshitz, *J. Neurotrauma* **2010**, 27, 889–899.
- [215] J. M. Hinzman, V. A. DiNapoli, E. J. Mahoney, G. A. Gerhardt, J. A. Hartings, *Exp Neurol* **2015**, 267, 243–253.
- [216] C.-S. Piao, A. L. Holloway, S. Hong-Routson, M. S. Wainwright, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, 0271678X1774279.
- [217] S. H. R. Oliet, J. P. Mothet, *Glia* **2006**, 54, 726–737.

- [218] S. Sacchi, S. Lorenzi, G. Molla, M. S. Pilone, C. Rossetti, L. Pollegioni, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 27510–27516.
- [219] M. R. Picciotto, M. J. Higley, Y. S. Mineur, *Neuron* **2012**, *76*, 116–129.
- [220] R. M. Santos, J. Laranjinha, R. M. Barbosa, A. Sirota, *Biosens Bioelectron* **2015**, *69*, 83–94.
- [221] A. Khan, S. A. Ghani, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 433–438.
- [222] J. D. Keighron, J. Wigström, M. E. Kurczyk, J. Bergman, Y. Wang, A. S. Cans, *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 181–188.
- [223] C. Giuliano, V. Parikh, J. R. Ward, C. Chiamulera, M. Sarter, *Neurochem. Int.* **2008**, *52*, 1343–1350.
- [224] V. Parikh, M. St. Peters, R. D. Blakely, M. Sarter, *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 2326–2337.
- [225] P. Holton, *J. Physiol.* **1959**, *145*, 494–504.
- [226] R. A. Cunha, *J. Neurochem.* **2016**, *139*, 1019–1055.
- [227] E. Llaudet, S. Hatz, M. Droniou, N. Dale, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3267–3273.
- [228] N. Dale, *J. Physiol.* **1998**, *511*, 265–272.
- [229] A. V Gourine, E. Llaudet, N. Dale, K. M. Spyer, *Nature* **2005**, *436*, 108–111.
- [230] A. V. Gourine, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 1211–1218.
- [231] C. Frayling, R. Britton, N. Dale, *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2275–2286.
- [232] L. I. Schmitt, R. E. Sims, N. Dale, P. G. Haydon, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 4417–4425.
- [233] B.-M. Bellander, E. Cantais, P. Enblad, P. Hutchinson, C.-H. Nordström, C. Robertson, J. Sahuquillo, M. Smith, N. Stocchetti, U. Ungerstedt, et al., *Intensive Care Med.* **2004**, *30*, 2166–2169.
- [234] A. Jaquins-Gerstl, A. C. Michael, *Analyst* **2015**, *140*, 3696–3708.
- [235] R. M. Wightman, *Science (80-.)*. **2006**, *311*, 1570–1574.
- [236] P. A. Garris, M. Kilpatrick, M. A. Bunin, D. Michael, Q. D. Walker, R. M. Wightman, *Nature* **1999**, *398*, 67–69.
- [237] P. E. Phillips, D. L. Robinson, G. D. Stuber, R. M. Carelli, R. M. Wightman, *Methods Mol Med* **2003**, *79*, 443–464.
- [238] J. J. Day, M. F. Roitman, R. M. Wightman, R. M. Carelli, *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1020–1028.
- [239] S. Marinesco, O. Frey, *Neuromethods* **2013**, *80*, 3–25.
- [240] N. Isoaho, N. Wester, E. Peltola, L.-S. Johansson, A. Boronat, J. Koskinen, J. Feliu, V. Climent, T. Laurila, *Electrochim. Acta* **2017**, *251*, 60–70.

