HAL
open science

Contribution à la modélisation d'interface biologique par spectroscopie d'impédance : application au suivi de l'épithélium pigmenté de la rétine durant sa croissance et face à diverses perturbations

Jocelyn Boutzen

To cite this version:

Jocelyn Boutzen. Contribution à la modélisation d'interface biologique par spectroscopie d'impédance : application au suivi de l'épithélium pigmenté de la rétine durant sa croissance et face à diverses perturbations. Optique / photonique. Université Paris-Est, 2019. Français. NNT : 2019PESC2044 . tel-02482728v2

HAL Id: tel-02482728

https://theses.hal.science/tel-02482728v2

Submitted on 18 Feb 2020

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

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

Université Paris-Est

THÈSE DE DOCTORAT

École doctorale MSTIC : Mathématiques, Sciences et Technologies de l'Information et de la Communication

Laboratoire ESYCOM

Contribution à la modélisation d'interface biologique par spectroscopie d'impédance : Application au suivi de l'épithélium pigmenté de la rétine durant sa croissance et face à diverses perturbations

Par Jocelyn BOUTZEN

Spécialité : Électronique, Optronique et Système

Dirigée par Gaëlle Lissorgues et Olivier Français

Présentée et soutenue publiquement le 10 Septembre 2019

Devant un jury composé de :

Gaëlle Lissorgues	*Professeure*	Directrice de Thèse
Olivier Français	*Professeur*	Co-Directeur
Lionel Rousseau	*Ingénieur de Recherche*	Co-Directeur
Marie-Pierre Rols	*Directrice de Recherche*	Rapporteure
Olivier Romain	*Professeur*	Rapporteur
Catherine Villard	*Directrice de Recherche*	Présidente du Jury
Jean Gamby	*Chargé de Recherche*	Examinateur
Serge Picaud	*Directeur de Recherche*	Invité

Remerciements

Au moment de l'écriture de ces lignes je tente de me rappeler dans quel contexte me fut donnée une toute première image de la thèse. Je viens d'un milieu culturel, familial, géographique aussi, que l'on peut facilement qualifier de « scientifique ». Mais c'est sans doute à l'ENS de Cachan, que s'est réellement formé dans mon esprit la première image concrète, de ce que pourrait être ma vie professionnelle après le dernier examen. La thèse sonne alors comme une évidence, la suite logique et conciliante du master recherche. Que pourrait-il mal se passer tant que l'on suit la direction du vent ? Mais la vérité est plus nuancée, car la thèse n'est pas un long fleuve tranquille. Parfois le brouillard s'installe et il faut pourtant s'investir, se jeter à l'eau, « jouer le jeu périlleux de la pensée sans support expérimental stable », nous recommande Bachelard dans La Formation de l'esprit scientifique. Or c'est à ce moment-là, il le faut bien un jour, que les problèmes apparaissent. Ou encore que la pression s'installe puisque Bachelard nous dit également que « le réel n'est jamais ce qu'on pourrait croire, mais il est toujours ce qu'on aurait dû penser ». La thèse demande donc aussi du discernement pour ne pas se retrouver comme le capitaine d'un bateau qui coule. Pourquoi donc ? Pourquoi choisir un tel cap quand d'autres apportent, en apparence, bien plus ?

La thèse apporte une grande liberté qui ne se retrouve pas ailleurs. Dans les choix, dans les hypothèses faites, dans la liberté de travailler pour quelque chose qui tient à cœur. Cette liberté est étroitement liée à la bourse que j'ai reçue de l'ENS de Cachan et qui m'a en grande partie financé ces trois dernières années. Je tiens également à remercier Thomas Rodet pour son aide en ce sens. In fine l'argent est bien le nerf de la guerre et je voudrais donc exprimer ici, ma gratitude. Bien sur un financement n'est rien sans un laboratoire, dans mon cas le laboratoire ESYCOM à l'ESIEE, ni sans mes encadrants Olivier Français, Gaëlle Lissorgues et Lionel Rousseau que je remercie. Merci également à Julien Pagazani pour son aide ainsi qu'à Marie-Laure Lequeux. L'essentiel des expériences de ma thèse ayant été réalisées à l'Institut de la Vision, je voudrais aussi remercier Serge Picaud pour son accueil, ainsi que Valérie Fradot,

Manon Valet et Agathe Alviset pour leur assistance durant la trentaine de cultures de cellules réalisées pendant ces trois années.

Toutefois comment profiter d'une liberté dont on ne sait que faire ? « Il n'est point de moisson sans culture » disait Voltaire. Cette culture je la dois tout d'abord à mes parents qui m'ont, chacun à leur manière, donné le gout de la recherche. A mes sœurs aussi, dont je me suis imprégné du profil. A mes professeurs enfin, qui m'ont donné des connaissances et des méthodes, un tremplin qui force à prendre du recul pour prendre de la hauteur, pour faire passer la curiosité d'un vilain défaut à une qualité. Je pense à mes professeurs de prépa, spécifiquement Jean-Jacques Herstain dont je conserve précieusement les cours de Physique. Je pense aussi à tous ceux qui au cours de ma scolarité m'ont présenté différentes applications de la physique et de l'ingénierie à la biologie, comme par exemple Olivier Français et Bruno Le Piouffe.

Parfois pourtant, cette liberté se transforme en fardeau, quand l'été fructueux laisse place à l'automne des idées. C'est à de nombreuses occasions pendant cette thèse que mes amis m'ont apporté, peut être sans le savoir, un peu de soleil ou permit de changer d'air, parfois même en joignant l'utile à l'agréable. Par exemple durant des moments de rédaction à la bibliothèque, ou de discussion sur le sens des modèles mathématiques. Mais aussi sur la thèse en général, sur tout, sur rien, avec Benoit, Claire, Héloïse, Jean-Sébastien, Léo, Marie, Marwan, Quentin, Thomas, Vincent, William, et tous les autres. Sans oublier tous ces bons moments avec mes différents colocataires et amis du bureau 6306 : Alain, Maïra, Pedro, Ugur et avec tous les autres à l'ESIEE et au-delà. Merci également aux collègues à l'Institut de la Vision qui m'ont souvent accueilli dans leur petit bureau.

C'est donc avec satisfaction que je porte un regard nostalgique sur les temps passés et impatient sur ceux à venir. Car on peut en outre voir la thèse comme un moyen de mesurer ses compétences dans différents domaines. En ce sens la thèse n'est pas une fin en soi mais plutôt un début, une côte, un nouveau départ.

Introduction

Dans cette introduction on va présenter le plan général du manuscrit ainsi que le contexte de la thèse.

Les progrès dans la miniaturisation des circuits, dans le calcul embarqué ou encore dans l'Internet des objets propulsent l'utilisation de dispositifs électroniques pour des applications en biologie et santé.
Ces applications se basent sur la jonction entre deux objets bien déterminés : un système artificiel d'une part et un système biologique d'autre part, par opposition aux approches médicamenteuses, également artificielles, mais pour lesquelles on ne peut pas définir une telle frontière.

La jonction entre ces deux objets peut être de nature thermique comme un simple thermomètre, mécanique comme dans les tensiomètres ou optique comme dans les oxymètres de pouls. La frontière du système électronique peut également se situer à l'interface même avec l'objet biologique et fait donc appel à des électrodes.

Entre implants de stimulation électrique et capteurs de glucose, implantés ou non, les électrodes sont en effet au cœur du fonctionnement de nombreux dispositifs et leur utilisation dans des outils thérapeutiques ou comme capteurs suscite un intérêt grandissant dans le monde de la recherche.
Mais dans tous les cas l'électrode n'est qu'une partie du système qui est en réalité toujours constitué par l'interface électrode-électrolyte ou électrode-tissus. L'étude de la nature de cette interface est primordiale car ceci permet de faire le lien entre les grandeurs électriques mesurées ou appliquées (tensions, courant) et les informations sur le système biologique, sous condition que l'interface ne change pas.

En revanche, si l'interface change, comme les éléments en contact avec l'électrode font partie intégrante du système, une variation de ceux-ci provoquera un changement dans les caractéristiques électriques de l'interface. On peut de cette façon suivre l'évolution de l'interface électrode-tissus. Si on considère que l'électrode ne change pas, on peut assimiler ces changements à des changements sur le tissu et ainsi caractériser ce dernier. Si nécessaire, ceci peut également permettre une calibration du dispositif en prenant en compte la variation de l'interface.

Ici on se situe dans le cas où on souhaite suivre l'évolution des tissus à la surface d'électrodes qu'on considère invariantes. On utilise pour cela la spectroscopie d'impédance. Cette technique consiste à appliquer une perturbation électrique, suffisamment faible pour ne pas provoquer des réactions électrochimiques et pour considérer le système linéaire. On peut soit appliquer une excitation en courant et mesurer la tension induite, soit appliquer une excitation en tension et mesurer le courant induit. Dans ces travaux on utilisera la seconde configuration, avec une amplitude de 10 mVrms sur une bande de fréquence de 1 Hz à 1 MHz.
On sonde ainsi les caractéristiques diélectriques et conductrices des tissus présents à la surface de l'électrode.

Ceci sera détaillé dans le premier chapitre de cette thèse, qui présente le contexte de l'utilisation des électrodes en électrochimie et des applications dans l'étude de systèmes biologiques par spectroscopie d'impédance. On souhaite ici appliquer cette technique à l'étude in-vitro d'une couche de cellules de la rétine : l'épithélium pigmenté rétinien *(Retinal Pigment Epithelium, RPE).* Pour ce faire on a dû concevoir des dispositifs à électrodes, sur lesquelles vont se développer les cellules, associés à un banc de mesure automatisé. Ce travail est présenté dans le second chapitre de cette thèse. Les mesures réalisées sont associées à des modèles, qui sont présentés, en lien avec la croissance du tapis cellulaire sur différents dispositifs, dans le troisième chapitre. Le quatrième et dernier chapitre est appliqué à présenter l'étude de l'évolution du tapis cellulaire qui après croissance est soumis à des perturbations de nature diverse.

Ces travaux ont été réalisés au sein d'une collaboration entre l'ESIEE (Noisy-Le- Grand), laboratoire ESYCOM et l'Institut de la Vision (Paris). Le développement du banc expérimental et la fabrication des dispositifs a lieu à l'ESIEE avec un transfert continu à l'Institut de la Vision où l'essentiel des mesures sur système biologique sont effectuées.

Table des matières

Chapitre 1 2

1. Introduction aux bases de la structure et de la communication dans le système nerveux et quelques pathologies associées 2

1.1. Structure des cellules excitables et communication interneurones 2
1.2. Anatomie de l'œil et de la rétine 7
1.3. Rôle fonctionnel des couches de la rétine 8
1.4. Quelques pathologies de la rétine 14
1.5. Les implants à électrodes : un outil thérapeutique possible dans certaines pathologies 14

2. Différentes approches dans l'utilisation d'électrodes en électrochimie 18

2.1. Structure d'une cellule électrochimique 18
2.2. La voltamètrie cyclique 25
2.3. L'impédancemétrie 26
2.4. Application de l'impédancemétrie comme capteur dans un milieu biologique 46
2.5. Quelques considérations dans le choix du type d'électrodes vis-à-vis de la mesure effectuée 54

3. Positionnement de la thèse : l'interface entre cellules rétiniennes et électrodes dans le cadre de l'étude de l'épithélium pigmenté de la rétine. 59

3.1. Pourquoi étudier les tissus de la rétine avec des électrodes ? 59
3.2. Les cellules utilisées 60
3.3. Conclusion sur le positionnement de la thèse : Etude de l'impédance des cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine soumise à différente perturbations 62

Chapitre 2 65

1. Partie biologique 68

1.1. Procédure de culture de cellules 68
1.2. Environnement de culture 68

2. Présentation des besoins 69

2.1. Automatisation et synchronisation des éléments du système 69
2.2. Réduction des manipulations 69
2.3. Vue globale du système 71

3. Réalisation de la partie électronique et logicielle 73

3.1. La carte de contrôle Raspberry Pi 73
3.2. Le potentiostat et son circuit de multiplexage 75
3.3. Le système d'éclairage LED 81

4. Micro-fabrication des dispositifs 83
4.1. Choix des designs 83
4.2. Micro-fabrication en salle blanche 86
4.3. Lien entre la taille de l'électrode et le spectre obtenu 88
5. Réalisation de la partie mécanique 98
5.1. Fabrication des puits en PDMS 98
5.2. Collage des puits 100
5.3. Choix et fabrication du support et des éléments associés 101
Chapitre 3 107
1. Résultats préliminaires sur MEA commerciales 110
2. Le modèle électrique utilisé 119
3. Mesures sur la première série de dispositifs 126
3.1. Croissance du tapis cellulaire sur les électrodes 126
4. Mesures sur la seconde série de dispositifs 134
4.1. Croissance du tapis cellulaire sur électrode disque 136
4.2. Croissance du tapis cellulaire sur électrode de type peigne 148
4.3. Croissance du tapis cellulaire en mesure inter-quartier 153
Chapitre 4 163
1. Application du modèle à la réaction du tapis cellulaire face à des perturbations connues 166
1.1. Réaction à la perturbation des jonctions cellulaires par l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 166
1.2. Réaction du tapis cellulaire au peroxyde d'hydrogène ($H2O2$) 175
1.3. Destruction du tapis cellulaire par détergent ou par une contamination 181
2. Application du modèle à la réaction du tapis cellulaire durant l'exposition à la lumière bleue en présence de N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) 184
3. Application du modèle à la réaction du tapis cellulaire suite à des impulsions électriques 192
3.1. Déroulement de l'essai 193
3.2. Résultats et interprétations 196
4. Conclusion sur la variation des paramètres associés au tapis cellulaire 203
Annexes 207
Annexe 1 – Détails sur l'anatomie de l'œil et de la rétine 207
Annexe 2 – Modélisation des réactions électrochimiques 213
Bibliographie 225

Chapitre 1

Etat de l'art et

positionnement de la thèse

Dans ce premier chapitre on présente le contexte général de la thèse. On introduit tout d'abord le contexte biologique de l'œil : son anatomie et les groupes de cellules qui le compose. Ensuite on réalise un état de l'art de l'utilisation d'électrodes, tout d'abord de manière générale en électrochimie puis appliqué à des systèmes biologiques. Enfin on présente l'application de telles électrodes dans notre cas, c'est-à-dire pour l'étude du tapis de cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine par spectroscopie d'impédance.

1. Introduction aux bases de la structure et de la communication dans le système nerveux et quelques pathologies associées.

1.1. Structure des cellules excitables et communication interneurones

- Origine du potentiel membranaire

Toutes les cellules possèdent des éléments caractéristiques dont les plus basiques sont : la membrane, le cytoplasme et le noyau. Le noyau contient notamment l'ADN qui porte l'information génétique et est répliqué durant la division cellulaire. Le cytoplasme quant à lui contient notamment les éléments nécessaires à la production de protéines. Celles-ci sont construites à partir d'une séquence d'acides aminés assemblés en accord avec le code génétique. Celui-ci est traduit à partir de l'ARN messager, un intermédiaire qui permet la sortie de l'information génétique contenue dans le noyau vers le cytoplasme. La membrane quant à elle est constituée d'une bicouche lipidique d'une épaisseur de l'ordre de 5 nm [1]. Elle marque une frontière entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Mais cette frontière est loin d'être imperméable. Le passage d'ions de part et d'autre de celle-ci est possible à travers des conduits spécialisés appelés canaux ioniques, quand ceux-ci sont ouverts. Des petites molécules non chargées peuvent traverser la membrane également. C'est le cas du dioxygène ou du dioxyde de carbone afin de permettre la respiration cellulaire. De plus grosses molécules comme le glucose ou des molécules produites à l'intérieur de la cellule peuvent aussi voyager à travers la membrane dans certain cas et à travers des chemins spécifiques [2].

L'une des caractéristiques du milieu intracellulaire est de posséder des concentrations en espèces ioniques différente de celles du milieu extracellulaire. Ceci a pour origine la présence de pompes ioniques, des protéines transmembranaires qui forcent le passage d'ion à travers la membrane. Par exemple les pompes sodium-potassium forcent le passage d'ion sodium hors de la cellule et forcent le passage d'ions potassium à l'intérieur de la cellule avec un ratio de 3 ions

sodium pour deux ions potassium. Ainsi la conductivité du milieu intracellulaire est de l'ordre de 0.15 à 0.6 S/m [3]. Par ailleurs la membrane bilipidique elle-même possède une conductance par unité de surface très faible, de l'ordre de $10^{-13}\ \frac{S}{m^2}$ [4]. Ainsi, le déséquilibre de concentration entre les milieux intra et extra cellulaires produit une différence de potentiel à travers la membrane, c'est le potentiel transmembranaire, décrit par l'équation de Nernst

$$V_{memb} = V_{int} - V_{ext} = -\frac{RT}{zF}\ln\left(\frac{C_{int}}{C_{ext}}\right)$$

Avec *R : Constante des gaz parfaits*
T : Température (K)
z : Nombre de charges de l'ion
F : Constante de Faraday.
C_{int} *: Concentration intérieure*
C_{ext} *: Concentration extérieure*

Cette équation est valable si un seul type d'ion entre en jeu. En pratique l'établissement du potentiel de membrane fait intervenir la circulation de plusieurs ions. On utilise donc l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz, analogue à l'équation de Nernst quand plusieurs types d'ions interviennent.

$$V_{memb} = V_{int} - V_{ext} = -\frac{RT}{F}\ln\left(\frac{\sum_c p_c C_{c,ext} + \sum_a p_a C_{a,int}}{\sum_c p_c C_{c,int} + \sum_a p_a C_{a,ext}}\right)$$

Avec *R : Constante des gaz parfaits (J/K.mol)*
$p_{c/a}$ *: Perméabilité de la membrane vis-à-vis du cation/de l'anion d'indice c/a (souvent présenté relativement à celle pour le potassium qui est donc prise à 1)*
T : Température (K)
F : Constante de Faraday (C/mol).
$C_{c/a,int/ext}$ *: Concentration du cation/de l'anion d'indice c/a dans le milieu intracellulaire/extracellulaire (mol/*m^3*)*

Au repos les concentrations de différentes molécules en solutions dans le milieu intra et extracellulaires sont données dans la Figure 1.

Substance	Extracellular Fluid	Intracellular Fluid
Na^+	140 mmol/L	10 mmol/L
K^+	4 mmol/L	140 mmol/L
Ca^{2+} (free)	2.5 mmol/L	0.1 µmol/L
Mg^{2+}	1.5 mmol/L	30 mmol/L
Cl^-	100 mmol/L	4 mmol/L
HCO_3^-	27 mmol/L	10 mmol/L
PO_4^{3-}	2 mmol/L	60 mmol/L
Glucose	5.5 mmol/L	0-1 mmol/L
Protein	2 g/dL	16 g/dL

Figure 1 Concentration moyenne de différentes molécules intra et extracellulaires chez les mammifères. Extrait de [5].

Comme la quantité de charges positives sortante est plus grande que celle entrante on obtient donc un potentiel intracellulaire plus faible que le potentiel extracellulaire. En utilisant les valeurs citées précédemment on obtient en utilisant l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz un potentiel transmembranaire de l'ordre de -60 mV.

Toutes les cellules possèdent un potentiel transmembranaire du fait de la présence des pompes ioniques, chez les mammifères, celui-ci varie de -10 mV [6] à -90 mV [7] environ.

- Les cellules excitables et les canaux ioniques

Certaines cellules, appelées cellules excitables, utilisent ce potentiel de membrane, ou plutôt sa variation, comme un moyen de communication entre elles. On parle alors de potentiel d'action. Ce type de cellules possède des canaux ioniques dont l'ouverture ou la fermeture dépend du potentiel transmembranaire local qui existe au niveau du canal. On parle de canaux « voltage dépendant ». Ces canaux peuvent être spécifiques à un ion comme les canaux sodium,

potassium, calcium ou chlorure. Ou permettre le passage de plusieurs ions comme les canaux HCN (*Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel*) qu'on retrouve notamment dans le cœur.
Il existe également des canaux dont l'ouverture ou la fermeture est commandée par voie chimique (c'est-à-dire par la liaison de molécules qu'on appelle neurotransmetteurs sur des sites particuliers de la membrane) ou encore sous l'action de stimulus extérieur (lumière, son, température, pression...). Ces derniers sont présents sur les cellules excitables qui ont l'interaction la plus directe avec l'environnement : les neurones récepteurs.

- Le potentiel d'action

L'ouverture ou la fermeture commandée de canaux ioniques spécifiques perturbe localement et de manière transitoire l'équilibre ionique qui maintient un potentiel transmembranaire constant. En effet les pompes ioniques fonctionnent de manière continue pour maintenir un état stationnaire de concentrations ionique et donc de potentiel électrique. Elles ne compensent pas un changement brutal, massif et local dans la concentration des ions de part et d'autre de la membrane. Ce comportement dynamique correspond à une entrée d'ion sodium dans le milieu intracellulaire suivi d'une expulsion d'ion potassium. Le potentiel intracellulaire augmente donc avant de diminuer puis de d'augmenter légèrement à nouveau pour retrouver son niveau stationnaire. Une telle variation se fait de manière locale mais provoque l'ouverture de canaux voltage dépendant adjacent. Ainsi il y a de proche en proche propagation d'une séquence d'ouverture et de fermeture de canaux ionique qui provoque un pic de potentiel se propageant le long de la membrane cellulaire. C'est le potentiel d'action [8]. Dans le cas des neurones la membrane se prolonge de manière tubulaire et est connectée à d'autres neurones. La structure tubulaire porte le nom d'axone alors que la jonction entre deux neurones s'appelle une synapse. La membrane cellulaire peut également se prolonger sous forme de dendrites, plus courtes que les axones mais dont les zones en interaction avec d'autres neurones contiennent également des synapses. Le rôle de la synapse est de propager le potentiel d'action depuis le neurone pré-synaptique, qui envoie l'information, vers un neurone post-synaptique, qui reçoit

l'information, alors que ceux-ci ne partagent pas le même milieu intracellulaire. Concrètement la partie de la synapse liée au neurone pré-synaptique libère dans l'espace inter-synaptique des molécules, les neurotransmetteurs, qui vont se lier à la synapse du neurone post-synaptique. Cette liaison déclenche l'ouverture de canaux ioniques et la propagation d'un potentiel d'action dans le neurone post-synaptique.