- [241] O. N. Schuvailo, S. V. Dzyadevych, A. V. El'skaya, S. Gautier-Sauvigné, E. Csöregi, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 87–94.
- [242] N. Vasylieva, C. Maucler, A. Meiller, H. Viscogliosi, T. Lieutaud, D. Barbier, S. Marinesco, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2507–2515.
- [243] A. Rigalli, V. Di Loreto, *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*, CRC Press, **2009**.
- [244] B. Jespersen, L. Knupp, C. A. Northcott, *J. Vis. Exp.* **2012**, 3496.
- [245] E. Seiffert, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7829–7836.
- [246] E. Slavcheva, G. Ganske, G. Topalov, W. Mokwa, U. Schnakenberg, *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255*, 6479–6486.
- [247] S. Tiwari, J. Bijwe, *Procedia Technol.* **2014**, *14*, 505–512.
- [248] C. N. Hobbs, G. Holzberg, A. S. Min, R. M. Wightman, *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 2512–2521.
- [249] H. Piilgaard, M. Lauritzen, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2009**, *29*, 1517–27.
- [250] D. A. Jones, J. Ros, H. Landolt, M. Fillenz, M. G. Boutelle, *J. Neurochem.* **2002**, *75*, 1703–1708.
- [251] I. Katsounaros, W. B. Schneider, J. C. Meier, U. Benedikt, P. U. Biedermann, A. A. Auer, K. J. J. Mayrhofer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7384–7391.
- [252] N. Tujunen, E. Kaivosoja, V. Protopopova, J. J. Valle-Delgado, M. Österberg, J. Koskinen, T. Laurila, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *55*, 70–78.
- [253] K.-L. Huang, Y.-C. Lai, C.-H. Tsai, *J. Power Sources* **2006**, *156*, 224–231.
- [254] S. G. Pavlakakis, D. Lu, Y. Frank, A. Wiznia, D. Eidelberg, T. Barnett, R. A. Hyman, *Am. J. Neuroradiol.* **1998**, *19*, 383–385.
- [255] J. A. Detre, Z. Wang, A. R. Bogdan, D. A. Gusnard, C. A. Bay, P. M. Bingham, R. A. Zimmerman, *Ann. Neurol.* **1991**, *29*, 218–221.
- [256] A. Bitsch, H. Bruhn, V. Vougioukas, A. Stringaris, H. Lassmann, J. Frahm, W. Brück, *Am. J. Neuroradiol.* **1999**, *20*, 1619–1627.
- [257] T. Matsui, H. Omuro, Y.-F. Liu, M. Soya, T. Shima, B. S. McEwen, H. Soya, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 6358–6363.
- [258] P. M. Bungay, P. Newton-Vinson, W. Isele, P. A. Garris, J. B. Justice, *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 932–946.
- [259] M. N. Woodroffe, G. S. Sarna, M. Wadhwa, G. M. Hayes, A. J. Loughlin, A. Tinker, M. L. Cuzner, *J. Neuroimmunol.* **1991**, *33*, 227–236.

- [260] J. J. Clark, S. G. Sandberg, M. J. Wanat, J. O. Gan, E. A. Horne, A. S. Hart, C. A. Akers, J. G. Parker, I. Willuhn, V. Martinez, et al., *Nat. Methods* **2010**, *7*, 126–9.
- [261] H. N. Schwerdt, M. J. Kim, S. Amemori, D. Homma, T. Yoshida, H. Shimazu, H. Yerramreddy, E. Karasan, R. Langer, A. M. Graybiel, et al., *Lab Chip* **2017**, *17*, 1104–1115.
- [262] P. Hegemann, A. Möglich, *Nat. Methods* **2010**, *8*, 39.
- [263] S. K. Mohanty, V. Lakshminarayanan, *J. Mod. Opt.* **2015**, *62*, 949–970.
- [264] W. Schulze, A. Hayata-Takano, T. Kamo, T. Nakazawa, K. Nagayasu, A. Kasai, K. Seiriki, N. Shintani, Y. Ago, C. Farfan, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *459*, 81–86.
- [265] D. Cai, K. B. Cohen, T. Luo, J. W. Lichtman, J. R. Sanes, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 540–547.
- [266] B. E. Chen, B. Lendvai, E. A. Nimchinsky, B. Burbach, K. Fox, K. Svoboda, *Learn. Mem.* **2000**, *7*, 433–441.
- [267] A. Canales, X. Jia, U. P. Froriep, R. A. Koppes, C. M. Tringides, J. Selvidge, C. Lu, C. Hou, L. Wei, Y. Fink, et al., *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 277–284.
- [268] D. Budai, A. D. Vizvári, Z. K. Bali, B. Márki, L. V Nagy, Z. Kónya, D. Madarász, N. Henn-Mike, C. Varga, I. Hernádi, *PLoS One* **2018**, *13*, e0193836.
- [269] I. Ozden, J. Wang, Y. Lu, T. May, J. Lee, W. Goo, D. J. O’Shea, P. Kalanithi, I. Diester, M. Diagne, et al., *J. Neurosci. Methods* **2013**, *219*, 142–154.
- [270] F. Arslan, S. Ustabaş, H. Arslan, *Sensors* **2011**, *11*, DOI 10.3390/s110808152.
- [271] B. Balança, Neuro-Chemical Analysis of Cortical Spreading Depolarizations after Severe Traumatic Brain Injury : A Continuum from a Physiologic Response to a Metabolic Crisis, Université Claude Bernard - Lyon I, **2015**.
- [272] T. Szatmári, K. Lumniczky, S. Désaknai, S. Trajceviski, E. J. Hídvégi, H. Hamada, G. Sáfrány, *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 546–553.
- [273] A. Maus, G. J. Peters, *Amino Acids* **2017**, *49*, 21–32.
- [274] O. R. Colegio, N.-Q. Chu, A. L. Szabo, T. Chu, A. M. Rhebergen, V. Jairam, N. Cyrus, C. E. Brokowski, S. C. Eisenbarth, G. M. Phillips, et al., *Nature* **2014**, *513*, 559.
- [275] V. Pucino, M. Bombardieri, C. Pitzalis, C. Mauro, *Eur. J. Immunol.* **2016**, *47*, 14–21.
- [276] T. Bernas, B. P. Rajwa, E. K. Asem, J. P. Robinson, **2005**, *10*, 64015–64019.
- [277] L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, H. J. Tanke, *Biophys. J.* **1995**, *68*, 2588–2600.

- [278] M. Chalfie, *Photochem. Photobiol.* **2018**, *62*, 651–656.
- [279] G. A. Wagnieres, W. M. Star, B. C. Wilson, *Photochem. Photobiol.* **2008**, *68*, 603–632.
- [280] A. M. A. and L.-P. W. and F. Z. and L. A. M. and M. Z. M. and M. B. S. and K. Deisseroth, *J. Neural Eng.* **2007**, *4*, S143.
- [281] O. Yizhar, L. E. Fenno, T. J. Davidson, M. Mogri, K. Deisseroth, *Neuron* **2011**, *71*, 9–34.
- [282] D. Huber, L. Petreanu, N. Ghitani, S. Ranade, T. Hromádka, Z. Mainen, K. Svoboda, *Nature* **2008**, *451*, 61.
- [283] K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenböck, A. Ting, M. J. Schnitzer, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 10380 LP-10386.
- [284] J. A. Cardin, M. Carlén, K. Meletis, U. Knoblich, F. Zhang, K. Deisseroth, L.-H. Tsai, C. I. Moore, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 247–254.
- [285] D.-W. Park, A. A. Schendel, S. Mikael, S. K. Brodnick, T. J. Richner, J. P. Ness, M. R. Hayat, F. Atry, S. T. Frye, R. Pashaie, et al., *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5258.
- [286] T. D. Y. Kozai, A. L. Vazquez, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 4965–4978.
- [287] K. Kampasi, D. F. English, J. Seymour, E. Stark, S. McKenzie, M. Vöröslakos, G. Buzsáki, K. D. Wise, E. Yoon, *Microsystems Nanoeng.* **2018**, *4*, 10.
- [288] X. Liu, Y. Lu, E. Iseri, Y. Shi, D. Kuzum, *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 132.
- [289] C. CHRISTOPHE, Intégration de Microcapteurs Électrochimiques En Technologies “Silicium et Polymères” Pour l’étude Du Stress Oxydant. Application à La Biochimie Cutanée, <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-006211111>, **2010**.
- [290] H. Lee, K. Neville, *Handbook of Epoxy Resins*, McGraw-Hill, New York, **1967**.
- [291] K. V Nemani, K. L. Moodie, J. B. Brennick, A. Su, B. Gimi, B. F. E. Matarèse, P. L. C. Feyen, A. Falco, F. Benfenati, P. Lugli, et al., *Sci. Rep.* **2013**, *8*, 10.1016/j.msec.2013.07.001.
- [292] B. F. E. Matarèse, P. L. C. Feyen, A. Falco, F. Benfenati, P. Lugli, J. C. deMello, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5560.
- [293] X. Han, *Prog. Brain Res.* **2012**, *196*, 215–233.
- [294] I. N. Christie, J. A. Wells, P. Southern, N. Marina, S. Kasparov, A. V Gourine, M. F. Lythgoe, *Neuroimage* **2013**, *66*, 634–641.
- [295] S. M. Thompson, L. M. Masukawa, D. A. Prince, *J. Neurosci.* **1985**, *5*, 817 LP-824.
- [296] J. A. Kim, B. W. Connors, *Front. Cell. Neurosci.* **2012**, *6*, 27.