Il peut y avoir de nombreuses synapses sur une cellule neuronale quand celle-ci est connectée à de nombreux neurones. L'information des neurones pré-synaptiques est donc intégrée par le neurone post-synaptique qui déclenche ou non de nouveaux potentiels d'action [9].

Quand des axones se regroupent ensemble sous forme d'une fibre, on appelle celle-ci un nerf ou une fibre nerveuse. Un nerf peut contenir des millions d'axone regroupés ensemble et qui sont parfois tous orientées vers la même fonction. Par exemple dans le nerf optique tous les axones ont une fonction liée à la mise en œuvre de la vision.

La vitesse de propagation d'un potentiel d'action est de l'ordre du m/s. Dans [10] on remarque en effet que la vitesse de propagation dans un axone dépend de son diamètre d, de la capacité de la membrane C, de la conductance surfacique de la membrane g_{memb} -en tenant compte de l'ouverture des canaux ionique-, et de la résistivité du milieu intracellulaire ρ. En prenant $C = 10^{-2}\,F/m^2,\ g_{memb} = 5\,S/m^2\ et\ \rho = 1\,\Omega m$ d'après [11] et d = 1 µm on obtient une vitesse de propagation de 0.22 m/s.

Pour la communication sur de courtes distances (par exemple entre neurones dans l'encéphale) cette vitesse de propagation est suffisante puisque les distances courtes n'induisent que de faibles délais de propagation. Par exemple 0.45 ms pour une distance de 100 µm.

En revanche si le signal doit se propager sur des distances de l'ordre de grandeur d'une taille humaine, alors la vitesse devient insuffisante.

C'est pour cela que certains axones possèdent une couche supplémentaire : la myéline. Cette membrane isolante de quelques µm à dizaines de µm d'épaisseur est constituée de graisses et de protéines. Les axones myélinisés (et de diamètre relativement important) peuvent propager des potentiels d'action jusqu'à une vitesse de 200 m/s chez la crevette Kuruma [12] et de l'ordre de 150 m/s chez l'Homme. Cependant la propagation de celui-ci est légèrement différente. L'axone

est en effet myélinisé de manière discontinu sur des longueurs qui peuvent être de l'ordre du mm chez l'Homme [13]. A chaque interruption, qu'on appelle un nœud de Ranvier, il existe des canaux ioniques si bien que le voyage du potentiel d'action se fait toujours par ouverture successive de canaux ioniques le long de l'axone. Cependant cette fois les espaces sont bien plus grands entre eux, ce qui augmente nettement la vitesse de propagation. Ce mode de propagation s'appelle la conduction saltatoire, car dans l'axone myélinisé le potentiel d'action « saute » de nœud en nœud.

1.2. Anatomie de l'œil et de la rétine

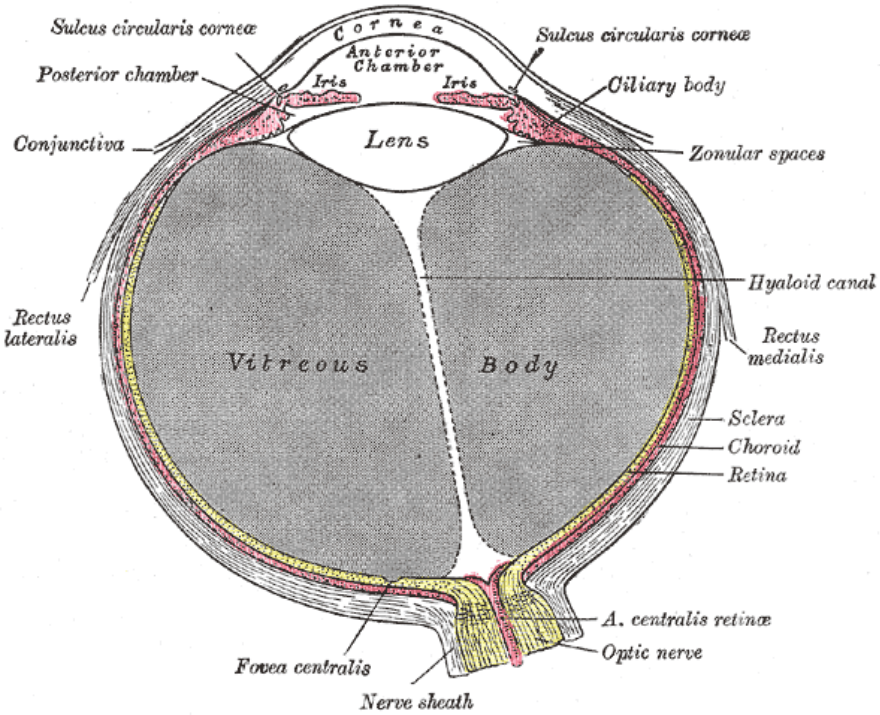

Figure 2 Gravure d'une vue en coupe de l'œil humain. Extrait de [14].

Les yeux sont un ensemble de deux systèmes optiques qui permettent la vision chez l'Homme ainsi que chez de nombreux autres animaux. Une illustration est donnée Figure 2. On peut décomposer la structure d'un œil en deux parties qu'on appelle des segments. Le segment antérieur (vers l'avant du corps) et le segment postérieur (vers l'arrière du corps). Chacune de

ces deux parties est remplie d'un liquide transparent, l'humeur aqueuse dans le segment antérieur et l'humeur vitrée (ou simplement le vitré) dans le segment postérieur.

Le segment postérieur contient la sclère, la choroïde, la rétine, et est rempli par le vitré, un gel transparent entouré d'une fine membrane, la membrane hyaloïde.
La sclère est une membrane opaque constituée de tissus conjonctifs qui forme la structure de l'œil et s'étend du nerf optique à la cornée. Elle est recouverte dans sa partie interne (par rapport au centre de l'œil) par la choroïde, une membrane très riche en vaisseaux sanguins elle-même recouverte par la membrane de Bruchs, une fine membrane de quelques micromètres d'épaisseur [15], puis par l'épithélium pigmenté rétinien (retinal pigment epithelium, RPE). C'est une monocouche de cellules épithéliales qui contiennent divers pigments sous forme de grains dans le cytoplasme. Enfin, en contact avec les cellules RPE on trouve la rétine, une multicouche de cellules excitables qui ont pour but de convertir la lumière en information nerveuse.
Une description plus détaillée de l'anatomie de l'œil et de la rétine est présente en annexe de ce chapitre.

1.3. Rôle fonctionnel des couches de la rétine

- Introduction au fonctionnement des photorécepteurs

Comme décrit précédemment et en annexe la rétine comporte différentes couches. Celles-ci contiennent des cellules qui ont des fonctions particulières.
Les photorécepteurs réalisent la phototransduction entre la lumière et la variation du potentiel membranaire. Dans les bâtonnets à l'obscurité celle-ci a lieu à travers un intermédiaire chimique (qu'on appelle second messager), la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui est constamment renouvelée par une enzyme, la guanylyl cyclase. La présence de celui-ci provoque l'ouverture de canaux sodium, laissant ainsi les ions sodium rentrer dans le milieu intracellulaire. Ceci a pour conséquence d'augmenter le potentiel intracellulaire. Le potentiel de membrane des bâtonnets dans l'obscurité est donc d'environ -30 mV. Dans ces conditions les

bâtonnets libèrent un neurotransmetteur, le glutamate, dans le milieu intersynaptique. Quand de la lumière frappe les bâtonnets elle est absorbée par un pigment, la rhodopsine. Celui-ci contient une molécule, le rétinal dont la conformation passe d'une structure 11-cis à tout-trans durant un processus qui se nomme photoisomérisation. Un ensemble de réactions chimiques que nous ne détailleront pas mène ensuite à la réduction de la GMPc. Ce mécanisme présente également une fonction d'amplification puisque la photoisomérisation d'une molécule de rétinal provoque la réduction d'un grand nombre de GMPc. Celle-ci ne déclenche alors plus l'ouverture de canaux sodium et le potentiel de membrane décroit jusqu'à une valeur d'environ -65 mV. Dans ces conditions les bâtonnets ne libèrent plus de neurotransmetteurs dans le milieu intersynaptique [16].

Quand l'intensité lumineuse est trop forte, l'ensemble des GMPc est réduite et on obtient une saturation de la réponse nerveuse des bâtonnets. C'est pourquoi les bâtonnets sont quasiment réservés à la vision nocturne. Un processus d'adaptation faisant intervenir les ions calcium et la guanylyl cyclase a lieu pour permettre aux photorécepteurs de retrouver un potentiel de membrane non saturé face à des changements de bande dynamique de la luminosité.

Les cônes fonctionnent selon un principe analogue, à la différence près que les trois types de cônes possèdent chacun un pigment dont le maximum de sensibilité à lieu pour une longueur d'onde d'environ 420 nm (bleu, cônes type S), 530 nm (vert, cônes type M) ou 560 nm (rouge, cônes type L), contre 500 nm (bleu-vert) environ pour la rhodopsine des bâtonnets [17], [18].

- Photorécepteurs et acuité visuelle

La densité de photorécepteur est responsable de la qualité de détails qu'il est possible de distinguer sur un objet. Ils déterminent en théorie la résolution de l'œil.

Dans la Figure 3 d'après [19] on peut estimer le diamètre d'un cône dans la fovéa à environ 2.5 µm.

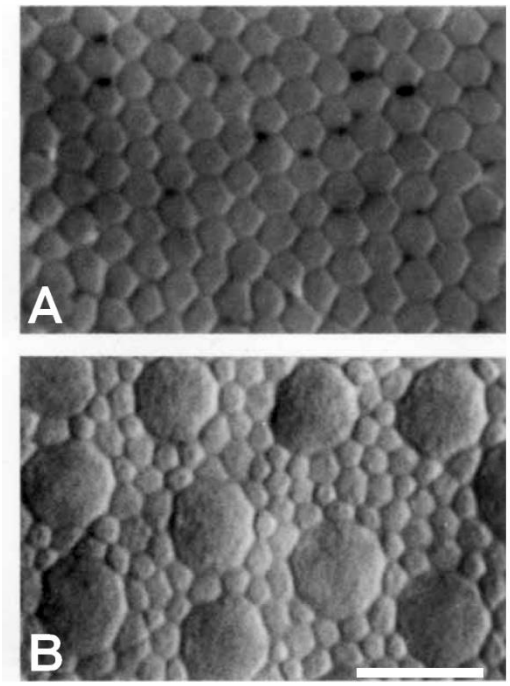

Figure 3 Images au microscope optique de la topographie des photorécepteurs de la fovéa (A) et de la proche périphérie (B). La fovéa ne contient que des cônes. La proche périphérie contient des cônes (grosses cellules) et des bâtonnets (petites cellules). Barre d'échelle : 10 µm. Extrait de [19].

Dans la fovéa, responsable de l'acuité visuelle, on ne trouve que des cônes, tous juxtaposés. On peut donc calculer l'angle formé par deux rayons qui frapperaient deux cônes cotes à cotes en passant le système optique de l'œil en utilisant la formule suivante :

$$\theta = \arctan(\frac{d}{f})$$

Il nous faut pour cela avoir accès à la longueur focale réduite du système optique de l'œil f qui est estimée à 17.053 mm par la méthode de Gullstrand dans [20]. On utilise également la distance entre deux cônes de la fovéa $d = 2.5$ µm d'après la Figure 3 dans [19].

On en déduit que l'angle formé par ces deux rayons est de 0.0083° soit 0.5'. C'est l'angle minimum de résolution (MAR). Cela correspond à une acuité visuelle de 20 dixièmes, l'acuité vis-à-vis des dimensions considérées [21].

Decimal	Snellen fractions						MAR	LogMAR
	6m	5m	4m	3m	20ft	10ft		
0.010	6/600	5/500	4/400	3/300	20/2000	10/1000	100	2.0
0.012	6/480	5/400	4/320	3/240	20/1600	10/800	80	1.92
0.016	6/380	5/320	4/250	3/190	20/1250	10/625	63	1.8
0.020	6/300	5/250	4/200	3/150	20/1000	10/500	50	1.7
0.025	6/240	5/200	4/160	3/120	20/800	10/400	40	1.6
0.03	6/190	5/160	4/125	3/95	20/630	10/315	32	1.52
0.04	6/150	5/125	4/100	3/75	20/500	10/250	25	1.4
0.05	6/126	5/100	4/80	3/63	20/400	10/200	20	1.3
0.06	6/95	5/80	4/63	3/47	20/320	10/160	16	1.22
0.08	6/75	5/63	4/50	3/37	20/250	10/125	12.5	1.1
0.10	6/60	5/50	4/40	3/30	20/200	10/100	10.0	1.0
0.12	6/48	5/40	4/32	3/24	20/160	10/80	8.0	0.92
0.16	6/38	5/32	4/25	3/19	20/125	10/63	6.3	0.8
0.20	6/30	5/25	4/20	3/15	20/100	10/50	5.0	0.7
0.25	6/24	5/20	4/16	3/12	20/80	10/40	4.0	0.6
0.32	6/19	5/16	4/12.5	3/9	20/63	10/32	3.2	0.5
0.40	6/15	5/12.5	4/10	3/7	20/50	10/25	2.5	0.4
0.50	6/12	5/10	4/8.0	3/6	20/40	10/20	2.0	0.3
0.63	6/9.5	5/8.0	4/6.3	3/5	20/32	10/16	1.6	0.22
0.80	6/7.5	5/6.3	4/5.0	3/4	20/25	10/12.5	1.25	0.1
1.00	6/6.0	5/5.0	4/4.0	3/3	20/20	10/10	1.00	0.0
1.25	6/4.8	5/4.0	4/3.2	3/2.4	20/16	10/8.0	0.80	- 0.1
1.63	6/3.8	5/3.2	4/2.5	3/1.9	20/12.5	10/6.3	0.63	- 0.2
2.00	6/3.0	5/2.5	4/2.0	3/1.5	20/10	10/5.0	0.50	- 0.3
2.50	6/2.4	5/2.0	4/1.6	3/1.2	20/8.0	10/4.0	0.40	- 0.4

Figure 4 Tableau de conversion entre différentes notations de l'acuité visuelle. Dans la colonne « MAR » l'unité est la minute d'angle. Adapté d'après [22]

En pratique l'acuité visuelle chez l'Homme est plus faible (de l'ordre de 10 dixièmes soit 1' de résolution) du fait des imperfections du système optique ou du traitement réalisé par le cerveau [21].

En dehors de la macula, l'acuité visuelle devient faible voir très faible. Elle atteint par exemple un angle MAR de $1.35/5 = 0.27°$ soit moins de 0.65 dixièmes à seulement 30° de la fovéa Figure 5.

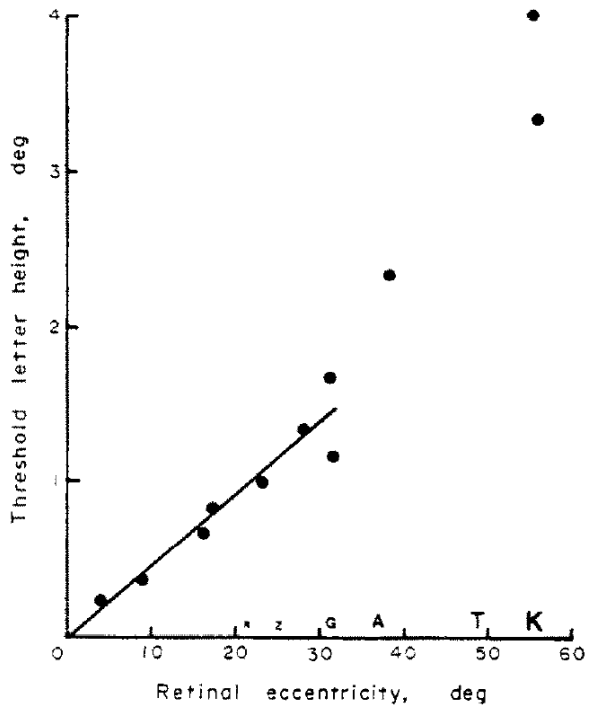

Figure 5 Hauteur minimale de lettres (échelle Snellen) lisibles en fonction de l'éloignement angulaire à la fovéa. Une lettre dans l'échelle Snellen apparait selon un angle de 5 fois l'angle MAR. Figure Extrait depuis [23].

Ceci est d'une part liée à une quasi absence de cônes dans cette région, d'autre part au fait et qu'ils sont plus gros. De plus alors qu'au centre de la rétine, un cône est finalement connecté à une seule cellule ganglionnaire, dans la périphérie une cellule ganglionnaire peut intégrer la réponse d'un nombre de photorécepteurs pouvant aller jusqu'à 20 [21]. Ceci accroit la sensibilité mais diminue la résolution.

La transmission « verticale » de l'information se fait via les cellules bipolaires puis ganglionnaires mais il existe également une transmission d'information « horizontale » qui a lieu au niveau des couches plexiforme internes et externes. Au niveau de la couche plexiformes externe, les cellules horizontales réalisent des connexions intermédiaires entre les cellules bipolaires et les photorécepteurs. Sur la rétine cette connexion se fait sous forme d'un anneau qui entoure la zone où a lieu la connexion directe entre photorécepteurs et cellule bipolaire.

Au niveau de la couche plexiforme interne, les cellules amacrines réalisent une forme d'intégration similaire au niveau des cellules ganglionnaires. Ce traitement participerait à l'amélioration de la vision des contrastes et des contours [17].

- L'épithélium pigmenté

La neuro-rétine est déposée sur la couche des cellules de l'épithélium pigmenté. Cette couche a tout d'abord un rôle nutritif des photorécepteurs puisque des nutriments et de l'oxygène sont transmis à travers. Elle participe aussi à l'élimination des déchets. Le sang et les trop grosses molécules ne traversent cependant pas celle-ci, et les cellules RPE constituent ainsi une partie de la barrière sang-rétine (blood retina barrier, BRB). C'est également dans cette couche qu'a lieu la réisomérisation du retinal après que celui-ci ait été transformé par la lumière afin qu'il puisse être à nouveau utilisé par les photorécepteurs, c'est une partie du cycle de la vision [24], [25].
Les pigments présents dans les RPE permettent aussi l'absorption de la lumière qui ne l'a pas été par les photorécepteurs [25]. Cette couche joue donc un rôle de soutient essentiel et son endommagement peut induire des pathologies comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [26], [27], [28].

Les nutriments et l'oxygène proviennent du sang qui circule dans les capillaires sanguins de la choroïde. Mais le flux sanguin aurait également un autre rôle. En effet, la lumière absorbée par les cellules RPE est absorbée par ses pigments et convertie en chaleur. Celle-ci doit être évacuée pour limiter l'augmentation de température du milieu qui serait dommageable à la rétine. C'est pourquoi le flux sanguin au niveau de la choroïde est très important, au-delà de celui du rein quand on rapporte celui-ci à la masse de tissus. Par ailleurs relativement peu d'oxygène en est extrait ce qui ne justifierait pas un tel débit. La choroïde aurait donc également un rôle de dissipateur thermique [29], [30], [31], [32].

1.4. Quelques pathologies de la rétine

Des disfonctionnements dans les processus normaux ayant lieu dans l'œil et la rétine peuvent mener à des défauts dans la vision voire la cécité. Par exemple, un fort taux de glucose comme celui qui peut se retrouver chez des patients diabétiques peut mener à une rétinopathie diabétique. C'est la première cause de cécité chez les adultes aux Etats-Unis. L'hyperglycémie aurait pour conséquence une dégradation de la barrière sang-rétine et la dégradation de la paroi de vaisseaux sanguins de la rétine [33].

Une autre maladie contient également comme symptômes la perte d'efficacité de la BRB, ainsi que la formation de néo-vaisseaux sanguins dans la rétine, c'est la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) de type humide. Un autre type de DMLA dite de type sèche n'implique pas la formation de néo-vaisseaux. Toute les deux mènent à la cécité par destruction des photorécepteurs au niveau de la macula, et donc à une tache dans la vision centrale.

Les causes primaires de ces maladies restent encore débattues et il est parfois difficile de séparer les symptômes des causes initiales qui les déclenchent.

Parmi les causes possibles, il peut exister une origine génétique. C'est par exemple le cas des rétinites pigmentaire, dans lesquelles des anomalies dans de nombreux gènes (plus de 45, [34]) mènent à la destruction progressive des bâtonnets puis des cônes ce qui mène à une perte de la vision périphérique dès l'adolescence puis de la vision centrale à l'âge adulte.