- [297] M. Volgushev, T. R. Vidyasagar, M. Chistiakova, U. T. Eysel, *Neuroscience* **2000**, 98, 9–22.
- [298] M. Desai, I. Kahn, U. Knoblich, J. Bernstein, H. Atallah, A. Yang, N. Kopell, R. L. Buckner, A. M. Graybiel, C. I. Moore, et al., *J. Neurophysiol.* **2011**, 105, 1393–1405.
- [299] J. M. Stujenske, T. Spellman, J. A. Gordon, *Cell Rep.* **2015**, 12, 525–534.
- [300] E. Moser, I. Mathiesen, P. Andersen, *Science (80-.)*. **1993**, 259, 1324 LP-1326.
- [301] T. J. Hall, M. Bilgen, M. F. Insana, T. A. Krouskop, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **1997**, 44, 1355–1365.
- [302] P. J. McCracken, A. Manduca, J. Felmlee, R. L. Ehman, *Magn. Reson. Med.* **2005**, 53, 628–639.
- [303] M. L. Byron, E. A. Variano, *Exp. Fluids* **2013**, 54, 1456.
- [304] J. Binding, J. Ben Arous, J.-F. Léger, S. Gigan, C. Boccara, L. Bourdieu, *Opt. Express* **2011**, 19, 4833–4847.

Annexes

Annexe 1. Composants optiques

Caractéristique du laser :

Fournisseur :	RGBLase
Puissance	50 mW
Longueur d'onde	445 nm
Largeur du pic à mi-hauteur	10 nm
Température d'utilisation	0 à 40 °C
Temps de chauffe	5 min
Bruit (RMS)	0,20%
Polarisation	Elliptique
Diamètre du faisceau	2,6 mm x 1,3 mm
Tension	9 ± 0,5 V DC

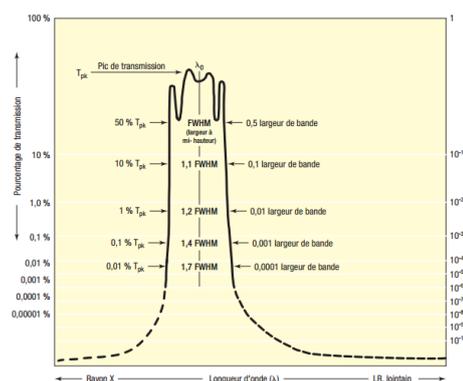
Miroir dichroïque, 10XM35-465 :

Spécifications

Diamètre	25,4 mm
Surface minimum utile	20,2 mm
Qualité surface	80-50 rayure-piqûre; F/F pour MIL-F-48616
Épaisseur	1,0 à 9,0 mm
Indice de réfraction n_o	1,5
Décalage longueur d'onde par la température	0,01 nm/°C
Plage de température	-50 °C à +100 °C



Porte-filtres
(cf. page 688).



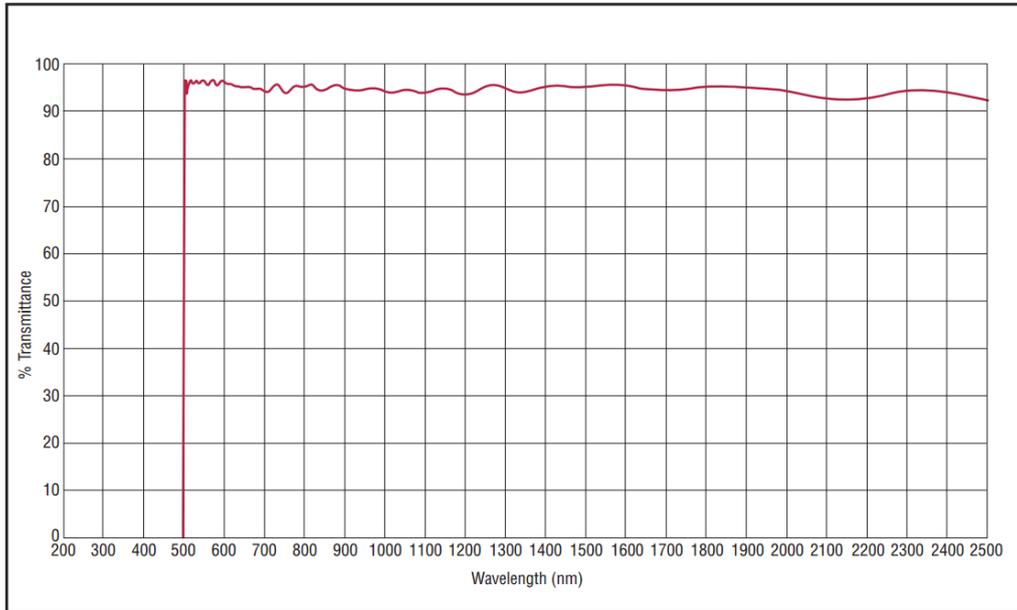
Courbe typique, donnée à titre indicatif uniquement.

Longueur d'onde centrale (nm)	FWHM (nm)	Transmission pic minimum (%)	Rapport signal-bruit	Plage de blocage	Référence
460, +5/-0	35±3,5	50	100,000:1	Des rayons X à 925 µm	10XM35-465

Filtre à verre coloré, 10CGA-495 :

Spectral Performance Data - CGA-495

Cut-on Wavelength at 50% Absolute Transmittance	495 ± 5 nm
Cut-on Wavelength at 90% Absolute Transmittance	≤510 nm
Cut-on Wavelength at OD5	≥455 nm
Effective Index of Refraction	1.853 (nominal)



Photodiode, SM05PD1A :

Specifications

Specifications ^a		
Wavelength Range	λ	350 - 1100 nm
Peak Wavelength	λ_p	980 nm
Responsivity	$\mathfrak{R}(\lambda)$	0.65 A/W
Active Area Diameter		13 mm ²
Rise/Fall Time (632 nm, $R_L=50 \Omega$, 20 V)	t_r/t_f	10 ns / 10 ns
NEP, Typical (900 nm, 20 V)	W//Hz	1.2×10^{-14}
Dark Current (20 V)	I_d	1.0 nA (Typ.) 20 nA (Max)
Capacitance (20 V)	C_j	24 pF (Typ.)
Package		SM05, External Thread
Sensor Material		Si
Corresponding Unmounted Diode		FDS100
Maximum Rating		
Max Bias (Reverse) Voltage		25 V
Reverse Current		5 mA
Operating Temperature		-40 to 100 °C
Storage Temperature		-55 to 125 °C

a. Unless otherwise noted, all measurements are performed at 25 °C ambient temperature.