1.5. Les implants à électrodes : un outil thérapeutique possible dans certaines pathologies

Les implants rétiniens (parfois appelés prothèses rétiniennes) font partie des derniers représentants d'implants de stimulation des circuits neuronaux sensoriels.

Ils ont pour but de se substituer aux photorécepteurs quand ceux-ci ont disparu à la suite d'une dégénérescence telle que la DMLA ou la Rétinite Pigmentaire.

La recherche sur les implants rétiniens tels que décrits ici commence à la fin du 20ème siècle [35]. Cependant des stimulations (notamment du cortex visuel) induisant des flashs lumineux relativement localisés (phosphènes) ont eu lieu avant [36].

Une caméra, typiquement fixée sur des lunettes, permet de capturer des informations de la scène. Un circuit embarqué applique des transformations du signal avant de le transmettre à l'implant. Pour certaines technologies la caméra n'est pas nécessaire et l'implant est directement stimulé par la lumière naturelle, dont le signal est ensuite amplifié.

La partie implantée est une matrice constituée de quelques dizaines à une centaine voire un millier d'électrodes dont le diamètre est de 30 à 400 µm. Les électrodes sont beaucoup plus petites que pour les autres types d'implants à électrodes comme les implants de stimulation cardiaque puisqu'on obtient une surface environ 100 fois plus faible pour une électrode de 100 µm. L'épaisseur de la partie implantée est de l'ordre de quelques dizaines de µm [37]. Les implants peuvent être avec fil (qui sort de l'œil mais pas du corps) [38], [39] et avec communication inductive, sans fil [40], [41] et avec communication photovoltaïque ou mixtes [42] avec communication inductive (puissance et contrôle) et photovoltaïque (données visuelles).

Les électrodes sont placées, soit sous la rétine (sous-rétinien), là où se trouvent normalement les photorécepteurs (par exemple : implant Alpha AMS). Dans ce cas les électrodes stimulent idéalement les cellules bipolaires restantes saines dans la rétine. C'est l'implantation la plus délicate d'un point de vue chirurgical. Sinon l'implant est placé sur la rétine (épi-rétinien), face à la couche de fibres du nerf optique et des cellules ganglionnaires. Cette implantation est plus simple et autorise des implants plus gros. En revanche, elle ne permet pas au signal transmis d'être traité de manière physiologique par le reste de la rétine saine comme c'est le cas pour l'implantation sous-rétinienne.

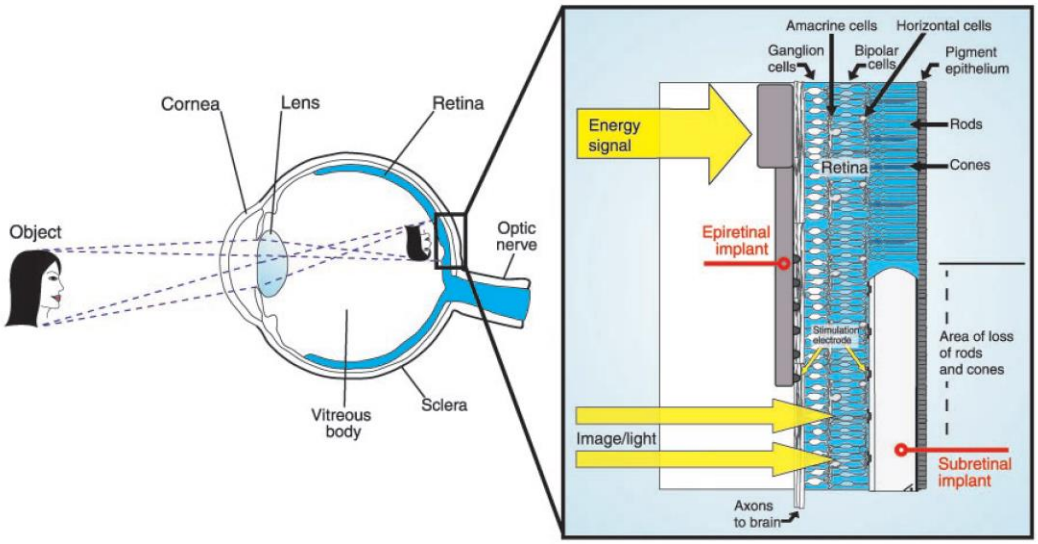

Figure 6 Schématisation des deux types d'implantations possibles. Extrait de [35].

Un essai clinique sur 6 patients a eu lieu en 2004 pour l'implant sous-rétinien ASR (*Artificial Silicon Retina*) de Optobionics. Une amélioration mesurable est rapportée pour 3 patients [41]. Selon son site web la société a depuis cessé ses activités.

A l'heure actuelle (2018) les implants rétiniens les plus avancés sont toujours en phase d'essais cliniques, sur un nombre faible de patients, environ une centaine dans le monde. Seul l'implant Argus II de Second Sight a reçu une autorisation de mise sur le marché en Europe (2011) et aux Etats-Unis (2013) mais reste en phase d'essais [43], [44].

Les patients implantés ont une acuité visuelle extrêmement faible. En effet pour les essais de l'Argus II (30 participant, en cours), comme pour ceux des implants Pixium Vision IRIS V1 (8 participants, terminée en Octobre 2017, résultats pas encore publiés) ou IRIS II (10 participants, en cours) l'un des nombreux critères est que l'acuité visuelle du meilleur œil ne soit pas meilleure que logMAR = 2.3 soit une acuité inférieure à 0.05 dixièmes [45], [46], [47].

En France quelqu'un est atteint de cécité si son acuité visuelle du meilleur œil est inférieure à 0.5 dixièmes [48] (1 dixièmes aux Etats-Unis [49]). La largeur du champ visuel rentre en compte également. L'amélioration de vue attendue, devant les risques, reste donc limitée.

En effet la limite théorique d'acuité visuelle atteinte par un implant peut se déduire du pas entre électrodes selon une méthode analogue à celle utilisée dans la partie 1.3 avec les

photorécepteurs. Pour un pas de 70 µm dans l'implant Alpha AMS de Retina Implant AG [42] parmi les plus faibles des implants en essai clinique actuellement, on obtient un logMAR = 1.15 soit une acuité maximale théorique de 0.7 dixièmes. En pratique, il n'a pu être mesuré l'acuité visuelle que de seulement 2 patients (en 2013) avec des valeurs obtenues de 0.1 et 0.4 dixièmes [50]. Ces résultats sont assez proches de ceux obtenus par l'Argus II qui rapporte que la meilleure acuité visuelle mesurée chez un patient implanté est de logMAR = 1.6 soit 0.25 dixièmes [39].
Ceci questionne l'effet attendu d'une modification de la géométrie sur l'acuité obtenue puisque deux implants aux géométries très différentes (60 électrodes de 200 µm de diamètre contre 1500 électrodes de 30 µm de diamètre pour l'Argus II et l'Alpha AMS respectivement) obtiennent des résultats proches.

On peut en revanche noter qu'un essai clinique est actuellement en cours depuis Aout 2018 pour l'implant PRIMA de Pixium Vision (5 patients en France et 5 aux Etats-Unis). Cet essai récent cible des patients dont l'acuité du meilleur œil est inférieure à logMAR = 1.3 soit 0.5 dixièmes, le seuil légal de cécité en France. Ceci laisse présager des résultats éventuellement légèrement meilleurs que pour les implants cités précédemment.
La grande diversité des géométries et des approches s'explique par l'absence de consensus dans la méthode optimale de stimulation parmi ces différentes phases préliminaires d'essais cliniques. En particulier on observe une grande variation du nombre total et de la géométrie des électrodes. Par ailleurs les essais cliniques sont indépendants et donc non harmonisés entre eux ce qui rend difficile la comparaison des différents implants comme souligné dans [43]. Cette absence de consensus existait également dans les implants cochléaires jusque dans les années 1995 [51].

La compréhension de l'interface électrode-électrolyte et électrode-tissus peut participer à l'établissement d'un tel consensus. En effet celle-ci est nécessaire à l'étude et à l'amélioration des implants rétiniens ou des implants de stimulation à électrodes en général.

Enfin les informations présentées dans cette partie sont bien sûr amenées dans le contexte de l'écriture de cette thèse (2018-2019). Les évolutions dans le domaine des applications de la technologie en santé étant extrêmement versatiles, celles-ci pourraient rapidement ne plus être à jour.

2. Différentes approches dans l'utilisation d'électrodes en électrochimie.

2.1. Structure d'une cellule électrochimique

Une cellule électrochimique est constituée de 4 éléments. L'électrode de travail, l'électrode de référence, la contre électrode et l'électrolyte. Les différents éléments sont connectés à un potentiostat.

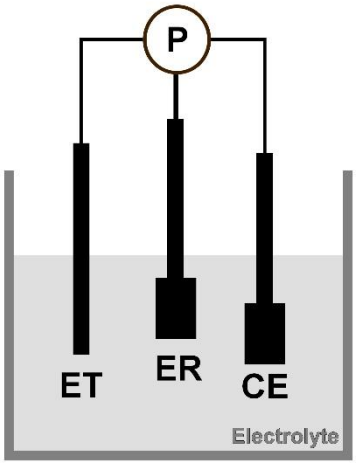

Figure 7 Schéma d'une cellule électrochimique classique. ET: Electrode de travail, CE: Contre électrode, ER: Electrode de référence, P : Potentiostat.

- L'électrolyte au sens large

L'électrolyte est la substance qui contient les espèces qui réagissent durant la réaction électrochimique. Ces espèces peuvent être chargées et ont alors un mouvement sous l'effet d'un champ électrique (migration) et/ou d'un gradient de concentration (diffusion) à l'intérieure de l'électrolyte. Sinon elles sont solides à la surface des électrodes.
On peut noter que l'électrolyte n'est pas nécessairement une solution mais peut être un solide ou un gel (Exemple : batterie lithium-polymère). Et si c'est une solution celle-ci n'est pas forcément aqueuse [52]. Toutefois ici on n'évoquera pas ces deux derniers types d'électrolyte et on se concentrera sur les électrolytes aqueux.
Il faut noter que les électrons ne sont pas présents en tant que tel dans l'électrolyte. Ce sont les espèces chargées qui portent le courant électrique dans celui-ci. Pour pouvoir faire la transition entre la conduction électronique en dehors de la cellule électrochimique, et la conduction ionique à l'intérieure de celle-ci, on utilise des électrodes. A l'interface électrode/électrolyte le(s) électron(s) sont intégré(s) ou prélevé(s) à une molécule. Les électrodes sont littéralement un chemin pour les électrons (qui portent l'électricité). En effet le mot a été inventé par Michael Faraday par combinaison du grec ancien ḗlektron (électricité) et hodós (un chemin) [53].

- Les éléments d'une cellule électrochimiques

Une cellule électrochimique classique comporte trois électrodes. L'électrode de travail est l'électrode au niveau de laquelle a lieu la réaction électrochimique d'intérêt. Le circuit électrique étant fermé une autre électrode permet le retour du courant. C'est la contre-électrode. Bien sur une réaction chimique a également lieu au niveau de la contre-électrode pour permettre la transition espèce chimique/électron(s). Si la réaction est une oxydation, l'électrode se nomme une anode, si c'est une réduction, une cathode.

- Les surtensions en électrochimie

Quand une électrode est traversée par un courant (ou plus largement quand elle n'est pas en équilibre avec l'électrolyte) le potentiel de celle-ci varie par rapport à son potentiel d'équilibre. Ces variations sont regroupées sous le terme de surtension (overpotential). Elles s'ajoutent ou se retranchent au potentiel de circuit ouvert. En utilisant la cellule électrochimique en cellule galvanique (pile) on soustrait la surtension au potentiel de circuit ouvert. En utilisant la cellule électrochimique en cellule électrolytique (électrolyseur) on doit compenser la surtension en appliquant une tension équivalente en plus de la tension de consigne. Le préfixe (sur)tension est adopté du point de vue de l'électrolyseur par convention.

Les surtensions sont de trois types [52]. Ohmiques, c'est la chute de tension à travers le circuit. Aussi bien dans les fils (résistance au passage des électrons) que dans la solution (résistance au passage des ions). On retrouve d'ailleurs cette « surtension » rapportée à une impédance (impédance de sortie) dans tous les générateurs. La surtension de surface (surface overpotential) représente toutes les barrières (hormis la barrière de la tension de circuit ouvert) à l'intégration ou au prélèvement d'électrons dans les molécules quand les réactifs sont disponibles à la surface des électrodes. La cinétique de la réaction est responsable de cette surtension. Indirectement le type de matériaux d'électrode et sa géométrie sont également responsables de cette surtension puisqu'ils ont une influence sur la cinétique. C'est la surtension dominante pour les courants faibles (relativement au système).

Le terme de surtension d'activation (activation overpotential) est aussi utilisé. Cependant la notion de relation électrode/espèce chimique transparait moins. Le terme peut donner l'impression de masquer l'effet catalyseur (ou inhibiteur selon le point de vue) non négligeable de l'électrode pour certaines réactions.

Pour des courants plus importants (et donc une tension appliquée plus importante), ou pour toute autre raison qui induit une déplétion des réactifs, ceux-ci sont consommés à une vitesse équivalente à celle de leur diffusion vers l'électrode. Ceci implique une dernière surtension dite de concentration (concentration overpotential).

Toutes ces surtensions sont liées plus ou moins directement au déplacement des espèces chargées. Elles n'existent donc de manière non négligeable que quand la cellule électrochimique est traversée par un courant non négligeable. Elles sont associées à un travail irrécupérable (chaleur) qui donne un caractère thermodynamiquement non réversible au système.

Ces surtensions dépendent d'un nombre de paramètres difficilement contrôlables dans le temps ou reproductibles selon les expériences. Par ailleurs elles peuvent apparaitre aussi bien sur l'électrode de travail que sur la contre-électrode, alors qu'on ne s'intéresse qu'à l'électrode de travail. C'est pour cette raison que bien que le courant circule entre électrode de travail et contre électrode, on applique ou mesure une tension par référence à une troisième électrode : l'électrode de référence.

- L'électrode de référence Ag-AgCl

En théorie on peut utiliser n'importe quel conducteur à l'équilibre dans l'électrolyte comme électrode de référence [54]. En pratique on utilise une électrode standard dont la dépendance du potentiel aux paramètres extérieurs est bien connue. Ainsi on s'assure qu'elle reste à l'équilibre. En particulier dans le cas de l'électrode de référence au chlorure d'argent (Ag-AgCl), la concentration des ions chlorure dans la solution ne doit pas varier. En pratique c'est pour cela que la structure de l'électrode est telle que représentée dans la Figure 8 où l'électrode de référence baigne dans une solution saturée d'ions chlorure et est liée à l'électrolyte à travers une membrane poreuse.

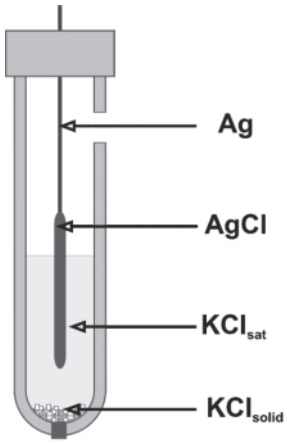

Figure 8 Schéma d'une électrode de référence Ag-AgCl. Adapté d'après [55].

Il existe aussi des électrodes Ag-AgCl plus simples sans membrane poreuse ni compartiment saturé en ions chlorure mais alors l'électrolyte doit en contenir de façon stable.

Le potentiel de l'électrode de référence dépend d'une constante : le potentiel standard, de l'activité des réactifs et des produits de son couple redox, et de la température selon la relation suivante :

Pour la demi-équation $oOx + ze^- = rRed$,

$$E = E^o_{Ox/Red} + \frac{RT}{zF}\ln\left(\frac{a^o_{Ox}}{a^r_{Red}}\right)$$

Avec *R : Constante des gaz parfaits (J/K.mol)*
a_{Ox}/a_{Red} *: Activité de l'oxydant/du réducteur*
T : Température (K)
F : Constante de Faraday (C/mol).
z : Nombre d'électrons qui interviennent dans la demi-équation
$E^o_{Ox/Red}$ *: Potentiel standard du couple redox mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène.*

Dans le cas particulier d'une électrode de référence Ag-AgCl la demi-équation est la suivante :

$$AgCl(s) + e^- = Ag(s) + Cl^-$$

En prenant une activité égale à 1 pour les solides et égale à la valeur de la concentration sans dimension pour les ions en solution, l'équation de Nernst correspondante est :

$$E = E^{o}_{AgCl/Cl^-} - \frac{RT}{F}\ln([Cl^-])$$

$E^{o}_{AgCl/Cl^-\text{vs ESH}} = 0.222\,V$ à 25°C d'après [56].

Le potentiel mesuré E dépend de la concentration en ions chlorure et à nouveaux de la température. A 25°C et avec une concentration en ions chlorure de 3 mol/L on obtient un potentiel E = 0.193 V vs ESH. Avec une concentration en ion chlorure plus proche de celle du milieu biologique extracellulaire (0.1 mol/L) on obtient E = 0.281 V vs ESH.

La notion de potentiel de référence est assez complexe puisqu'elle peut donner l'impression que l'électrode de référence Ag-AgCl (par exemple) *produit* un potentiel par rapport à la masse par rapport auquel on se réfèrerait dans l'électrolyte. En fait d'une part le potentiel standard est arbitraire. Il est fixé à travers la convention qui affirme que le potentiel standard de l'électrode standard à hydrogène est de 0V (car le potentiel chimique de l'ion H^+ est fixé à 0J/mol). D'autre part la variation du potentiel de référence avec la variation de concentration des espèces chimiques en solution se fait, à travers l'activité chimique, par référence à une valeur de concentration (typiquement 1 mol/L) fixée arbitrairement également.

La valeur du potentiel d'une électrode de référence quelconque est donc également une convention, mais une convention stable.

- Le potentiostat

Pour que l'électrode de référence soit une référence de qualité celle-ci doit être dans un état stable. Il faut donc que les produits et réactifs qui interviennent dans les réactions à la surface de celle-ci soient présents à l'équilibre. Ceci interdit le passage de courant dans l'électrode de référence ce qui est réalisé par un circuit particulier Figure 9 : le potentiostat. Ceci interdit

également la variation de concentration des produits et réactifs mis en jeu dans l'équilibre de l'électrode de référence [54].

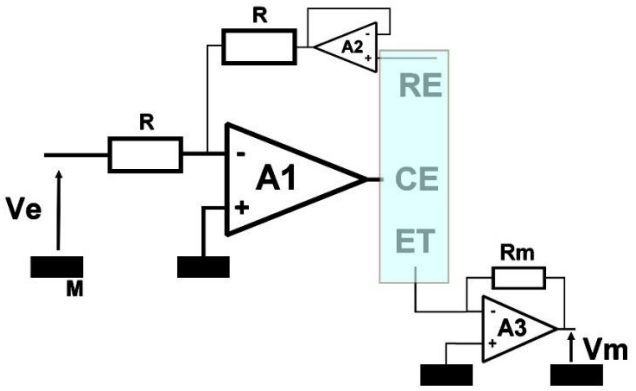

Figure 9 Circuit électrique possible pour un potentiostat à 3 électrodes. La position des électrodes sur l'image est schématique.

L'amplificateur opérationnel A2 aura donc l'impédance d'entrée la plus élevée possible (typiquement avec un étage d'entrée à transistor à effet de champ, MOSFET ou JFET). Le bloc A1 reçoit la tension de consigne Ve. Il doit pouvoir fournir un courant qui peut être important, un étage de puissance (non représenté) est donc le plus souvent présent.

Le potentiel de l'électrode de référence (RE) $V_{RE/M}$ est directement relié à celui de la consigne. Comme l'entrée non inverseur de A1 est à la masse, on a $V_{RE/M} = -V_e$. L'électrode de travail (ET) est quant à elle maintenue à la masse du circuit à travers A3, $V_{ET/M} = 0$. Ainsi $V_{ET/RE} = V_{ET/M} - V_{RE/M} = V_e$. On obtient bien le comportement recherché. Si Ve est assez grand, un courant traverse l'électrode de travail. Ce même courant traverse donc la contre-électrode (CE), ce qui fait varier son potentiel. Le potentiel de la contre-électrode est alors adapté par A1 pour maintenir $V_{ET/RE} = V_e$ et ce, dans une certaine mesure, quelles que soient les caractéristiques de la contre électrode (notamment sa surface) ou les perturbations de celle-ci ou de l'électrode de travail. Dans un montage à deux électrode (ce qui correspond à RE et CE connectés sur la Figure 9) on a $V_{CE/M} = -V_e$ et $V_{ET/M} = 0$ ce qui semble identique au cas précédent puisqu'alors $V_{ET/(CE=RE)} = V_e$. Cependant quand un courant circule entre CE et ET, les surtensions au niveau de CE et de ET sont toute deux incluses dans V_e. Dans un montage à

trois électrodes, seule celle au niveau de ET l'est, ce qui permet de contrôler le potentiel de ET de manière indépendante de celui de CE.

Quant à l'amplificateur A3 il permet la mesure du courant entre électrode de travail et la contre-électrode en mesurant la tension V_m.

2.2. La voltamètrie cyclique

La voltamètrie cyclique consiste à appliquer une tension entre électrode de travail et électrode de référence tout en mesurant le courant entre électrode de travail et contre-électrode pour former le graphique I = f(V). La tension varie entre une valeur haute et une valeur basse avec une vitesse de balayage généralement indiquée en mV/s, pendant un nombre de cycles fixé. Ces cycles sont ensuite superposés ou moyennés pour former le graphique de la Figure 10 [57].