Amplificateur de courant pour photodiode, PDA200C :

PDA200C Specifications	
Full Scale Current Measurement Ranges	100 nA to 10 mA (in Decade Steps)
Maximum Resolution	10 pA
Display Range	0 to 10000 (CG) 0 to -10000 (AG)
Polarity of the Photodiode	Cathode Grounded (CG) Anode Grounded (AG)
Bias Voltage	0 to -10 V (CG) 0 to +10 V (AG)
Photodiode Sensitivity (for Calibrated Power Display)	0.05 to 2 A/W
Max. Photodiode Capacitance for Frequency Compensated Operation	10 nF
Temperature Coefficient	<50 ppm/°C
Input Impedance	~0 Ω (Virtual Ground)
Photo Current Monitor Output	
Output Voltage Range (Analog Output)	0 to +10 V (CG) 0 to -10 V (AG)
Conversion Coefficient	1×10^3 to 1×10^8 (Depending on Measurement Range)
Conversion Coefficient Accuracy	±5%
Noise	≤0.02% (RMS, Full Scale of Current Measurement Range)
Load Resistance	>10 kΩ

Measurement Range	Resolution	Accuracy	Analog PD Current Output	
			Conversion Coefficient	Bandwidth ^a
10 mA	1 μA	± 0.05% f.s.	1×10^3 V/A ±5%	500 kHz
1 mA	100 nA	± 0.05% f.s.	1×10^4 V/A ±5%	250 kHz
100 μA	10 nA	± 0.05% f.s.	1×10^5 V/A ±5%	70 kHz
10 μA	1 nA	± 0.05% f.s.	1×10^6 V/A ±5%	20 kHz
1 μA	100 pA	± 0.05% f.s.	1×10^7 V/A ±5%	5 kHz
100 nA	10 pA	± 0.1% f.s.	1×10^8 V/A ±5%	1 kHz

a. Small signal 3 dB bandwidth of the analog output.

Fibre optique, FG200LCC :

Item #	Wavelength Range	Hydroxyl Content	Core Diameter	Cladding Diameter	Coating Diameter	Buffer Diameter	Core/Cladding	Coating ^a	Buffer	Proof Test	
FG200UCC	250 - 1200 nm ^b	High OH	200 ± 8 μm	240 ± 5 μm	260 ± 6 μm	400 ± 30 μm	Pure Silica / Fluorine-Doped Silica	TECS Hard Fluoropolymer	Tefzel	≥100 kpsi	
FG200LCC	400 - 2200 nm	Low OH									
Item #	NA	Max Power Capability		Max Attenuation @ 808 nm	Max Core Offset	Bend Radius		Operating Temperature	Strip Tool	Core Index	Cladding Index
FG200UCC FG200LCC	0.22 ± 0.02	Pulsed ^c 1.0 MW	CW ^d 0.2 kW	10 dB/km	5 μm	Short Term 12 mm	Long Term 24 mm	-60 to 125 °C	T12S18 ^e	See Table in Overview Tab	Proprietary ^f

a. This coating acts as a second cladding with an NA of 0.39, which is calculated from the index difference between the TECS coating to the core, rather than between the silica cladding and the TECS coating/second cladding.

b. Solarization may occur at wavelengths below 300 nm. We also offer [solarization-resistant multimode fiber](#).

c. Based on 5 GW/cm² for 1064 nm Nd:YAG laser with 10 ns pulse length and input spot size equal to 80% of the core diameter.

d. Based on 1 MW/cm² for 1064 nm Nd:YAG laser and input spot size equal to 80% of the core diameter.

e. This tool will strip off the buffer for termination to the coating.

f. We regret that we cannot provide this proprietary information.

Annexe 2. Microfabrication

Protocole de fabrication de la microsonde opto-électrochimique (Chapitre III) :

Fabrication à partir d'un substrat de 4 pouces <100>, poli en double face, avec une épaisseur de $250 \pm 15 \mu\text{m}$

- Croissance thermique de 1-2 μm de SiO_2 sur chaque face du substrat.
- Nettoyage du substrat avec de l'acétone, de l'éthanol et séché à l'azote.
- Lithographie avec une résine photosensible AZ 5214 (négative) avec un masque sur lequel les microélectrodes, les pistes et les plots de contact ont été dessinés :

1. Etalement de la résine par *spin coating* (accélération [$\text{tours.min}^{-1}.\text{s}^{-2}$]/ vitesse [tours.min^{-1}]/ temps [s]) : 3000 / 3000 / 30 ;
2. Recuit sur une plaque chauffante à 120 °C pendant 2 minutes ;
3. Exposition aux UV à 35 mJ.cm^{-2} sous le masque ;
4. Recuit sur plaque chauffante à 120 °C pendant 1 min 30 s ;
5. Exposition aux UV à mJ.cm^{-2} sans masque ;
6. Révélation dans une solution de MIF726 pendant 1 min sous agitation.

→ Dépôt de 15 nm de Ti et 100 nm de Pt par évaporation ou Dépôt de 15 nm de Cr et 100 nm de Pt par pulvérisation (Paramètres de dépôt, voir **Chapitre II – II.1**).

→ Lift-off de la résine AZ 5214 dans de l'acétone. Puis nettoyage à l'éthanol et rinçage dans de l'eau dé-ionisé.

→ Séchage du substrat sur une plaque chauffante à 150 °C pendant 10 min.

→ Lithographie de la face avant avec une résine photosensible de SU-8,2005 (négative) avec un masque sur lequel les microélectrodes et les plots de contact ont été dessinés :

1. Etalement de la résine par *spin coating* en deux phases pour une épaisseur de 4,8 μm (accélération [$\text{tours.min}^{-1}.\text{s}^{-2}$]/ vitesse [tours.min^{-1}]/ temps [s]) : 1000 / 500 / 7, puis 3000 / 2000 / 30
2. Recuit sur une plaque chauffante à 95 °C pendant 1 min ;
3. Exposition aux UV à 140 mJ.cm^{-2} sous le masque ;
4. Recuit sur plaque chauffante à 95 °C pendant 1 min 30 s ;

5. Révélation dans une solution de PEGMA pendant 1 min sous intense agitation.

→ Lithographie pré gravure de la face arrière puis de la face avant avec de la résine photosensible SPR 220-4,5 (positive) avec un masque dessinant la structure de la microsonde, l'emplacement des microélectrodes et des plots de contact :

→ un masque sur lequel les microélectrodes et les plots de contact ont été dessinés :

1. Etalement de la résine par *spin coating* pour une épaisseur de 3,4 μm (accélération [tours.s^{-1}]/ vitesse [$\text{tours.min}^{-1}.\text{s}^{-2}$]/ temps [s]) : 4000 / 4000 / 30
2. Recuit sur une plaque chauffante à 115 °C pendant 1 min 30 s ;
3. Exposition aux UV à 230 mJ.cm^{-2} sous le masque ;
4. Repos du substrat à température ambiante pendant 10 min ;
5. Recuit sur plaque chauffante à 115 °C pendant 1 min 30 s ;
6. Révélation dans une solution de MIF726 pendant 1 min sous agitation.

→ DRIE au BHF (Solution de HF tamponnée, $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}$) successive de la face avant, puis de la face arrière avec une vitesse de gravure de 1 μm pour 6-8 min.

→ Nettoyage dans de l'eau dé-ionisé bouillante, dans de l'acétone, puis dans de l'éthanol.

Annexe 3. Liste des communications scientifiques

Publication

Chatard C., Sabac A., Moreno-Velasquez L., Meiller A., Marinesco S., Minimally Invasive Microelectrode Biosensors based on Platinized Carbon Fibers for Brain Monitoring. *ACS Central Science* **2018** 4 (12), 1751-1760.

Chatard C., Meiller A., Marinesco S., Microelectrode Biosensors for *in vivo* Analysis of Brain Interstitial Fluid. *Electroanalysis* **2018**, 30, 977.