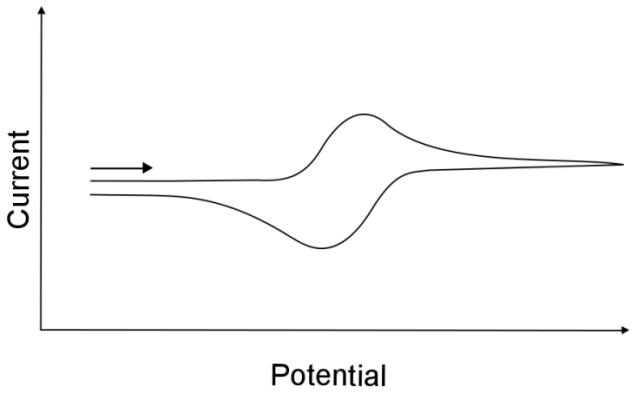

Figure 10 Schéma d'un graph de voltamètrie cyclique typique pour une réaction à transfert d'électron réversible (ou rapide). Extrait de [57].

Cette technique a pour but d'étudier certains aspects d'une cellule électrochimique. Tout d'abord la valeur du potentiel standard d'un couple redox en solution dans un solvant ou adsorbé à la surface d'une électrode (vis-à-vis de l'électrode de référence utilisée) peut se déterminer par analyse des pics de courant présents dans le graphique I(V). Ensuite la fenêtre électrochimique du solvant (ou mur du solvant) vis-à-vis de l'électrode et de la référence utilisées apparait également. Celle-ci correspond aux potentiels hauts et bas pour lesquels les

molécules du solvant sont oxydées où réduites. Quand le solvant est l'eau, ceci correspond à la formation d'oxygène ou d'hydrogène.

Enfin les différents paramètres relatifs à la cinétique de la réaction, notamment quand elle est liée aux phénomènes de diffusion peuvent être analysés en variant par exemple la vitesse de balayage. Des paramètres relatifs aux espèces chimiques peuvent également se déduire de ces mesures, tels que les coefficients de diffusions des molécules mises en jeu durant la réaction chimique. En utilisant une vitesse de balayage élevée (relativement à la taille de l'électrode), les phénomènes capacitifs à la surface des électrodes deviennent visibles. En effet le courant mesuré est alors majoritairement un courant capacitif de charge et non plus un courant lié à une réaction chimique. Nous détaillerons plus précisément ceci dans la partie 2.3. Comme la mesure du potentiel n'est stable que relativement à une électrode de référence, une voltamètrie cyclique doit être réalisée avec un système à 3 électrodes. Une mesure à 2 électrodes serait ininterprétable.

2.3. L'impédancemétrie

L'impédancemétrie (ou spectroscopie d'impédance) est, avec la voltamètrie cyclique, l'une des techniques phares très fréquemment utilisée dans la caractérisation des systèmes électrochimiques.

Mais contrairement à cette dernière, son but premier n'est pas d'étudier la barrière de potentiel qui existe pour une réaction chimique donnée. On souhaite plutôt caractériser les phénomènes de relaxation qui ont lieu via les porteurs de charges électriques dans le système électrochimique. D'un point de vue microscopique ceci correspond à la dynamique du mouvement de ces charges, dont la spectroscopie d'impédance nous donne une image moyennée.

- Technique et contexte général de la mesure d'impédance

La technique consiste à appliquer une tension (ou un courant) périodique d'amplitude donnée et à mesurer le courant (ou la tension) associé. Deux caractéristiques sont mesurées. Le rapport des amplitudes d'une part et le déphasage entre courant et tension d'autre part. L'impédance est alors représentée par un couple de nombres. Quand les signaux sont sinusoïdaux, comme c'est le cas généralement, l'impédance est alors décrite sous forme d'un nombre complexe.
On trace généralement son module et son argument en fonction de la fréquence pour former un diagramme de Bode. On peut aussi représenter sa partie imaginaire en fonction de sa partie réelle aux différentes fréquences mesurées pour former un diagramme de Nyquist. Typiquement les signaux appliqués sont d'amplitude faible, de l'ordre de 10 mV. Une amplitude faible permet de considérer que le lien entre courant et tension respecte une certaine linéarité et ainsi de modéliser le système par un circuit équivalent, composé de dipôles linéaires. En revanche ceci n'interdit pas d'ajouter une tension (ou un courant) de biais pour polariser l'électrode et par exemple étudier les phénomènes de relaxation alors qu'une réaction électrochimique a lieu. La mesure s'effectue dans une gamme de fréquence qui permet de négliger les phénomènes de propagation via l'approximation des régimes quasi-stationnaires (ARQS), soit une fréquence inférieure à 100 MHz. Typiquement la gamme de mesure est de 1 Hz (ou moins) à 1 MHz.

- Limites et vérifications possibles

Dans le cas d'une impédance électrochimique, on associe souvent un modèle électrique aux mesures effectuées. Celui-ci est composé de dipôles électriques. Une impédance est définie par généralisation de la résistance comme le rapport entre la tension complexe aux bornes d'un dipôle et le courant complexe qui le traverse. Il faut alors se demander à quoi correspondent ces deux pôles dans l'expérience. Pour une spectroscopie d'impédance en l'absence d'un courant continu circulant dans la cellule électrochimique, on utilise généralement un montage à deux électrodes (électrode de travail et contre-électrode). Ceci ne veut cependant pas dire que l'on n'applique pas de tension de polarisation aux bornes de la cellule. Dans le cas des

batteries, il faut appliquer une tension continue de polarisation égale à la tension de circuit ouvert afin de réaliser une spectroscopie d'impédance sans courant continu comme c'est le cas dans [58].

Comme dans ce cas il n'y a pas de courant stationnaire et que l'excitation alternative se fait avec une amplitude faible, on peut négliger les réactions électrochimiques. Ainsi la mesure d'impédance se fait entre deux points et on peut associer des éléments électriques à l'électrode de travail, à la contre-électrode et au milieu ionique entre les deux.

Par contre, si on applique une tension ou un courant de polarisation à une cellule électrochimique, des réactions électrochimiques ont lieu à l'interface. Si celles-ci sont stationnaires dans la fenêtre temporelle utilisée par la mesure, alors on peut associer un modèle électrique aux mesures.

Une méthode existe pour s'assurer de la stationnarité de la mesure. Il s'agit de la transformée de Kramer-Kronig (KK). Cette relation mathématique lie les parties réelles et imaginaires (ou le module et la phase) d'un nombre complexe qui respecte certaines conditions de linéarité et de stabilité notamment. En calculant, par exemple, la partie imaginaire en utilisant les données de la partie réelle, on peut s'assurer que le résultat calculé correspond aux données mesurées et ainsi que la stationnarité a été respecté durant la mesure. Si ce n'est pas le cas comme par exemple dans [59] alors on observe une divergence entre le calcul et les mesures. Ceci traduit le fait que les paramètres du modèle auraient changé entre le début et la fin de la mesure. On a appliqué cette transformée sur quelques-uns de nos signaux, aussi bien en présence qu'en l'absence de cellules et celle-ci était vérifiée. Cependant nous ne l'avons pas appliqué en routine dans l'ensemble des mesures.

En revanche, de manière plus approfondie et bien que la linéarité du système soit une condition pour la validité de la transformé KK, on ne peut se fier à celle-ci dans tous les cas. En effet, dans le domaine fréquentiel ou l'on se trouve quand on mesure un spectre, la linéarité se traduit par le fait qu'une excitation sinusoïdale à la fréquence f produit une réponse sinusoïdale à la fréquence f seulement. Si la réponse est non linéaire, alors celle-ci n'est plus

sinusoïdale mais contient des harmoniques. C'est le cas par exemple si l'excitation en tension est d'amplitude si forte que des réactions électrochimiques ont lieu pendant une fraction non négligeable de la période du signal d'excitation, aux moment où celui-ci est le plus fort.
Il est important de noter que la méthode de mesure peut ne pas tenir compte de ces harmoniques. En effet une méthode classique de mesure de l'impédance est la détection synchrone. Cette méthode consiste à projeter le signal mesuré sur un sinus et un cosinus à la fréquence d'excitation ce qui permet de rejeter les harmoniques, et ainsi, avec un temps de d'intégration assez long de mesurer des signaux d'amplitudes très faibles voir noyés dans le bruit. Mais de cette façon seule la réponse linéaire du système est mesurée. La réponse est donc linéarisée même si le système n'est pas linéaire et la transformée KK est vérifiée. Pour tenir compte de ces harmoniques il ne faut plus projeter le signal mesuré que sur la fréquence d'excitation uniquement mais sur une base de cosinus et sinus à différentes fréquences. C'est une transformée de Fourier. Le spectre du signal mesuré peut ensuite est intégré et la fréquence d'excitation modifiée pour une nouvelle mesure. Comme on ne peut pas analyser le signal sur une plage de fréquence infinie (et qu'on ne le souhaite pas non plus pour éviter d'intégrer tout le bruit du système) il y a un compromis entre rejet du bruit et mesure de l'ensemble des harmoniques du signal. Dans notre cas la mesure est effectuée par le potentiostat à la fréquence d'excitation et on ne mesure donc que la composante linéaire du système.

- Démarche appliquée pour l'évaluation d'un système linéaire pas spectroscopie d'impédance

Dans la suite on se place dans le cas d'un système linéaire et stationnaire. C'est-à-dire que d'une part, les signaux appliqués sont petits (Devant une amplitude qui génèrerait des réactions électrochimiques de manière significative). D'autre part, la concentration des espèces en solution et la composition de la surface des électrodes est restée autour d'une valeur moyenne tout au long de l'expérience.

Dans ces conditions on peut associer un modèle électrique au spectre mesuré. L'intérêt d'associer un modèle aux mesures a deux aspects.

On peut en première approche analyser l'impédance des données à différentes fréquences qu'on aura déterminé comme caractéristiques via des expériences précédentes.

On peut aussi utiliser un algorithme de régression pour déterminer les paramètres du modèle qui ajustent celui-ci aux données selon un critère donné. Le plus souvent c'est le critère des moindres carrées qui est utilisé. Il faut cependant être attentif aux résultats obtenus puisque les modèles électrochimiques utilisés présentent souvent de nombreux paramètres. L'ordre de grandeur de ceux-ci doit donc être vérifié et on peut supposer que si même un seul des paramètres a des valeurs incohérentes, alors aucun d'entre eux ne peut être analysé avec confiance. Ils ont en effet une influence les uns sur les autres dans le modèle. Ce point a été attentivement vérifié dans ces travaux.

Ce modèle est construit avec des dipôles linéaires que l'on associe à différents éléments de la cellule électrochimique. Si on adopte une vision géométrique du circuit, le premier de ces éléments est l'électrode de travail suivi par l'électrolyte puis par l'électrode de référence. On considère ici que l'électrode de référence a une surface au moins dix fois plus importante que l'électrode de travail afin de pouvoir négliger son impédance devant celle de l'électrode de travail et elle n'est donc pas représentée. Les différents éléments seront représentés dans les Figure 19 et Figure 20 après leur description.

- L'électrolyte vu par l'électrode de travail

L'électrolyte est considéré comme une solution ionique et est représenté par une résistance. La valeur de celle-ci dépend de la conductivité du milieu et de la taille de l'électrode. Pour une électrode de type disque de rayon r et baignant dans un électrolyte de conductivité σ, la résistance de l'électrolyte vue par une telle électrode quand la contre électrode est à l'infinie est donnée par la formule de Newman dans [60] :

$$R_e = \frac{1}{4\sigma r}$$

Pour une conductivité de l'ordre de 1 S/m et une électrode de rayon 1 mm on obtient une résistance de 250 Ω.

La résistance n'est pas infinie si la contre-électrode est à l'infinie puisque pour un petit disque la chute de tension a lieu principalement proche de celui-ci.

La résistance diminue par contre si la contre électrode se trouve proche de l'électrode de travail.

On peut noter que la résistance est inversement proportionnelle au rayon de l'électrode (alors que la capacité de celle-ci est proportionnelle au carré du rayon, pour une électrode lisse).

Au niveau de l'électrode de travail, deux phénomènes peuvent avoir lieu. Tout d'abord l'électrode, via un intime contact avec les molécules du solvant de l'électrolyte, a un comportement assez proche de celui d'un condensateur. En parallèle, des électrons peuvent traverser l'électrode pour aller réagir avec des molécules de l'électrolyte. Ceci est décrit dans les sous parties suivantes :

- Comportement capacitif de l'électrode

Dans le cas de l'eau, les charges négatives et positives de la molécule n'ont pas le même barycentre. Ainsi un moment dipolaire non nul apparait. Ces molécules vont ainsi s'orienter en réponse à un potentiel d'électrode non nul. Ce moment dipolaire est à l'origine, au niveau

macroscopique, de la polarisation de l'eau et donc de la permittivité relative élevée de celle-ci (88 à 0°C, 78.5 à 25°C). Les solvants apolaires, quant à eux ont généralement une permittivité relative bien plus faible. L'orientation des molécules a lieu dans un certain volume au contact de l'électrode. Ce volume a une épaisseur finie puisqu'au-delà l'influence de l'électrode sur l'orientation des molécules d'eau diminue alors que l'agitation thermique des molécules ne change pas et prend finalement le dessus. C'est pour cette raison que la permittivité relative de l'eau est plus élevée à 0°C qu'à 25 °C. Dans le modèle de Gouy-Chapman-Stern la couche de Stern correspond à la couche au contact de l'électrode. Son épaisseur est de l'ordre de quelques nanomètres. La couche de Gouy-Chapman correspond à la couche diffuse dans laquelle l'orientation des molécules devient progressivement aléatoire Figure 11.

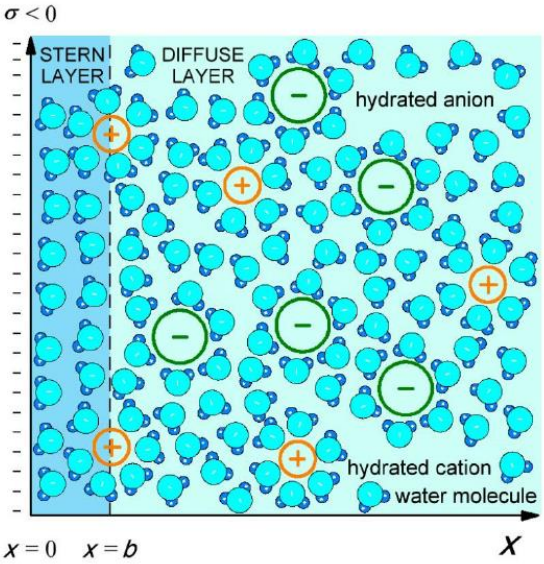

Figure 11 Illustration du lien entre électrodes et molécules du solvant. Extrait de [61].

En présence d'une grande quantité d'ions la permittivité relative diminue puisque ceux-ci imposent aux molécules d'eau une certaine orientation Figure 11. Cependant l'effet devient prépondérant pour des concentrations de quelques mol/L ce qui ne sera pas notre cas (concentration de l'ordre de quelques centaines de mmol/L).

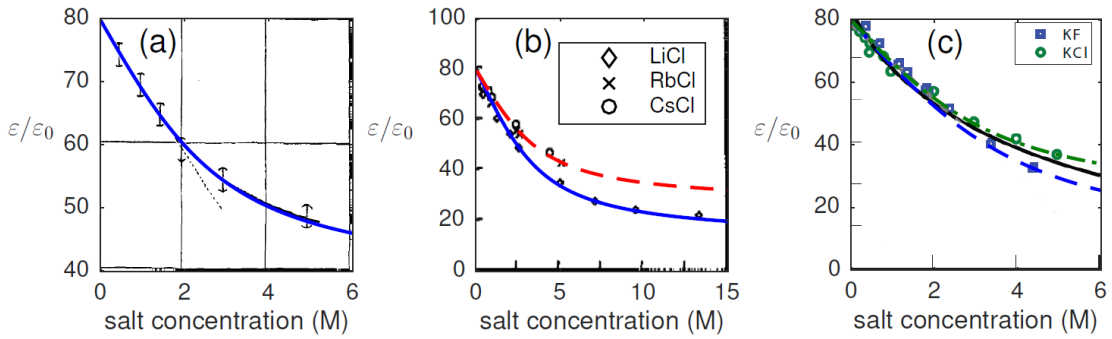

Figure 12 Variation de la permittivité relative de l'eau avec la concentration en ions à 25°C. La courbe (a) correspond au chlorure de sodium. La valeur de concentration maximale varie entre les graphiques puisqu'elle correspond au maximum de solubilité de la molécule dans l'eau. Extrait de [62].

Pour un condensateur composé de deux plans plan parallèles séparés d'une distance e, en négligeant les effets de bord la capacité surfacique entre les deux plans peut s'écrire $C_s = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{e}$ F/m² où ε_0 et ε sont respectivement la permittivité du vide et la permittivité relative du milieu. En prenant $\mathrm{e} = 1\ \mathrm{nm}$, $\varepsilon_0 = 8.85.10^{-12}\ F/m$ et $\varepsilon = 78.5$ on peut obtenir une approximation de l'ordre de grandeur de la capacité surfacique de l'électrode. La grandeur e représente l'épaisseur de la double couche et correspond à la longueur de Debye. Dans [63] une estimation est donnée dans le cas d'une espèce monovalente, qui représente la majorité des ions en solution dans le milieu biologique. Une telle espèce dissoute en solution à hauteur de 100 mM produit une longueur de Debye de l'ordre de 1 nm. La capacité totale C de l'électrode dépend alors de la surface électrochimique (qui peut être plus grande que la surface géométrique en fonction du matériau d'électrode utilisé).

L'impédance correspondante à la capacité C de l'électrode s'écrit $Z_C = \frac{1}{jC\omega}$ avec ω la pulsation.

- L'élément à constante de phase

En pratique cependant, les mesures effectués sur des électrodes en solution révèlent que le comportement capacitif de celles-ci est mieux décrit par $Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^{\alpha} Q}$,[1] une impédance

[1] On trouve également dans la littérature $Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^{1-\beta} Q}$; $0 < \beta < 1$

similaire à celle d'une capacité mais dont la phase est constante et vaut $-\alpha 90°$. On appelle donc cet élément un élément à constante de phase (CPE). La pente du module en échelle log-log vaut $-\alpha$. Q et α sont des paramètres qui représentent l'électrode de manière globale avec Q en $F.s^{\alpha-1}$ et $0 < \alpha < 1$. La dimension de Q contient bien celle d'une capacité mais le lien entre Q et la capacité au sens du stockage de charges n'est pas direct [64] et est sujet à débat. On retrouve une capacité quand $\alpha = 1$.

La définition du CPE est à l'origine phénoménologique, c'est-à-dire que son origine physique n'est pas bien définie. En effet, de nombreuses causes distinctes peuvent produire un comportement modélisable par un CPE. C'est le cas d'une distribution de constante de vitesse [65], d'une distribution d'énergie d'activation [66], [67], ou encore de variations géométriques de la surface de l'électrode, que ce soit perpendiculairement ou parallèlement au plan de celle-ci [64], [68]. Différentes descriptions plus sophistiquées de cette rugosité de surface existent, elles sont présentées sous la notion de géométrie fractale, dont la dimension non entière serait reliée à l'exposant α comme par exemple dans [69]. Toutefois cette thèse est contredite par l'expérience : dans [70], la rugosité a un effet sur α mais la dimension fractale des profils mesurés n'est pas corrélée à α. Et dans [71] $\alpha = 0.99$ ce qui est extrêmement proche de 1 alors que la surface de l'électrode est constituée de poudre de platine (ball-milled Pt), une surface poreuse et inhomogène.

Une distribution de constante de temps, exprimée par un ensemble de circuit RC parallèle en série, autrement appelés éléments de Voigt, peut permettre de représenter un élément à constante de phase (Figure 13). Il est cependant important de noter que cette distribution telle que présentée dans la suite permet simplement la représentation du CPE sous un autre point de vue mathématique sans toutefois présupposer de l'origine physique de cette distribution.

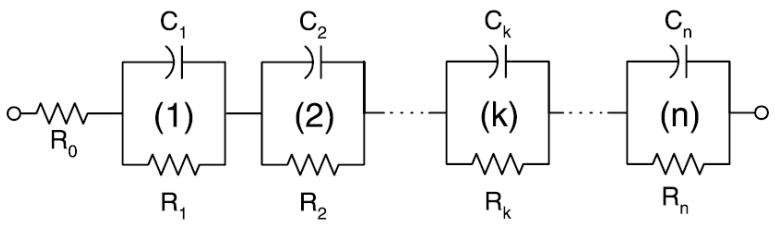

Figure 13 Eléments de Voigt en série. Adapté d'après [72].

Cette distribution de constantes de temps peut également être représentée par un ensemble de circuits RC de la forme de la Figure 16 présentée plus loin mais il faut cependant que leurs soient associée une résistance en série qui est toutefois toujours présente en pratique (résistance ohmique) [64].

Il faut également que la distribution des constantes de temps suive une loi log-normale. C'est-à-dire que les logarithmes des constantes de temps aient une distribution gaussienne [72]. Le paramètre α est alors relié à l'écart type de la distribution.
En effet l'impédance du CPE est proposée par analogie au modèle de relaxation diélectrique de Cole-Cole, lui-même étant une généralisation du modèle de relaxation diélectrique de Debye.
Dans ce dernier la permittivité relative d'un système diélectrique dont les dipôles n'ont pas d'autres interactions que celles avec le champ extérieur appliqué s'exprime par :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{inf} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_0}$$

Où τ_0 est la constante de temps de relaxation du système, ε_∞ est la permittivité relative pour une pulsation grande devant $\frac{1}{\tau_0}$ et ε_s celle pour une pulsation nulle.
Le modèle de Cole-Cole propose plutôt d'exprimer la permittivité relative par :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon' + j\varepsilon'' = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau_0)^\alpha};\ 0 < \alpha < 1$$

$$O\text{ù}\ \varepsilon' - \varepsilon_\infty = \frac{1}{2}(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\left(1 - \frac{\sinh \alpha x}{\cosh(\alpha x) + \cos\left(\frac{1}{2}(1-\alpha)\pi\right)}\right)$$

$$Et\ \varepsilon'' = \frac{1}{2}(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\left(\frac{\cos\frac{1}{2}(1-\alpha)\pi}{\cosh(\alpha x) + \sin\left(\frac{1}{2}(1-\alpha)\pi\right)}\right)$$

$$x = \ln(\omega\tau_0)$$

On retrouve le modèle de Debye avec un temps de relaxation τ_0 quand $\alpha = 1$.

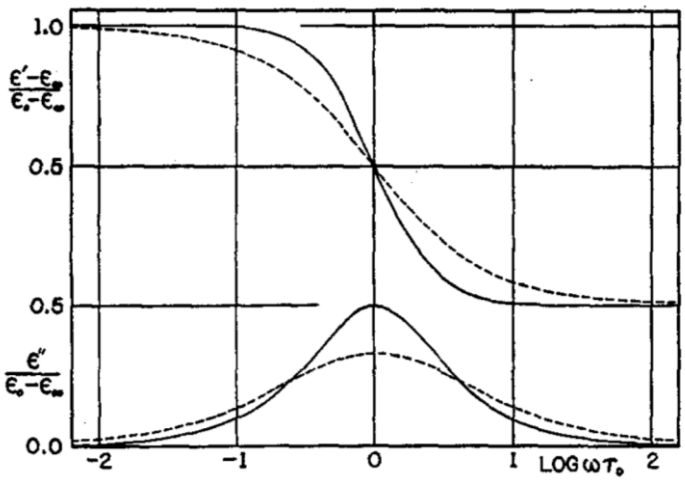

Figure 14 Parties réelles et imaginaires de la permittivité relative pour $\alpha = 1$ (trait plein) et $\alpha < 1$ (pointillés). Extrait de [73]

Il a été montré [74] que l'on peut associer à ε une distribution de constante de temps G de telle sorte que :

$$\varepsilon(\omega) - \varepsilon_{inf} = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \int_0^\infty \frac{G(\tau)d\tau}{1 + j\omega\tau}$$

[72], [75], [76]

On a $F(s) = \frac{1}{2\pi} \frac{\sin(1-\alpha)\pi}{\cosh \alpha s - \cos(1-\alpha)\pi}$

Avec $\int_0^\infty G(\tau)d\tau = \int_{-\infty}^\infty F(s)ds = 1$; $s = \ln(\frac{\tau_0}{\tau})$[2]

Et $\tau G(\tau) = F(s)$ [74]

Quand $\alpha \to 1$, $F(s) \equiv \delta(\tau - \tau_0)$, où δ est la fonction de Dirac. Ainsi l'intégrale est nulle partout sauf en τ_0 et on retrouve le modèle de Debye.

Quand $\alpha < 1$ on remarque notamment que la partie imaginaire de la permittivité relative voit son maximum décroitre et sa largeur à mi-hauteur augmenter.

ε'' est associé à l'énergie dissipée sous forme thermique (alors que ε' est associé à l'énergie stockée par le matériau). Quand α décroit on a donc un étalement des phénomènes dissipatifs dans le spectre fréquentiel.

[2] On peut également trouver $s = \ln(\frac{\tau}{\tau_0})$ dans la littérature ce qui est équivalent puisque la fonction cosinus hyperbolique est paire.

On peut passer des grandeurs permittivité et conductivité aux grandeurs d'impédance ou d'admittance en utilisant les dimensions géométriques de la cellule électrochimique. Ici on ne présage pas de la forme de cette dernière donc on va directement considérer des grandeurs impédance (ou admittance), qui contiennent donc de manière implicite ces paramètres géométriques.

Si la distribution de constante de temps a lieu à travers la distribution de la capacité tel que présenté dans le circuit Figure 15, et en considérant les résistances uniformément réparties alors l'admittance s'écrit [76] :

$$Y = \frac{1}{R_e} \frac{(j\omega\tau_0)^\alpha}{1 + (j\omega\tau_0)^\alpha}$$

Et l'impédance :

$$Z = \frac{1}{Y}$$

Où R_e est la résistance ohmique globale et $\tau_0 = R_e C_{eff}$ avec C_{eff} une capacité « effective » associée au temps de relaxation « effectif » τ_0 et à la distribution des capacités.

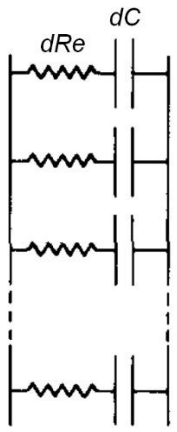

Figure 15 Modèle de distribution de la capacité surfacique sans résistance faradique. dRe représente la résistance ohmique infinitésimale qu'on considère uniformément répartie et dC représente la capacité infinitésimale. Extrait de [76]

En identifiant avec l'équation de l'admittance (ou de l'impédance) d'un élément à constante de phase en série avec une résistance ohmique qu'on considère comme la représentation équivalente du circuit Figure 15 alors on peut écrire :

$$Q = {R_e}^{\alpha-1}{C_{eff}}^{\alpha}$$

Puisque :

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{1}{Z_{CPE} + R_e} = \frac{Q(j\omega)^{\alpha}}{1 + R_e Q(j\omega)^{\alpha}}$$

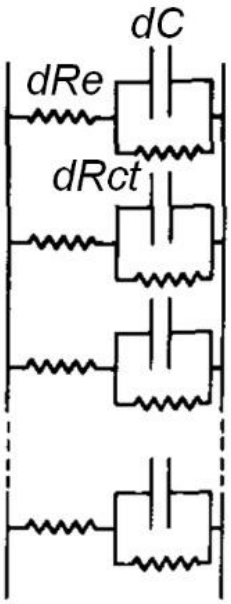

Figure 16 Eléments de Voigt et résistance ohmique en parallèle. dRe et dRct représentent respectivement les résistances ohmique et de transfert de charges infinitésimales qu'on considère uniformément réparties et dC représente la capacité infinitésimale. Extrait de [76]

Si le circuit est de la forme de la Figure 16 c'est-à-dire en présence de réactions électrochimiques alors l'admittance s'écrit :

$$Y = \frac{1}{R_e}\left(1 - \frac{1}{1+\frac{R_e}{R_{CT}}+\left(1+\frac{R_e}{R_{CT}}\right)^{1-\alpha}(j\omega\tau_0)^{\alpha}}\right)$$

Ou encore avec l'élément à constante de phase :

$$Y = \frac{1}{R_e}\left(1 - \frac{1}{1+\frac{R_e}{R_{ct}}+R_e Q(j\omega)^{\alpha}}\right)$$

L'expression de Q est alors plutôt :

$$Q = (R_e^{-1} + R_{CT}^{-1})^{1-\alpha} {C_{eff}}^{\alpha}$$

Où R_{CT} est la résistance de transfert de charge que nous aborderont en détail plus loin.

L'existence de ce type de distribution, sous forme d'un ensemble de circuits RC a été présentée comme mathématiquement représentative de l'apparition du paramètre α dans de nombreuses mesures d'impédance effectuées. Il faut cependant noter que pour obtenir les équations qui relient Q aux autres paramètres du modèle, la résistance ohmique et celle de transfert de charge sont considérées avoir une distribution homogène. La distribution de constante de temps provient donc de la distribution de capacités uniquement.

Si on observe un CPE isolé, dans le domaine temporel, en théorie quand α décroit la proportion d'énergie dissipée par période d'excitation augmente, et ce quelle que soit la fréquence. On peut exprimer ceci par la puissance active qui vaut, en régime sinusoïdal et pour un élément à constante de phase, $P = UI\cos(\alpha)$ où U et I sont les amplitudes de la tension aux bornes du dipôle et du courant le traversant.

Ainsi l'énergie moyenne dissipée dans un tel composant serait indépendante de la fréquence comme mentionné dans [73]. Il n'est cependant pas clair si considérer le CPE comme une composante du système indépendante des autres (comme dans [68]) a un sens physique ou si comme dans [76] il faut le considérer lié aux autres paramètres du système.

Un comportement de CPE mesuré (c'est-à-dire la présence du paramètre $\alpha < 1$ dans un ajustement) fournit une image globale de(s) phénomène(s) à la surface d'une électrode. Le fait que ce comportement soit assimilable mathématiquement à une distribution de constantes de temps selon certaines conditions ne signifie cependant pas si oui ou non cette distribution a un sens physique, ni son origine, ni pourquoi la distribution serait log-normal dans l'expérience considérée. Ceci est pointé à de multiples reprises dans [76], [72] et [73]. La diversité de modèles associés à un comportement de CPE ne permet donc pas de déterminer avec certitude l'origine de ce comportement quand il est mesuré dans un système non contrôlé. Dans [72] les auteurs proposent de chercher un ajustement dans lequel un ensemble d'éléments de Voigt sont combinés sans contraintes sur la distribution des constantes de temps. Cette dernière est alors

extraite de l'ajustement. Cependant celle-ci ne peut pas être interprétée comme un élément à constante de phase.

- Proposition quant à la signification physique du paramètre α

Un travail relativement récent [77] propose une explication physique à l'existence du paramètre α. Dans cet article, une augmentation du paramètre α a lieu avec l'augmentation de la rugosité de surface. Cette rugosité est provoquée par électro-dissolution progressive de la surface d'une électrode de fer monocristallin préalablement polie. Cette surface a initialement une faible rugosité macroscopique et microscopique due à un polissage important (taille de grain minimale de la pâte de polissage : 0.5 µm). Cependant à l'échelle atomique la surface demeure désordonnée ce qui provoque une inhomogénéité énergétique à l'origine de la présence du paramètre α.

Alors que le processus de dissolution a lieu les auteurs rapportent que la rugosité de la surface augmente. En effet les plans cristallographiques les moins denses sont ceux dissouts les plus rapidement. Ceci a pour conséquence d'augmenter la rugosité aux échelles locale (> 0.01 µm) et globale (< 1 mm). Cependant par la même occasion, la surface de l'électrode se rapproche de plus en plus de surfaces cristallographiques « idéales » orientées entre elles selon des angles définis par la structure de cristallisation cubique centrée du fer. Ceci a pour conséquence une homogénéisation énergétique de la surface qui est, selon les auteurs, la cause de l'augmentation du paramètre α.

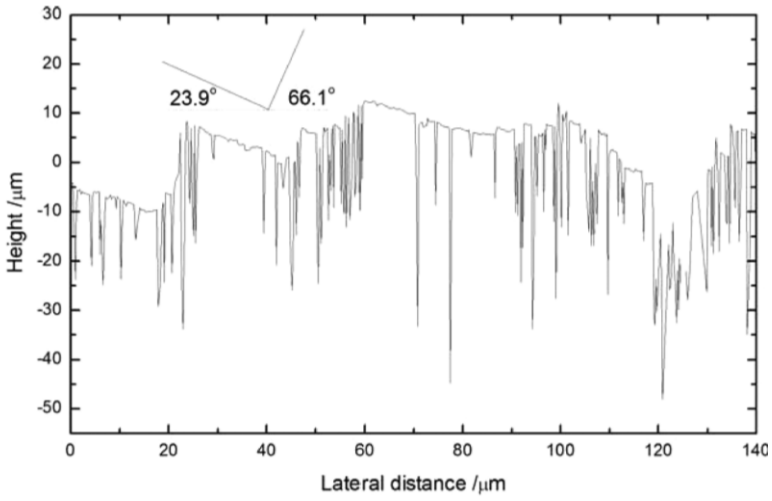

Figure 17 Profil de l'électrode après un temps de dissolution de 100 min. Pour ce profil particulier l'apparition de facettes est particulièrement visible. Extrait de [77]

Ainsi alors qu'aux échelles locales (microscopiques) et globales (macroscopiques) la rugosité augmente, à l'échelle atomique de cristallisation du cristal, la rugosité diminue puisque l'électro-dissolution fait tendre la surface de l'électrode vers une surface facettée. Quand la dissolution se poursuit les facettes fusionnent et la rugosité à l'échelle locale décroit alors que celle à l'échelle globale continue d'augmenter.

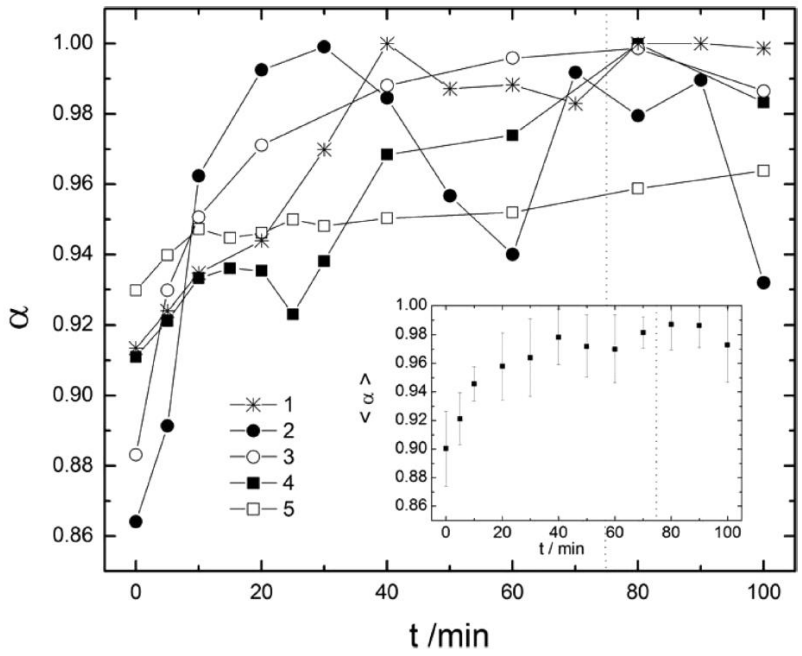

Figure 18 Variation du paramètre α avec le temps de dissolution. L'insert est le résultat de l'analyse des cinq expériences. Un trait pointillé marque la transition entre une augmentation de la rugosité locale et globale (à gauche du trait) et une augmentation de la rugosité globale mais diminution de la rugosité locale par fusion des facettes (à droite du trait) Extrait de [77].

Ainsi le paramètre α ne serait pas lié aux variations géométriques de la surface que ce soit à l'échelle globale ou même locale (> 0.01 µm) mais à l'homogénéité énergétique de celle-ci, favorisée par l'apparition de plus larges facettes cristallographique en surface. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de [78] dans lequel le paramètre α se rapproche de 1 après un recuit rapide d'une électrode d'or ce qui a pour effet d'homogénéiser la surface à l'échelle atomique sans changer drastiquement la rugosité.

Toutefois l'apparition du comportement CPE demeure ambiguë puisqu'il apparait dans de très nombreux systèmes. De plus les explications de ce phénomène ont toujours lieu dans un contexte d'expérimentations très contrôlées. Pour les systèmes où de nombreux autre paramètres peuvent entrer en jeu, comme les systèmes biologiques, une analyse préalable est donc nécessaire (notamment avant ou après la mesure du comportement CPE si possible, comme dans [77]). De cette façon l'analyse quantitative des paramètres du CPE et la

discrimination des causes qui peuvent en être à l'origine, pour le système étudié devient possible.

- Comportement résistif de l'électrode

Le comportement résistif de l'électrode correspond, dans le domaine temporel, à un passage de courant continu sous l'application d'une tension continue. Si un courant continu circule c'est que des réactions électrochimiques ont lieu. C'est pour cela que le comportement résistif de l'électrode est représenté par une résistance dite de transfert de charge : les électrons qui circulent vont réagir avec des molécules de l'électrolyte. La valeur de cette résistance est liée à la cinétique de la réaction électrochimique mise en jeu. Cette cinétique dépend notamment du potentiel d'électrode et de la température. En effet pour que la réaction ait lieu il faut que celle-ci soit thermodynamiquement favorable. Les détails de ceci ne seront pas appliqués en tant que tel dans ces travaux, c'est pourquoi on les place en annexe de ce chapitre. En revanche l'étude est nécessaire afin de savoir si on doit ajouter cette résistance de transfert de charge dans le modèle final.

La résistance de transfert de charge et l'impédance de Warburg représentent le comportement de l'électrode en termes d'impédance quand des réactions électrochimiques ont lieu. C'est-à-dire pour des tensions appliquées de l'ordre de grandeur du potentiel standard et à tension continu sinon basses fréquences (relativement à la taille de l'électrode).
Finalement on obtient le circuit équivalent de la Figure 19, c'est le modèle de Randles auquel on a ajouté un élément à constante de phase.

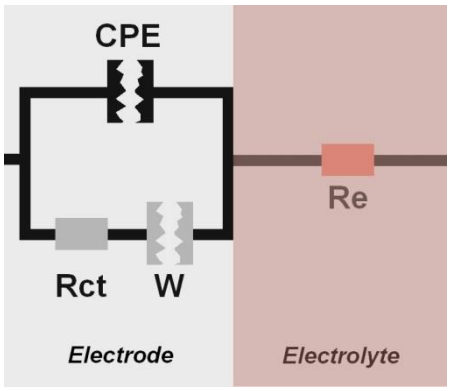

Figure 19 Circuit équivalent de l'impédance Electrode-Electrolyte.

Dans le cas où le potentiel de biais est proche de zéro et l'amplitude de la perturbation en tension est faible on peut négliger le courant dans la branche de R_{CT} et on obtient le circuit simplifié de la Figure 20.

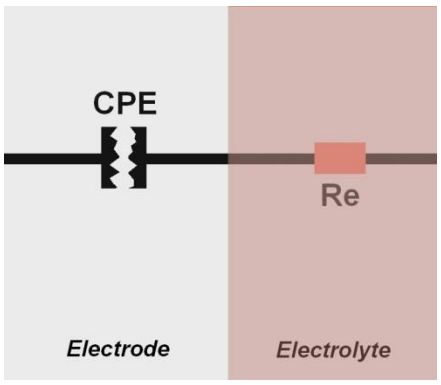

Figure 20 Circuit équivalent en l'absence de réactions électrochimiques (électrode bloquante).

Par contre, et comme précisé dans la partie précédente, la valeur Q de l'élément CPE change par rapport au modèle avec réactions électrochimiques.

2.4. Application de l'impédancemétrie comme capteur dans un milieu biologique

Jusqu'à présent on a présenté de l'impédancemétrie dans un contexte qui relève plutôt de l'électrochimie c'est-à-dire en lien avec des réactions d'oxydoréduction ou de modification de la surface de l'électrode. Toutefois si on ajoute dans l'électrolyte des composés qui ont une réponse diélectrique telle que des cellules ou des bactéries, alors ceci va avoir un impact sur les mesures observées. Ceci s'applique aussi si les éléments biologiques forment un tapis sur les électrodes. Dans cette sous partie on va présenter des exemples d'application de l'impédancemétrie en présence d'un milieu biologique.

Cette application est ancienne car déjà bien avant les années 2000 des systèmes de mesures étaient développés en ce sens.
Les premiers travaux peuvent être associés à Fricke qui étudiait en 1925 la capacité d'une suspension de particules conductrices entourées d'une membrane isolante, par exemple des cellules. Fricke applique ceci à la mesure de la concentration de cellules en suspension [79], ou encore dans le cas d'un bloc de tissus cancéreux, à la mesure de sa capacité globale qui est ensuite associée à la nature pathologique des cellules [80].

En ce qui concerne l'analyse des suspensions de cellules on peut séparer deux cas. Dans le premier cas, les cellules sont en suspension dans un réacteur et on mesure leur impédance de manière globale. Dans le second cas, une cytomètrie de flux est réalisée c'est-à-dire que les cellules sont entrainées une par une dans une zone du système où leur impédance est analysée.

- Cellules en suspension

Dans [81] les auteurs utilisent le ratio de l'impédance mesurée à 10 KHz (basses fréquence) et à 10 MHz (haute fréquence) pour évaluer la quantité de levures formées dans un bioréacteur. La mesure basse fréquence est corrélée avec la fraction volumique de levures dans le bioréacteur, quand celle-ci reste faible. L'introduction de la mesure haute fréquence permet de compenser

diverses perturbations notamment des variations de conductivité du milieu de culture. Hautes et basses fréquence sont définies relativement à une fréquence de coupure f_c qui dépend du système et est donc à l'appréciation des auteurs. Celle-ci correspond à la transition entre le comportement résistif basse fréquence et le comportement résistif hautes fréquences.

Ainsi dans [81] l'équation de l'impédance s'écrit (sans prendre en compte l'impédance de l'électrode) :

$$Z = Z_\infty + \frac{Z_0 - Z_\infty}{1 + (j\frac{f}{f_c})^{1-n}}$$

Cette équation représente de manière phénoménologique une relaxation au niveau de l'impédance, et est construite par analogie avec l'expression de la relaxation de la permittivité introduite dans la partie 2.3 d'après [73].