Chatard C., Pascual O., Jourlin Y., Marinesco S., Barbier D., Sabac A., Multiphysics Probe for Deep Brain Monitoring of Glioblastoma Environment. *Proceedings* **2017**, 1, 502.

Communication oral

Chatard C., Sabac A., Meiller A., Marinesco S., Suivi du Métabolisme Cérébral par des Biocapteurs à base de Microélectrodes en Fibre de Carbone Platinée, 24-27 septembre **2018**, *XVI colloque du Groupe Français de Bioélectrochimie*, Sète, France

Chatard C., Pascual O., Jourlin Y., Marinesco S., Barbier D., Sabac A., Multiphysics Probe for Deep Brain Monitoring of Glioblastoma Environment, 3-6 septembre **2017**, *XXXI Euroensors*, Paris, France

Chatard C., Sabac A., Meiller A., Marinesco S., Brain monitoring with Minimally Invasive Microelectrode Biosensors based on Platinized Carbon Fibers, 3-7 juillet **2017**, *XXIV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Lyon, France

Poster

Chatard C., Meiller A., Sabac A., Marinesco S., Ultra-micro biocapteurs enzymatiques pour la détection de métabolites et de neurotransmetteurs dans le cerveau, 3 mai **2016**, *BioTuesdays*, Lyon, France



FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : Chatard

DATE de SOUTENANCE : 23 novembre 2018

Prénoms : Charles

TITRE : Biocapteurs implantables pour un monitoring intracérébral minimalement invasif

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2018LYSEI086

Ecole doctorale : Electronique, Electrotechnique, Automatique (EEA)

Spécialité : Ingénierie pour le vivant

RESUME : Le fonctionnement du cerveau repose sur la libération de molécules telles que les neurotransmetteurs et les métabolites dans le milieu interstitiel. L'étude de ces molécules est donc primordiale afin de mieux comprendre leur rôle physiologique et pathologique. Pour cela, les biocapteurs enzymatiques implantables sont un outil prometteur de par leurs capacités de détection quantitative, en temps réel et dans les tissus profonds. En fonction des dimensions du biocapteur, l'impact de l'implantation peut avoir des conséquences considérables sur la composition chimique du fluide interstitiel. De plus, chaque implantation induit localement une réaction inflammatoire dite « réaction au corps étranger ». La réduction de ces réactions est indispensable afin d'obtenir des estimations plus précises de la concentration des molécules présentes. Dans ce sens, ce manuscrit exposera deux voies de réduction de l'impact lésionnel dû à l'implantation de biocapteurs. Tout d'abord, il sera présenté la miniaturisation de biocapteurs enzymatiques jusqu'à des diamètres externes inférieurs à 15 μm . Et il sera démontré in vivo que ces biocapteurs ultra miniaturisés ont le potentiel d'être implantés dans le cerveau sans induire de dommages détectables aux tissus et aux vaisseaux sanguins. Ensuite, le développement d'une sonde microfabriquée à l'aide des technologies MEMS couplant une détection électrochimique et optique sera introduit dans le cadre du suivi du fluide interstitiel péri- et intratumoral de glioblastomes modifiés pour émettre de la fluorescence. En intégrant deux types de détection sur une unique aiguille microfabriquée, cette microsonde permet de réduire le nombre d'implantations. Ces deux voies de miniaturisation ouvrent la possibilité de suivre la composition chimique du fluide interstitiel de manière moins invasive, et donc de mieux préserver la physiologie des tissus étudiés dans le cerveau.

MOTS-CLÉS : Biocompatibilité, miniaturisation, électrochimie, enzyme, optique, fluorescence, biocapteur, microsonde, MEMS, in vivo, rat.

Laboratoires de recherche : Institut de Nanotechnologies de Lyon – Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon

Directeurs de thèse: Daniel Barbier – Stéphane Marinesco

Président de jury : Nicole Jaffrezic

Composition du jury : Pierre Temple-Boyer, Stéphane Arbault, Manon, Guille-Colignon, Daniel Barbier, Stéphane Marinesco