Z_0 et Z_∞ correspondent à l'impédance quand la fréquence est respectivement faible ou grande devant $f_c = \frac{2\pi}{\tau_0}$ et $1 - n = \alpha$.

La Figure 21 montre le lien établi par les auteurs entre le paramètre E_2, qui contient le ratio d'impédance mentionné, et la masse sèche de levure présente dans le bioréacteur.

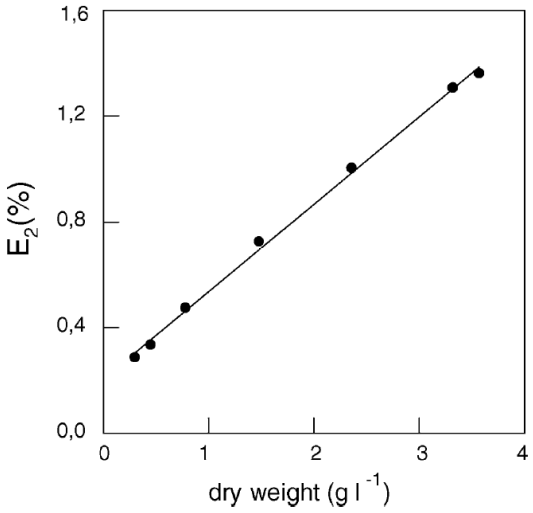

Figure 21 Relation entre le paramètre E2 et la masse sèche de levure présente dans le bioréacteur. Extrait de [81]

Un autre exemple d'application est donné dans [82]. Cette fois c'est l'impédance à 100 KHz qui est mesurée. Celle-ci est convertie en conductivité en utilisant les grandeurs géométriques du système. Huit impulsions sont appliquées à un intervalle de 1 s avec des amplitudes de l'ordre du kV/cm et une durée de 100 µs. Si l'amplitude est suffisante les impulsions produisent l'électroporation des cellules en suspension ce qui est détecté par le changement de conductivité à 100 KHz car les cellules relâchent des ions dans le milieu de culture. La Figure 22 représente l'évolution de la conductivité relativement à la conductivité initiale après application de chaque impulsion dont l'amplitude est indiquée par le symbole. Ceci permet aux auteurs d'affirmer que l'électroporation n'a pas lieu en dessous de 0.52 kV/cm.

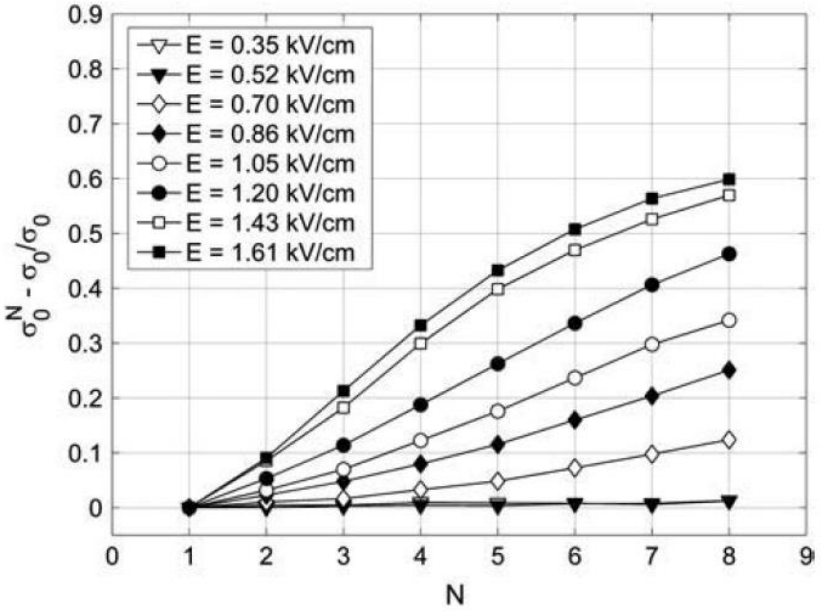

Figure 22 Evolution de la conductivité à 100 KHz relativement à la conductivité initiale après application de différentes impulsions. Extrait de [82]

- Etude de cellules uniques

Les mesures précédentes sont appliquées à un ensemble de cellules en suspension afin de déterminer des caractéristiques globales. Il existe également des applications ou de mesures sur cellules uniques sont réalisées. Dans [83], les globules blancs sanguin sont analysés et classifiés selon leur catégorie. Pour cela les globules rouges sont au préalable éliminés à l'aide de l'ajout de saponine puis la solution obtenue circule dans des micro-canaux (Figure 23). Les différents

globules blancs ainsi que des billes de latex de tailles comparables sont marqués avec différente molécules fluorescentes afin de pouvoir vérifier la nature de l'objet mesuré.

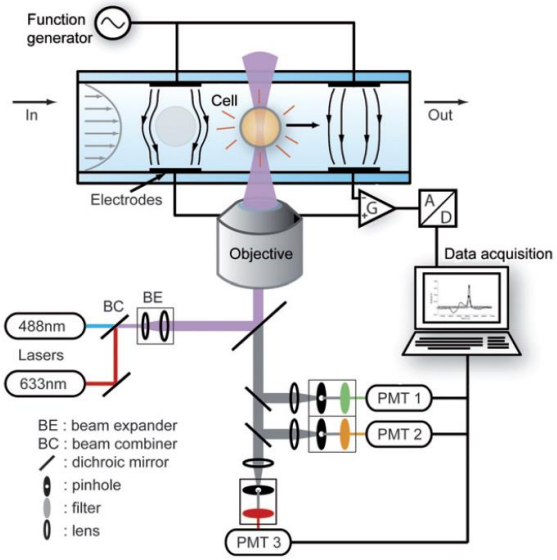

Figure 23 Exemple d'un dispositif de cytomètrie avec mesure d'impédance. Les lignes de champs représentées correspondent à un courant de basse fréquence. Extrait de [83]

Les deux électrodes permettent de mesurer le module de l'impédance à deux fréquences, 503 KHz et 1707 KHz. La première, qualifiée par les auteurs de basse fréquence est associée à la taille des cellules mesurées. En effet plus la taille des objets mesurée est petite, moins celui-ci « ferme » l'espace inter électrode. Puisqu'à cette fréquence les lignes de champs doivent contourner la cellule, l'impédance mesurée à cette fréquence reflète donc l'espace « libre » entre les deux électrodes. C'est l'axe des abscisses dans la Figure 24. Les objets plus petits sont donc associés à des impédances en basse fréquence plus faible. L'axe des ordonnées correspond au module de l'impédance à une fréquence plus élevée pour laquelle l'effet capacitif des membranes cellulaires rentre en compte. Cela veut dire que les lignes de champs peuvent alors traverser la cellule. Dans la Figure 26 on présente une illustration de ceci. A le deuxième fréquence utilisée, 1707 KHz, la capacité de membranes des cellules a donc une importance puisque c'est ce paramètre qui traduit dans quelle mesure les lignes de champs la traverse. On voit apparaitre la capacité C_{mem} qui représente la membrane cellulaire dans la Figure 25. Cette

mesure en plus hautes fréquences, présentée relativement à la mesure basse fréquence est présentée sur l'axe des ordonnées de la Figure 24 et permet d'obtenir un deuxième axe de discrimination pour des cellules de taille similaires.

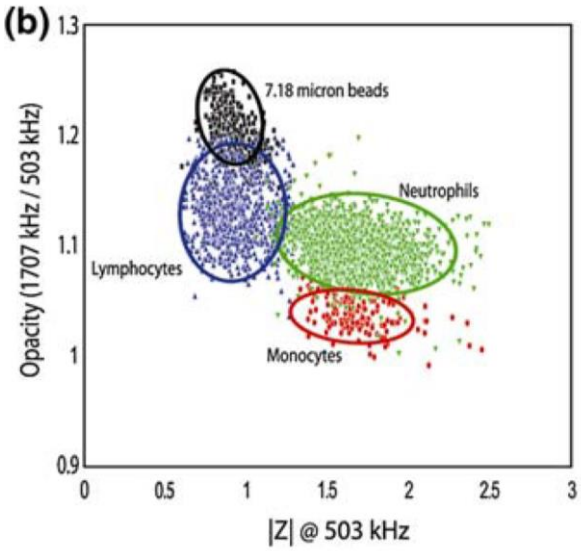

Figure 24 Distribution des types de leucocytes en fonction des paramètres d'impédance mesurés. Extrait de [83]

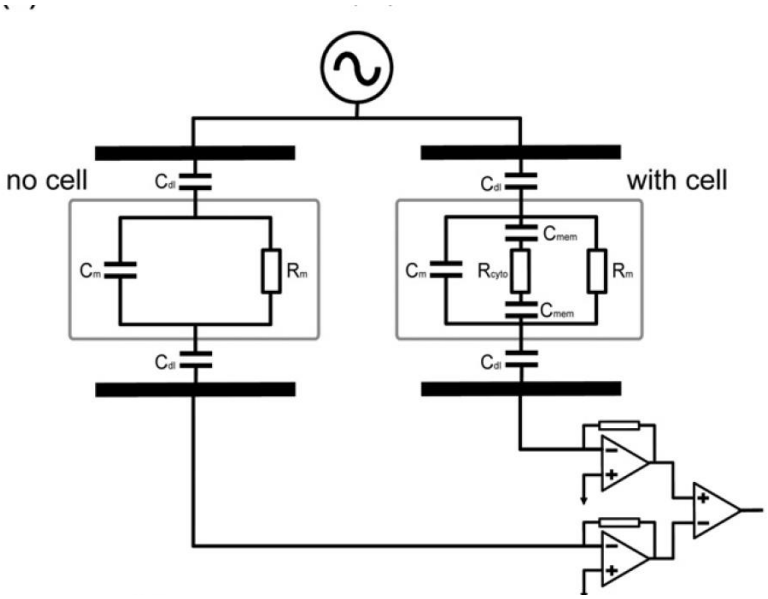

Figure 25 Schéma électrique du système avec et sans cellule. La mesure différentielle permet de s'affranchir de la contribution du milieu. Extrait de [83]

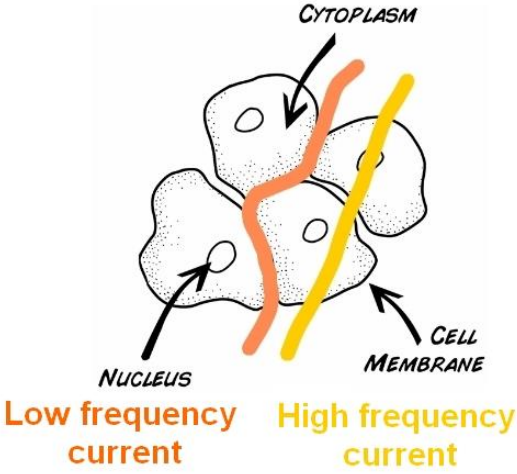

Figure 26 Illustration du passage du courant autour et à travers les cellules en fonction de la fréquence

- Etude d'un tapis cellulaire par impédance

Enfin on va s'intéresser à la mesure des cellules par impédance quand celles-ci forment un tapis en adhérant à la surface d'une électrode. On parle alors de tapis cellulaire et on ne fait alors plus référence aux propriétés des cellules uniques mais du tapis dans son ensemble. C'est cette forme uniquement qu'on étudiera dans le cadre de cette thèse. L'étude d'un tapis cellulaire ne permet pas d'obtenir des informations aussi détaillées que si on mesurait des cellules individuellement. En revanche l'étude d'un tapis cellulaire donne une vision moyenne de l'état des cellules. Ceci permet de tirer des conclusions à une échelle spatiale plus large qui sont potentiellement plus intéressantes en termes de pathologies associées.

Dans [84] le développement d'un tapis de cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine sur une électrode de 250 µm de diamètre est étudié. L'impédance est mesurée à 4 KHz et à 64 KHz. Une capacité est extraite de la mesure à 64 KHz en considérant qu'à cette fréquence la mesure est purement capacitive et représente les membranes cellulaires. La Figure 29 représente les cellules RPE à confluence sur une telle électrode.

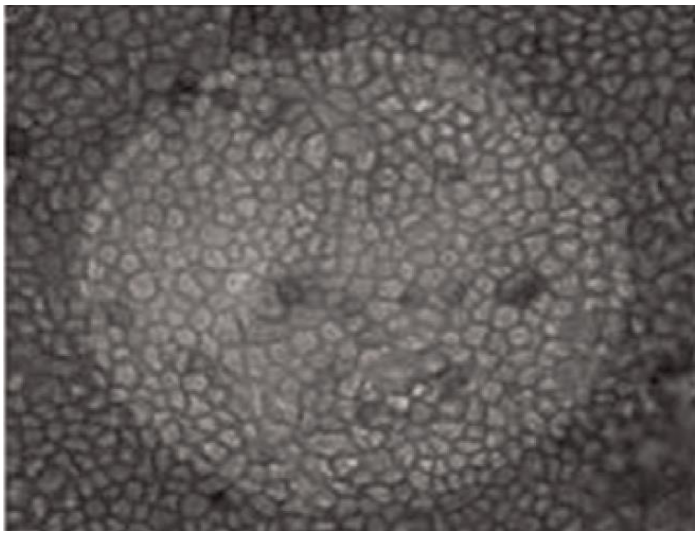

Figure 27 Tapis cellulaires de cellules hiPSC-RPE sur une électrode d'Or de diamètre 250 µm. Extrait de [84].

La mesure à 4 KHz est associée aux jonctions intercellulaires ou aux micromouvements cellulaires si l'échantillonnage temporel de la mesure est assez important.

Ces mesures sont utilisées afin de suivre la croissance du tapis cellulaire et pour étudier la vitesse de recolonisation de la zone couverte par l'électrode après que les cellules s'y trouvant aient été détruites par des impulsions électriques.

Les auteurs se basent sur les travaux réalisés par [85], [86] qui présentaient des mesures de l'impédance à 400 Hz, 4 KHz et 40 KHz pour étudier la croissance de cellules épithéliales MDCK [86], ou encore l'adhésion et les micromouvements de fibroblastes [85].

Dans [87] est présenté un modèle électrique d'un tapis cellulaire. Celui-ci est reporté dans la Figure 28.

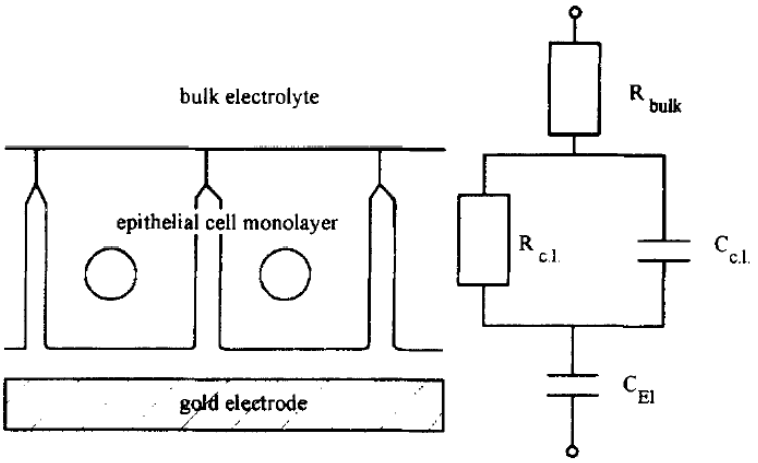

Figure 28 Modèle électrique d'un tapis cellulaire. R_{bulk} correspond à la résistance du milieu extracellulaire, R_{cl} est la résistance transépithéliale, C_{cl} la capacité associée aux membranes cellulaires et C_{el} la capacité associée à l'électrode. Extrait de [87]

Dans ce modèle, les différents éléments du tapis cellulaire sont représentés par des dipôles électriques. En ce qui concerne les membranes cellulaires les auteurs mentionnent la possibilité d'utiliser un élément à constante de phase mais ne le font pas par manque de clarté sur la signification des éléments physiques associés. Différents types cellulaires sont analysés et les paramètres comparés. L'ordre de grandeur des capacités membranaires mesurées est de 1 µF/cm². La résistance transépithéliale varie beaucoup plus puisqu'elle s'étend de quelques dizaines à plusieurs milliers d'Ω.cm² en fonction du type cellulaire. Les cellules qui ne forment pas un tapis homogène sont associées aux résistances les plus faibles. Dans [88] un traitement similaire est réalisé mais seule la résistance transépithéliale (mesurée à 10 Hz) est utilisée pour évaluer la qualité d'un tapis de cellules RPE.

L'introduction d'un élément à constante de phase comme représentation des membranes cellulaires a déjà été présentée dans [89], [90], [91].

Toutefois l'analyse des variations de paramètres de l'élément à constante de phase ne se fait pas en tant que tel, mais à travers l'interprétation d'un paramètre de capacité effective reconstruit, qui est équivalent à ce qui a été présenté à la partie 2.3 et dont on peut notamment retrouver une synthèse dans [64].

Dans cette thèse on va tenter d'interpréter les variations des paramètres Q et α de l'élément à constante de phase durant la croissance cellulaire d'une part. D'autre part des essais de perturbations du tapis cellulaire viendront compléter ceci afin de proposer des hypothèses sur la signification des paramètres Q et α d'un élément à constante de phase, et dans quelle mesure on peut les associer à des éléments particuliers du tapis cellulaire.

2.5. Quelques considérations dans le choix du type d'électrodes vis-à-vis de la mesure effectuée

Dans cette sous-partie on étudiera l'influence de deux paramètres qui caractérisent une électrode : sa géométrie et son matériau de surface. L'influence de ces paramètres sera évaluée par rapport à quatre types de mesures différentes : l'impédancemétrie, le dosage d'espèces chimiques, la mesure électrique de signaux neuronaux et la stimulation électrique de cellules neuronales. Cette sous-partie est donc en quelque sorte une conclusion qui s'appuie sur les sous parties précédentes.

- Nature des électrodes en impédancemétrie

Dans le cas de la mesure d'impédance, on souhaite caractériser les phénomènes de relaxation d'un matériau qu'on considère linéaire autour d'un point de fonctionnement. En ce qui concerne la géométrie de l'électrode, celle-ci doit être adaptée à l'échelle de variation spatiale du matériau qui couvre l'électrode et que l'on souhaite analyser. En effet si les propriétés de celui-ci sont inhomogènes (elles varient spatialement) à une échelle de longueur L et qu'on souhaite caractériser celui-ci globalement, il faut utiliser une électrode dont les dimensions caractéristiques sont bien supérieures à L. Ainsi les variations spatiales des propriétés du

matériau sont intégrées et on obtient de celui-ci une vision globale. La dimension caractéristique L peut être la taille de grain de cristallisation, ou encore la dimension d'une cellule dans un tapis cellulaire par exemple. Si l'électrode a des dimensions caractéristiques plus petites ou égales à L alors on prend le risque d'observer des disparités de mesures entre les expériences qui ne reflètent pas un changement de nature du matériau étudié mais plutôt de la position aléatoire de la zone « d'observation ».

En pratique, vu la limitation de la bande de fréquence d'observation et de l'impédance d'entrée du circuit de mesure, la surface de l'électrode a également une limite basse. En effet comme précisé dans la partie précédente il faut que l'impédance de l'interface électrode-électrolyte à la fréquence considérée ne soit pas trop grande devant celle du matériau étudié pour que ce dernier soit détectable.

Le deuxième paramètre considéré ici et qui caractérise une électrode est la nature de sa surface. Si l'on souhaite que l'électrode réagisse le moins possible avec son environnement on utilisera plutôt un métal tel que le Platine ou l'Or.

Pour réduire l'impédance de l'électrode on peut par ailleurs la recouvrir d'une couche conductrice poreuse et alvéolée (Pt-Black, Gold-Black, PEDOT,...) qui augmente sa surface électrochimique sans changer significativement la surface de l'électrode projetée dans le plan du substrat.

Cependant ceci n'a pas d'effet sur la longueur caractéristique L puisque celle-ci dépend du matériau que l'on souhaite analyser. Par ailleurs ce genre de revêtement, du fait de sa nature peu dense, est fragile. Or la détérioration du revêtement pendant l'expérience peut perturber l'interprétation des mesures. On peut donc penser que ce type de complication pour des mesures dont l'interprétation contient une dimension phénoménologique est à éviter si possible.

- Nature des électrodes pour le dosage d'espèces chimiques

Le dosage d'espèces chimiques par voie électrochimique fait généralement intervenir la mesure du courant à un potentiel particulier, voire une voltamétrie cyclique. On s'intéresse ici à

l'électrode de travail et on suppose que l'électrode de référence et la contre électrode remplissent les conditions qui permettent le déroulement adéquat de la mesure.

Au niveau de l'électrode de travail, et à concentration en espèce recherchée donnée, le courant mesuré est proportionnel à la surface de l'électrode. Une surface importante permet donc la collecte d'un courant plus grand et les contraintes sur la mesure de celui-ci diminuent. Le bruit diminue également. Si les performances du circuit de mesure sont importantes alors la taille de l'électrode peut être réduite pour obtenir une mesure plus locale de la concentration de l'espèce chimique recherchée.

En ce qui concerne le matériau d'électrode, il faut que le potentiel redox auquel celui-ci est oxydé en l'un de ses ions soit le plus élevé possible. Des métaux nobles sont donc utilisés. Par ailleurs, pour la détection d'espèces comme le glucose, la surface doit être fonctionnalisée par d'autres molécules. Si c'est un ion métallique qui est recherché, celui-ci peut être détecté tant que son potentiel redox est inférieur à celui du matériau d'électrode et à celui du solvant.

- Nature des électrodes pour l'enregistrement de signaux neuronaux (tel que des potentiels de champs locaux)

Dans certaines expériences in vitro ou in vivo on souhaite mesurer l'activité électrique locale d'un réseau de neurones. On peut pour cela cultiver ces derniers sur une surface qui contient des microélectrodes ou implanter des microélectrodes. Le signal mesuré n'est pas un potentiel d'action à proprement parler puisque de cette façon on n'a pas accès au milieu intracellulaire. C'est plutôt une combinaison des potentiels induits dans le milieu extracellulaire par les courants d'ions qui sont à l'origine des potentiels d'action.

On souhaite avoir des électrodes dont la surface est la plus faible possible pour obtenir une information localisée. Cependant dans la bande de fréquence où se situent les signaux biologiques (<10 KHz) l'impédance des microélectrodes peut devenir importante. Par ailleurs l'amplitude de tels signaux est bien plus faible que celles des potentiels d'action, de l'ordre de quelques dizaines à la centaine de microvolts.

Comme l'impédance d'entrée des appareils de mesure a une valeur finie, plus on diminue la surface des électrodes plus la chute de tension au sein de celle-ci augmente, au détriment de celle qui est mesurée au niveau de l'impédance d'entrée. D'autre part l'agitation thermique produit un bruit thermique, blanc, et de valeur en tension proportionnelle à l'inverse de la racine carrée de la capacité. Ainsi quand on réduit la taille de l'électrode on augmente également le plancher du bruit. On ne peut pas réduire celui-ci en moyennant les mesures puisqu'on perdrait alors la mesure en temps réel. Il faut donc augmenter la capacité de l'électrode. Pour cela un revêtement (Pt-Black, Gold-Black, PEDOT,…) peut être utilisé. Il permet de diminuer l'impédance de l'électrode sans augmenter l'empreinte de celle-ci. Mais à la différence de l'impédancemétrie, la dégradation de ce revêtement est moins critique. En effet la dégradation du revêtement augmente l'impédance ce qui diminue l'amplitude des signaux mesurés tout en augmentant le niveau de bruit. Cependant pour ce type d'expériences, l'amplitude est généralement moins importante que l'écart temporel entre les signaux mesurés puisque dans le cas de signaux neuronaux c'est l'écart temporel des signaux qui porte l'information. On peut donc utiliser les électrodes tant que les signaux mesurés sortent du bruit. Ainsi on peut donc utiliser un revêtement, notamment in vitro, dans la mesure où il est possible de le renouveler (par un nouveau dépôt) quand la dégradation de celui-ci rend les signaux non détectables.

- Nature des électrodes pour la stimulation de cellules neuronales

Pour la stimulation, le raisonnement est analogue à celui présenté pour la mesure des signaux. La surface doit être faible pour permettre une stimulation localisée d'une part. D'autre part pour que la stimulation ait lieu il faut que la capacité de l'électrode soit suffisamment importante devant celle des membranes neuronales à charger. Ainsi il est possible de stimuler les neurones en utilisant une excitation en tension assez faible (ou avec une excitation en courant qui ne provoque pas une trop haute élévation de tension) dans le but d'éviter les réactions électrochimiques parasites (relativement à la durée d'implantation). Un revêtement

est donc également très utile ici, particulièrement in vitro ou in vivo en dehors d'implantation à trop long terme.

Le tableau suivant résume les points présentés.

	Surface	Nature du matériau/revêtement
Impédancemétrie	Bien supérieure à la surface caractéristique du matériau à analyser	Métal noble, pas de revêtement fragile.
Dosage	Dépend de la capacité du circuit de mesure à mesurer un courant faible et en présence de bruit.	Métal noble, revêtement qui favorise la détection d'une espèce chimique si nécessaire.
Enregistrement de signaux neuronaux	La plus faible possible tant que les signaux sont visibles en dehors du bruit	Métal noble, revêtement pour diminuer l'impédance d'électrode au minimum (in vitro et in vivo si électrodes remplaçables).
Stimulation de cellules neuronales	De l'ordre de grandeur des structures en regard à stimuler.	Métal noble, revêtement pour augmenter la capacité d'injection de charges (in vitro et in vivo si électrodes remplaçables).

3. Positionnement de la thèse : l'interface entre cellules rétiniennes et électrodes dans le cadre de l'étude de l'épithélium pigmenté de la rétine.

3.1. Pourquoi étudier les tissus de la rétine avec des électrodes ?

Chacune des couches de cellules de la rétine ont des fonctions particulières, ainsi si l'une d'entre elle est endommagée il est probable que des effets négatifs sur la vision en découlent ou en découleront. Pour l'étude in vitro, les cellules qui composent ces couches sont prélevées à partir d'un organisme. Éventuellement un tri est effectué, puis elles sont ensemencées sur une surface afin de se développer à nouveau.

Pour réaliser des mesures, les cellules sont généralement incubées avec des molécules fluorescentes qui vont se fixer au niveau de sites spécifiques. Dans le cas du DAPI, cette molécule se fixe à certaines parties de l'ADN et permet ainsi notamment de localiser les noyaux cellulaires. De nombreux type de marquage permettent également de détecter de nombreuses molécules et protéines. Celles-ci sont exprimées dans les cellules et leur observation peut être une mesure de l'état cellulaire selon un aspect donné.

Par contre un tel marquage perturbe la culture puisque les molécules fluorescentes se lient – parfois via un anticorps spécifique - à leur cible. Par ailleurs un tel marquage étant globalement irréversible, on ne peut pas réaliser de nombreux marquages espacés dans le temps dans le but de mesurer le même phénomène à des instants différents.

Enfin, les cultures sont parfois fixées, ce qui maintient leur morphologie* mais les tue.

De nombreuses cultures supposées identiques sinon très similaires sont donc généralement réalisées en parallèles afin d'effectuer des expériences espacées parmi les cultures par opposition à des expériences espacées dans le temps.

Cette approche par marquage permet également d'obtenir des informations très résolues spatialement puisqu'il est possible de visualiser des structures à une échelle subcellulaire. En revanche le suivi d'une même culture peut devenir délicat et d'autant plus si de multiples expériences doivent être réalisées au court du temps. Enfin ce type de processus implique de

sortir les cultures de l'incubateur et donc de les éloigner un peu plus d'un environnement physiologique.

L'étude des tissus rétiniens cultivés sur des électrodes par spectroscopie d'impédance ne permet pas une étude à l'échelle subcellulaire mais permet en revanche de suivre une même culture au court du temps et de minimiser le temps en dehors de l'incubateur. Ainsi il est plus aisé de réaliser des expériences sur la même culture puisque la mesure ne perturbe pas celle-ci. Par ailleurs ce type d'approche peut s'appliquer au contexte des implants, au sens où l'on peut de cette façon évaluer la survie des cellules vis-à-vis des électrodes sous-jacentes et donc par exemple la biocompatibilité du matériau de cette dernière. En effet dans ce cas l'interface électrode/tissus est très intime, une méthode de suivi utilisant les électrodes est donc pertinente.
Enfin, toujours dans le contexte des implants de stimulation à électrodes, l'interface électrode/tissus peut être critique dans la qualité de la stimulation, l'étude de la nature de celle-ci est donc importante.

3.2. Les cellules utilisées

Dans le cadre de cette thèse, les cellules étudiées proviennent de l'épithélium pigmenté de la rétine (RPE) issues d'une dissection d'œil de porc. Le rôle de cette couche est multiple. On peut citer la barrière sang-rétine, la ré-isomérisation du rétinal, l'absorption de la lumière ainsi que l'approvisionnement en nutriments des photorécepteurs ou le recyclage des débris de ces derniers. Ceci est présenté dans un contexte qui inclut le reste de la rétine et de l'œil dans les parties 1.2, 1.3 et 1.4.
Cette monocouche se développe sur les électrodes jusqu'à confluence. Les cellules sont alors jointives et forment un tapis cellulaire continu comme dans la Figure 29.

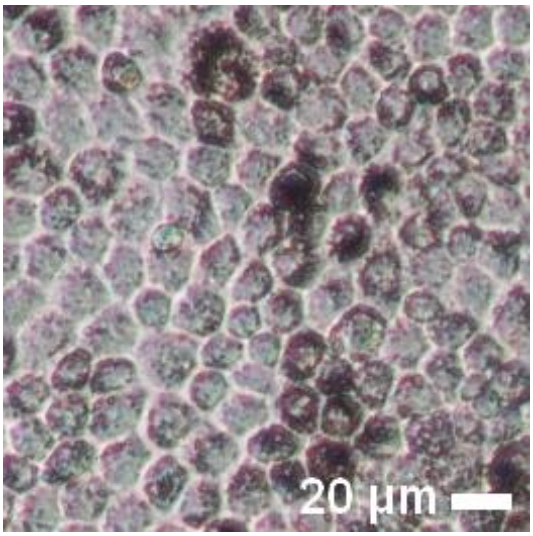

Figure 29 Tapis cellulaires de cellules RPE de porc à confluence.

Dans la partie 2.3 on a présenté le circuit électrique modèle pour une électrode baignant dans un électrolyte en l'absence de réactions chimiques.

La formation du tapis cellulaire sur l'électrode modifie ce modèle puisque les cellules ont une membrane bilipidique isolante. Cette membrane très fine, de l'ordre de quelques nanomètres, a également un effet capacitif. Ceci a été introduit dans la partie 2.4. La présence du tapis cellulaire induit plusieurs temps de relaxation pour les porteurs de charges dans le milieu.

Dans [92], différentes relaxations sont présentées en présence de cellules dans un électrolyte conducteur. La Figure 30 illustre ces différentes relaxations par un spectre. Bien que l'amplitude et la position fréquentielle de ces différentes relaxations puissent varier, – notamment en fonction de la taille de l'électrode et des cas où les cellules sont en suspension ou sous forme de tapis -, elles sont toujours présentées dans le même ordre fréquentiel [93]. La relaxation α, en basses fréquences, est associée au tapis cellulaire (ou amas de cellules) dans son ensemble et aux contre-ions qui existent à la surface de celles-ci, de par le potentiel transmembranaire. La relaxation β pour des fréquences intermédiaires est due à des effets d'interface membranes cellulaires/jonctions cellulaires analogues à l'effet Maxwell-Wagner (effet capacitif à l'interface de milieux inhomogènes). C'est cette relaxation qu'on visualise généralement avec une mesure d'impédance. Enfin la relaxation γ est associée aux relaxations

de molécules, que ce soit des grosses molécules (protéines,...) ou des molécules d'eau pour des fréquences de plusieurs GHz. On ne visualise pas ceci dans nos mesures.

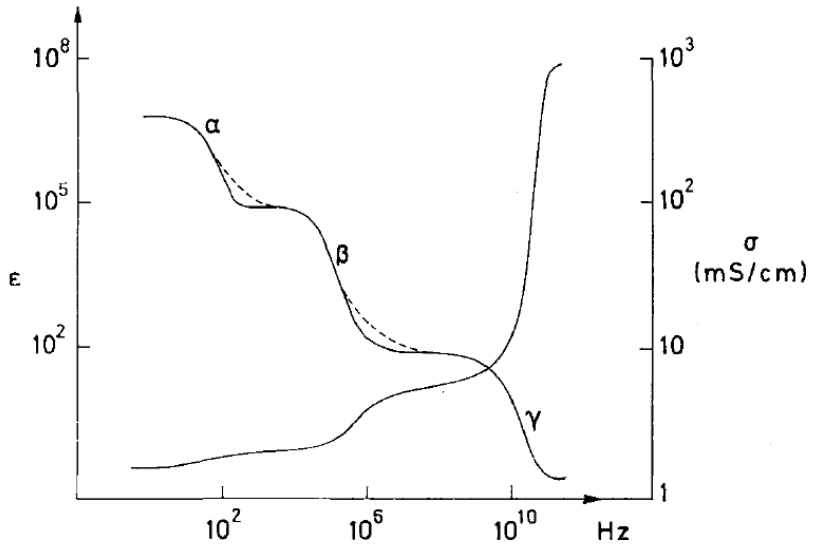

Figure 30 Illustration des phénomènes de relaxation à différentes fréquences pour un milieu composé de cellules musculaires dans un électrolyte aqueux. Extrait de [92].

3.3. Conclusion sur le positionnement de la thèse : Etude de l'impédance des cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine soumise à différente perturbations

Comme présenté dans la partie 2.4 il existe dans la littérature de nombreux exemples d'applications de la mesure d'impédance à l'étude de cultures de cellules, et plus particulièrement de cellules épithéliales ou endothéliales. La mesure de la résistance transépithéliale (*Transepithelial electrical resistance, TEER*) est par exemple une méthode couramment citée dans l'étude des propriétés barrières de ce type de tapis cellulaire. Cependant, cette méthode à fréquence fixe donne une vision générale de ce dernier. En particulier on ne peut pas, avec une mesure à fréquence fixe, distinguer une modification des

jonctions cellulaires d'un décollement de cellules, ni observer des modifications des membranes cellulaires.

Dans cette thèse on veut évaluer la possibilité, en utilisant une mesure à fréquences multiples, de distinguer de telles modifications. Ainsi, tout en conservant une mesure à l'échelle macroscopique du tapis cellulaire, on pourrait obtenir des informations sur des modifications de celui-ci à l'échelle microscopique. Dans le cas d'un tapis cellulaire le modèle utilisé contient généralement un élément qui représente l'effet capacitif introduit par les membranes cellulaires. Cet élément peut être une capacité ou parfois un élément à constante de phase tel qu'introduit auparavant. Cependant dans le dernier cas, un paramètre de capacité reconstruite est le plus souvent présenté et les paramètres de l'élément à constante de phase ne sont pas analysés en tant que tel. Ce choix est fait afin de présenter un paramètre dont l'unité, le Farad, est celle d'une capacité, ce qui facilite l'interprétation « physique » de celui-ci. Nous allons observer de manière plus approfondie les variations des paramètres de l'élément à constante de phase durant la croissance du tapis cellulaire ainsi que quand celui-ci est soumis à des perturbations afin de proposer des hypothèses sur la provenance des variations de ceux-ci.

Pour cela on va réaliser des mesures d'impédance sur la bande de fréquence [1 Hz, 1 MHz]. L'amplitude utilisée, 10 mVrms permet de considérer que le système mesuré est linéaire et de supposer l'absence de réactions électrochimiques qui pourraient modifier l'environnement chimique des cellules. On considère également que le temps de mesure, de quelques minutes, est suffisamment court pour que l'on puisse considérer le système stationnaire. On associe ensuite aux mesures un modèle composé de dipôles électriques qui représentent notamment les différentes structures du tapis cellulaire qu'on souhaite analyser. L'analyse des variations de ces éléments est précisée à l'aide de l'application de perturbations qui mettent en jeu un seul réactif. Enfin on applique au tapis des perturbations moins contrôlées ou qui peuvent mettre en jeu plusieurs facteurs et on utilise la même démarche pour évaluer leur impact sur ce dernier.

Toutes les mesures sont réalisées dans un incubateur qui maintient la température à 37°C et l'atmosphère à 5% de CO_2. Le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) est le milieu de culture utilisé pour toutes les expériences. Il contient notamment du glucose et d'autres

éléments nécessaires aux cellules. Associé à l'atmosphère de l'incubateur, il permet également de maintenir le pH du milieu à des niveaux physiologiques. On lui associe un complément, le sérum de veau fœtal (SVF) à raison de 20%, 10% ou 0%. Celui-ci contient notamment des facteurs de croissance qui stimulent la croissance du tapis cellulaire. Le choix du pourcentage sera détaillé au moment de la présentation des résultats. Une version transparente du DMEM est également utilisée pour les expériences mettant en jeu la lumière bleue.

Dans la suite du manuscrit, nous présenterons dans le Chapitre 2 les matériels et méthodes, dans lequel on décrit les différents éléments nécessaires à la mise en œuvre expérimentale de ces travaux : partie biologique, électronique et logicielle, mécanique, ainsi que la micro-fabrication des électrodes. Dans le Chapitre 3, nous aborderons les modèles électriques associés à la croissance du tapis cellulaire, à travers deux séries de résultats, sur des MEA commerciales d'une part puis sur des dispositifs spécifiquement fabriquées pendant la thèse d'autre part. Enfin, le Chapitre 4 montrera la troisième série de résultats focalisés sur l'étude des variations des paramètres du modèle associé au tapis cellulaire quand celui-ci est soumis à différentes perturbations.

Chapitre 2

Le banc expérimental

Le présent chapitre décrit les éléments mis en place pour la réalisation de mesures de spectroscopie d'impédance sur le tapis cellulaire. On présentera tout d'abord les cellules utilisées et le contexte de la culture cellulaire. Ceci constitue les éléments contraints autour desquels est construite l'expérience. Le banc expérimental est divisé en plusieurs parties qui seront détaillées dans ce chapitre. La partie « électronique » regroupe les éléments de contrôle et de mesure. La mesure s'applique à des dispositifs dédiés qui ont été réalisés en salle blanche qui sont présentés dans la partie « micro-fabrication ». Enfin la partie « mécanique » décrit les éléments de soutient qui permettent la mise en relation des différents éléments du système.

1. Partie biologique

1.1. Procédure de culture de cellules

Les cellules de l'épithélium pigmenté rétinien (Retinal Pigment Epithelium, RPE) sont extraites à partir d'yeux de porc abattus pour la consommation de viande. Après avoir enlevé les muscles et tissus environnants les yeux sont désinfectés. Ils sont ensuite coupés en deux pour séparer le segment antérieur (cornée et cristallin) de la partie postérieure (eyecup). Le vitré ainsi que la rétine sont enlevés et une solution contenant de la trypsine 0.25% est ajoutée dans l'eyecup. Cette solution enzymatique agit à 37°C et permet de détacher les cellules d'EPR de l'œil. Après 1h d'incubation, les cellules sont détachées de la choroïde par aspiration et la solution obtenue est centrifugée pour récupérer les cellules sous forme d'une suspension dans un volume donné. Après comptage, la suspension cellulaire est diluée pour obtenir la concentration de cellules adéquate dans le milieu de culture.

1.2. Environnement de culture

Pour que la culture se développe sans contamination, les dispositifs sont au préalable stérilisés. Ceci est réalisé par un cycle d'autoclave (121 °C pendant 15 min à une pression de 1.3 bar avec montée et descente en température/pression avant et après pendant environ 1h)

Une fois ensemencées sur la surface de culture, le tout est placé dans un incubateur ou l'environnement est adapté à leur développement.

L'incubateur est une enceinte régulée à 37°C. Par ailleurs le milieu de culture (DMEM) utilisé, nécessite une atmosphère contenant 5 % de CO_2. A titre de comparaison la teneur en CO_2 dans l'air est d'environ 0,04 % actuellement.

Le CO_2 réagit avec l'eau du milieu pour former de l'acide carbonique qui, se dissociant dans l'eau forme des ions H^+ et HCO_3^-. Ces derniers s'ajoutent à ceux déjà présents dans le milieu de culture (provenant du tampon NaHCO3). Le pH s'équilibre finalement autour de 7.

$$CO_2 + H_2O = H_2CO_3$$
$$H_2CO_3 = H^+ + HCO_3^-$$

L'humidité relative est maintenue à 95 % pour limiter l'évaporation du milieu de culture. Ainsi tous les objets placés à l'intérieur de l'incubateur sont couverts d'un film d'eau plus acide qu'elle ne le serait si on se trouvait dans l'air. Ceci, associé à la température relativement élevée favorise les réactions de corrosions. C'est particulièrement problématique pour le cuivre dont sont fait les fils électriques du système et les pistes de PCB. Les soudures et connexions doivent donc être isolées de l'atmosphère de l'incubateur si l'on veut conserver une certaine longévité du système.

2. Présentation des besoins

2.1. Automatisation et synchronisation des éléments du système

L'objet étudié dans cette thèse est constitué de cellules vivantes. Ainsi le système est constamment en évolution. Si l'on veut suivre le développement du tapis cellulaire par spectroscopie d'impédance il faut donc pouvoir effectuer des mesures jour et nuit à intervalle régulier. Par contre la nature de la mesure effectuée reste dans un contexte bien défini. Ainsi la conception d'un banc de mesure automatisé est possible et simplifie grandement les expériences.

Au-delà de la capacité à effectuer des mesures d'impédance, on veut pouvoir observer la variation de celle-ci quand le tapis cellulaire est soumis à différentes perturbations. Il faut donc, dans une certaine mesure, pouvoir synchroniser les perturbations et les mesures de manière reproductible.

Les éléments qui permettent ces deux points, à savoir la carte Rapsberry Pi et l'ordinateur de contrôle sont décrits dans la partie 3.

2.2. Réduction des manipulations

L'automatisation présente également d'autres avantages. En effet des mesures manuellement répétées augmente le risque de dommages aux surfaces de contacts et les risques de fissures du substrat en verre sur lequel sont déposés les électrodes.

Par ailleurs chaque manipulation ajoute un risque de contamination de la culture qui doit alors être arretée. Une image d'une MEA commerciale contaminée à un stade avancé (quelques jours après la contamination par un champignon) est présentée dans la Figure 31.

Une image au microscope d'une contamination bactérienne (mais sans autres cellules) est présentée dans la Figure 32.

Ce type de contaminant est initialement présent dans l'air ou sur des surfaces non stériles et se développent si mises dans un environnement favorable tel que celui du milieu de culture dans un incubateur à 37°C.

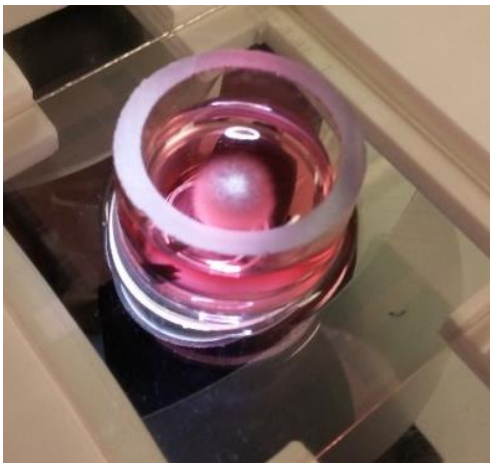

Figure 31 Photographie d'une MEA commerciale contaminée. Le diamètre du puits central est d'environ 2 cm.

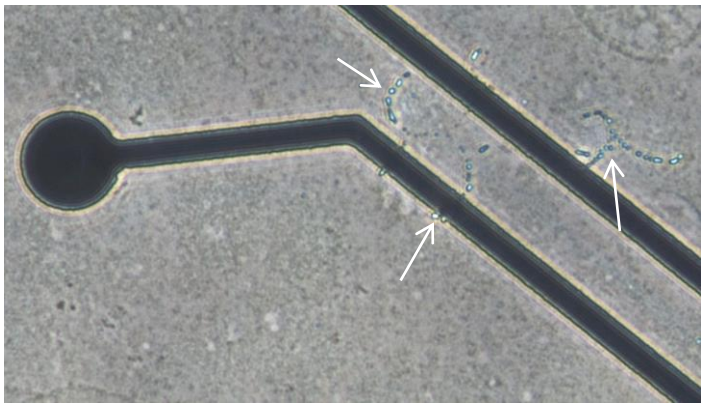

Figure 32 Image au microscope d'une MEA commerciale contaminée par des bactéries (flèches). Les électrodes ont un diamètre de 30 µm.

2.3. Vue globale du système

Dans cette sous partie on présente une vue globale de l'organisation des éléments du système qui est développé pour répondre aux besoins présentés précédemment. Ils seront détaillés dans les parties suivantes.

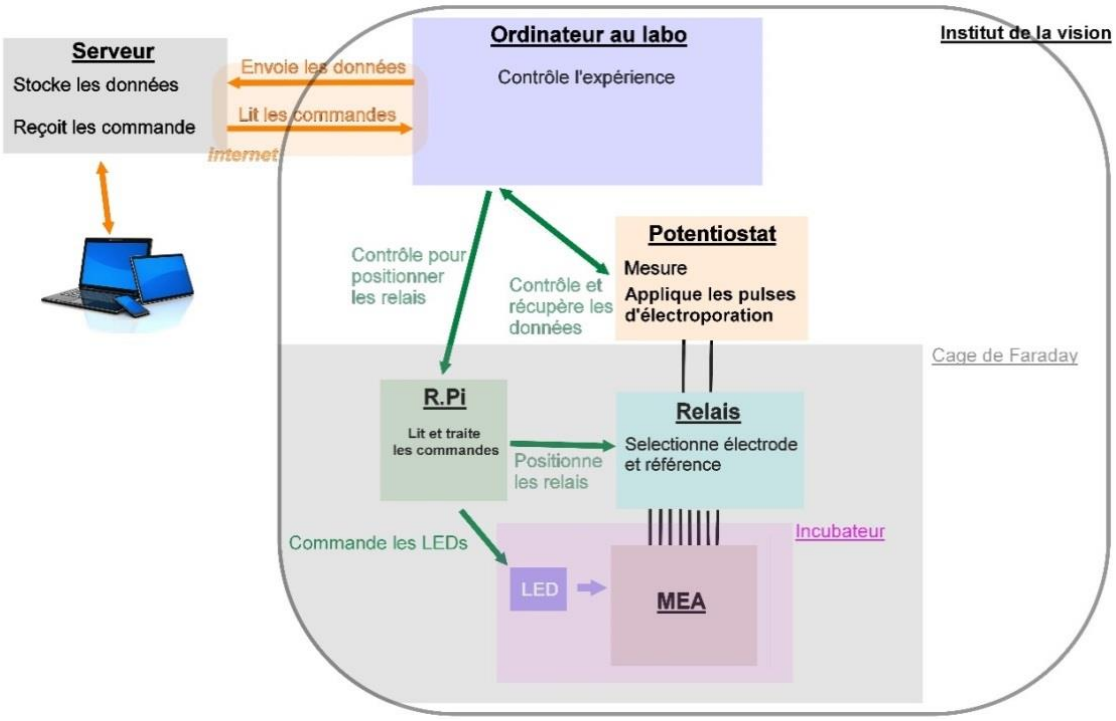

Figure 33 Schéma représentant les différents éléments du banc d'expérimentation

Le banc contient les éléments suivants. Ils sont représentés dans la Figure 33.

- Le potentiostat (3) qui réalise les mesures d'impédance. Le potentiostat peut également réaliser d'autres mesures telles que la mesure du courant pendant l'application de pulses de tension. Il est contrôlé par un logiciel propriétaire lui-même contrôlé par un code Python par l'intermédiaire de fichiers de configuration.
- L'ordinateur du labo (4) sur lequel est exécuté le logiciel d'utilisation du potentiostat, ainsi que les codes de contrôle Python.
- Le serveur, qui stocke les données mesurées et transmet les commandes et les modifications de paramètres de configuration à l'ordinateur du labo.

- La carte Raspberry Pi (dans 2) joue ici simplement le rôle de carte d'interface entre les éléments de l'expérience et l'ordinateur du labo que ce dernier ne peut pas commander directement.
- Les 16 relais (dans 2) permettent de connecter 4 électrodes de référence et 12 électrodes de travail au potentiostat de façon modulaire.
- La MEA (dans 1) ainsi que son support (qui contient également les LEDs) sont placés dans l'incubateur (1). Ces derniers éléments sont entourés d'une cage de Faraday qui permet d'isoler les mesures du bruit extérieur.

Figure 34 Incubateur (1) Cage de Faraday avec relais et Raspberry Pi (2) Potentiostat (3)

Figure 35 Potentiostat (3) et ordinateur du labo sorti ou rangé (flèche) (4)

3. Réalisation de la partie électronique et logicielle

3.1. La carte de contrôle Raspberry Pi

Figure 36 Une Raspberry Pi 2 modèle B telle que celle utilisée.

La carte Raspberry Pi fait partie de la catégorie des « nano-ordinateurs » (par analogie avec les micro-ordinateurs). En effet une telle carte contient un système d'exploitation Linux dérivé de Debian, Raspbian. La raison de son utilisation ici est tout d'abord la présence de connexions entrée/sortie ou GPIO (General Purpose Input/Output). Celle-ci, quand elles sont configurées en sortie, délivrent une tension numérique d'amplitude 0 V ou 3.3 V. La carte est quant à elle alimentée en 5V. Les GPIO sont utilisés pour contrôler des circuits par des niveaux logiques haut ou bas ce qui sera notre cas ici. La Raspberry Pi ne possède en revanche pas d'entrée/sortie analogique et ne permet donc pas de générer des signaux arbitraires de manière

directe, ni de lire des valeurs autres que binaires en entrée. Ceci empêche notamment d'utiliser la carte en tant que potentiostat de manière directe et fiable.

L'utilisation qui est faite de la Raspberry Pi dans cette thèse est très réduite vis-à-vis des capacités de la carte. On pourrait envisager d'utiliser le port parallèle, ou port LPT (via un adaptateur USB) en lieu et place de la carte pour générer des sorties numériques directement via l'ordinateur du labo.

Cependant la Raspberry Pi présente l'avantage (outre le fait de fournir plus de sorties qu'un port LPT qui ne contient que 8 bit de données) de fournir une grande modularité au banc d'expérimentation (adjonction de capteurs auxiliaires, au premier rang desquels une caméra par un port dédié) ainsi qu'une communauté d'utilisateurs très active et expérimentée.

Les GPIO sont contrôlées par un code Python lancé automatiquement au démarrage de la carte. Ce code agit en fonction de commandes envoyées par l'ordinateur en utilisant le protocole SSH qui est également le protocole utilisé pour accéder au terminal Linux durant la phase de programmation de la carte.

Les commandes sont très simples (mettre en place des relais, allumer une LED) et n'ont pas une contrainte drastique quant à la rapidité d'exécution. En effet la synchronisation « fine » peut se faire, si besoin, au niveau du code Python sur la Raspberry Pi.

La structure d'envoi et de réception des commandes est la suivante, elle est schématisée dans la Figure 37.

Quand il est nécessaire d'envoyer la commande « X » (par exemple « fermer le relais numéro 8 » ou « faire clignoter les LEDs à une fréquence de 4 Hz avec un rapport cyclique de 25 % ») alors le code Python sur l'ordinateur du labo exécute une commande SCP qui permet de copier un fichier « X.txt » depuis l'ordinateur du labo vers un dossier spécifique sur la carte Raspberry Pi. Ce fichier est vide si c'est une commande binaire (par exemple « fermer le relais numéro 8 ») ou contient les paramètres nécessaires à l'exécution de la commande par la carte (par exemple les paramètres 4 Hz et 25 % dans la commande « faire clignoter les LEDs à une fréquence de 4 Hz avec un rapport cyclique de 25 % »).

Du côté de la Raspberry Pi le code Python observe en permanence le dossier de réception et exécute la commande après avoir supprimé le fichier quand l'un d'eux est détecté.

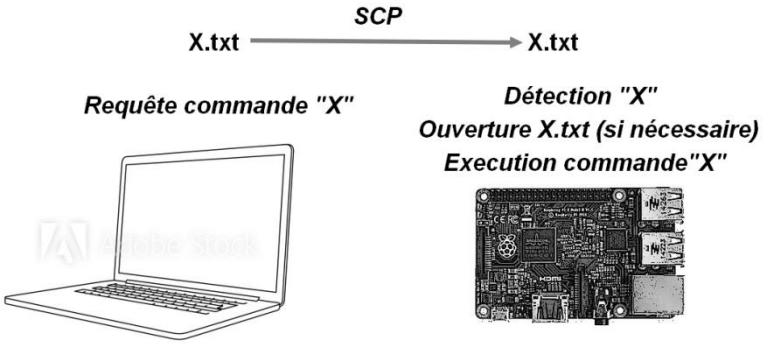

Figure 37 Schématisation du protocole employé pour faire exécuter une commande par la Raspberry Pi

3.2. Le potentiostat et son circuit de multiplexage

- Le potentiostat

Le potentiostat réalise l'ensemble des mesures effectuées par le banc d'expérimentation. Celui-ci possède 5 fils dont 3 nous sont utiles. Ils doivent être connectés à l'électrode de travail, à l'électrode de référence et à la contre-électrode. La mesure se fait avec une amplitude de 10 mVrms sur une bande de fréquence [1 Hz, 1 MHz] (10 points/décade). Comme indiqué dans le Chapitre 1 la mesure d'impédance à 3 électrodes introduit une ambiguïté sur le dipôle mesuré. On pourrait bien sûr utiliser ce type de configuration pour limiter l'impact de la résistance de l'électrolyte sur le spectre mesuré. Cependant ceci implique d'ajouter une électrode de référence (type Ag/AgCL) dans le bain où se trouvent les cellules ce qui a plusieurs inconvénients :

- L'électrode de référence peut se dégrader, on doit donc faire en sorte que celle-ci soit amovible, ce qui complexifie le système
- Pour chaque cellule électrochimique on a besoin d'une électrode de référence ce qui augmente d'autant le nombre de relais nécessaires (l'utilisation des relais dans le banc d'expérimentation sera décrite plus loin dans cette partie).

- L'électrode de référence se situerait vraisemblablement au-dessus de la culture. Elle bloquerait donc le passage de la lumière durant les observations au microscope.
- Enfin on sera nécessairement amené à retirer puis à remettre cette électrode dans l'électrolyte durant la culture (pour l'observation au microscope, pour la mise en place dans le support, pour le changement de milieu de culture,…). Ces retraits successifs augmentent grandement le risque de contamination de la culture.

L'utilisation d'une électrode de référence serait à prendre en compte si l'on était en présence de réactions électrochimiques au niveau de l'électrode de travail, et qu'on veuille distinguer celles-ci de celles au niveau de la contre électrode. Or dans notre cas, la tension appliquée aura une amplitude de 10 mVrms sur une bande en fréquence de [1 Hz , 1 MHz] avec un biais en tension presque toujours nul. On négligera donc les réactions électrochimiques.
En résumé les inconvénients de l'utilisation d'une électrode de référence sont donc prépondérants devant les avantages produits car on peut inclure la résistance de l'électrolyte dans les modèles des mesures. C'est pourquoi nous n'en n'avons pas utilisé.
Ainsi on relie, au niveau du potentiostat, les connexions de l'électrode de référence et de la contre-électrode.
Dans toute la suite nous ferons référence au groupe électrode de référence et contre-électrode sous le terme d'électrode de référence.

Le potentiostat utilisé est un ZIVE SP1 de Wonatech.
Il possède une impédance d'entrée résistive de $2.10^{13}\ \Omega$ en parallèle avec une capacité de $4.5\ \mathrm{pF}$ d'après la documentation du constructeur. Ceci correspond sans doute à une entrée de type grille de transistor à effet de champ (MOSFET, JFET,…). Pour une charge purement résistive, on peut donc considérer que le potentiostat ne va pas perturber la mesure. En revanche pour une charge fortement capacitive comme c'est le cas pour une (micro)électrode non polarisée, la capacité d'entrée du potentiostat est faible mais non négligeable. Si on prend comme seuil que l'impédance de la charge doit être 10 fois plus faible que l'impédance d'entrée, on obtient, pour une charge purement capacitive, une capacité minimale de 45 pF. En utilisant

la relation suivante, ou e représente l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la couche de molécules d'eau directement influencées par l'électrode et ε_r la permittivité relative de l'eau dans des conditions standard et en négligeant la résistance de l'électrolyte on obtient que la plus petite électrode disque qui vérifie cette condition a un diamètre de 9.08 µm.

$$C = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 S}{e};\ e = 1\,nm, \qquad \varepsilon_r = 78.5, \qquad \varepsilon_0 = 8.85.10^{-12}, \qquad S = \pi r^2$$

En pratique cependant le reste du banc expérimental introduit une capacité parasite qui s'ajoutant à la capacité d'entrée du potentiostat produit une capacité globale de l'ordre de 22 pF. Afin de respecter le critère précédent on a alors une électrode de diamètre minimum 20.08 µm. Par ailleurs les lignes de connexions entre le potentiostat et les électrodes une longueur de 1 m. On peut les visualiser dans la Figure 34 sur la droite de l'incubateur. Elles introduisent une inductance parasite de l'ordre de 10 µH en fonction de la ligne.

- Le circuit de multiplexage

Le potentiostat utilisé ne possède qu'un seul canal. Ainsi il faut mesurer les électrodes unes par unes et ajouter un circuit de multiplexage entre le dispositif et le potentiostat.
Afin de réaliser le multiplexage on pourrait utiliser un multiplexeur analogique en circuit intégré du type CD4051B. Cette approche n'a pas été retenue car elle présente différents inconvénients. Nous n'avons pas estimé en pratique la capacité de tels composants à réaliser la fonction de multiplexage désirée. Cependant une analyse de la documentation technique suggère qu'ils ne sont pas destinés à être utilisés pour des applications de mesure d'impédance sur la bande de fréquence [1 Hz, 1 MHz] avec les valeurs de charges rencontrées. La résistance ajoutée en série est de l'ordre de $100\ \Omega$ ce qui n'est pas négligeable. Quant aux caractéristiques fréquentielles elles sont à la limite de l'acceptable puisque les fréquences de coupures apparaissent autour de 10 MHz. De plus, de telles caractérisation fréquentielle sont évaluées avec une charge de $1\ k\Omega$. Celles-ci sont donc susceptibles de se dégrader en présence de charges plus importantes.

L'utilisation de tels circuits, si l'utilisation de relais était impossible, demanderait une caractérisation approfondie du circuit de mesure et une analyse plus complexe des résultats. Ceci serait envisageable pour une application bien déterminée. Dans le cadre de cette thèse on a préféré l'utilisation de relais qui, malgré leur nombre limité et l'encombrement associé, permettent une plus grande flexibilité dans les mesures.

On utilise donc une carte de 16 relais commandés par 16 signaux numérique produits par la Raspberry Pi. Cependant le niveau logique haut de la cette dernière est associé à une tension de 3.3 V. C'est une tension trop faible pour activer le circuit des relais qui nécessitent une tension plus proche de 5 V. Des circuits intégrés « translateurs de niveau » sont donc utilisés entre la Raspberry Pi et la carte des relais afin de produire des signaux dans la plage 0 à 5 V.

- Etude du bruit du système

On peut évaluer le bruit sur la mesure en mesurant l'impédance de nombreuses fois sur le système complet qu'on considère stationnaire. Le bruit sur le module de l'impédance est issu du bruit sur la mesure de la tension et du courant. Pour ceci on a considéré que 50 essais étaient suffisants. On réalise les mesures sur un puits contenant du milieu de culture qu'on a laissé stabiliser environ 10 h dans l'incubateur. La série de 50 mesures d'impédance est ensuite conduite avec les mêmes caractéristiques que celles effectuées pour une culture de cellule (10 mVrms / [1 Hz, 1 MHz]). Cependant on ne mesure que 5 points/décade pour que l'ensemble des mesures aient lieu dans un temps raisonnable, vis-à-vis, par exemple du temps d'évaporation du milieu. L'ensemble des mesures est réalisé en 72 min.
La Figure 38 montre l'ensemble des mesures superposées. On a mesuré la macroélectrode disque de la seconde série de dispositifs fabriqués en salle blanche et présentés dans la partie 4.

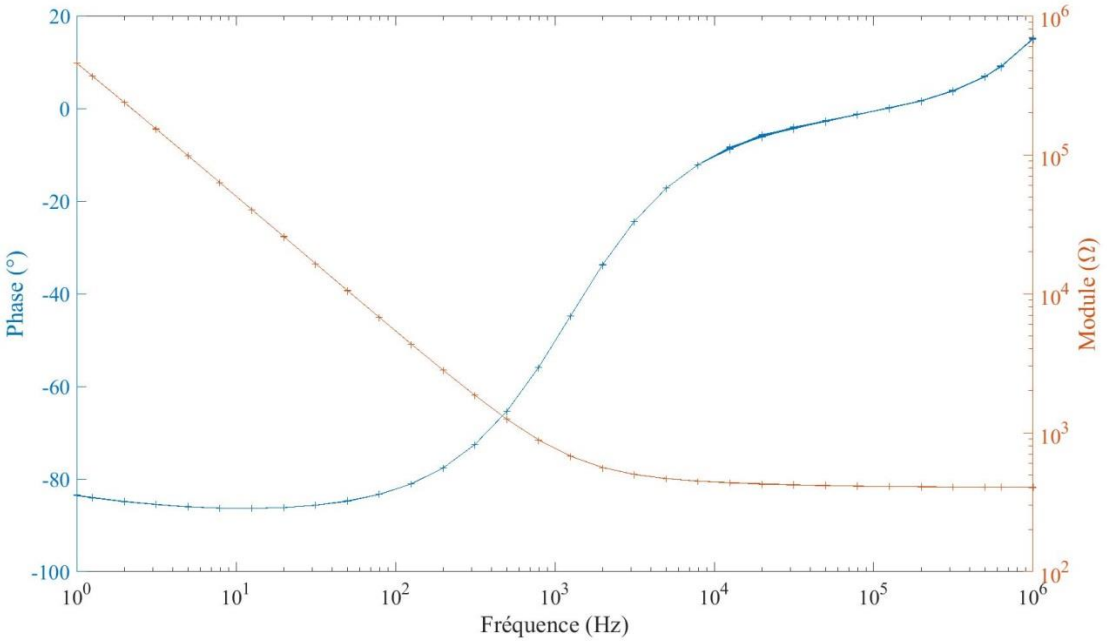

Figure 38 Les 50 mesures effectuées pour la caractérisation du bruit du système

Afin d'analyser ceci on va chercher pour chaque fréquence mesurée l'écart-type du module et de la phase dans la série de mesures. Ceci est présenté dans les Figure 39 et Figure 40. Sur la courbe relative au module dans la Figure 39 on observe une décroissance linéaire de l'écart type avec la fréquence qu'on peut interpréter comme la décroissance du bruit en $1/f^x$. Le point singulier à 50 Hz correspond au signal issu de l'alimentation qui ajoute du bruit à cette fréquence. Quant au point à 500 Hz il en est probablement une harmonique. De 10 à 100 KHz on observe un sursaut du bruit. Cette bande de fréquence est particulièrement occupée par les systèmes à découpages qui peuvent se trouver dans les différents équipements au voisinage du banc de mesure ou dans le potentiostat. Globalement le bruit reste très faible comme on peut le remarquer dans la Figure 40 puisqu'en ce qui concerne le module il reste toujours inférieur à 1 % voire 0.1 % de la valeur mesurée. La normalisation sur la phase introduit des valeurs de pourcentages importants quand celle-ci se rapproche de 0°. Toutefois le bruit sur la phase est toujours inférieur à 0.1°.

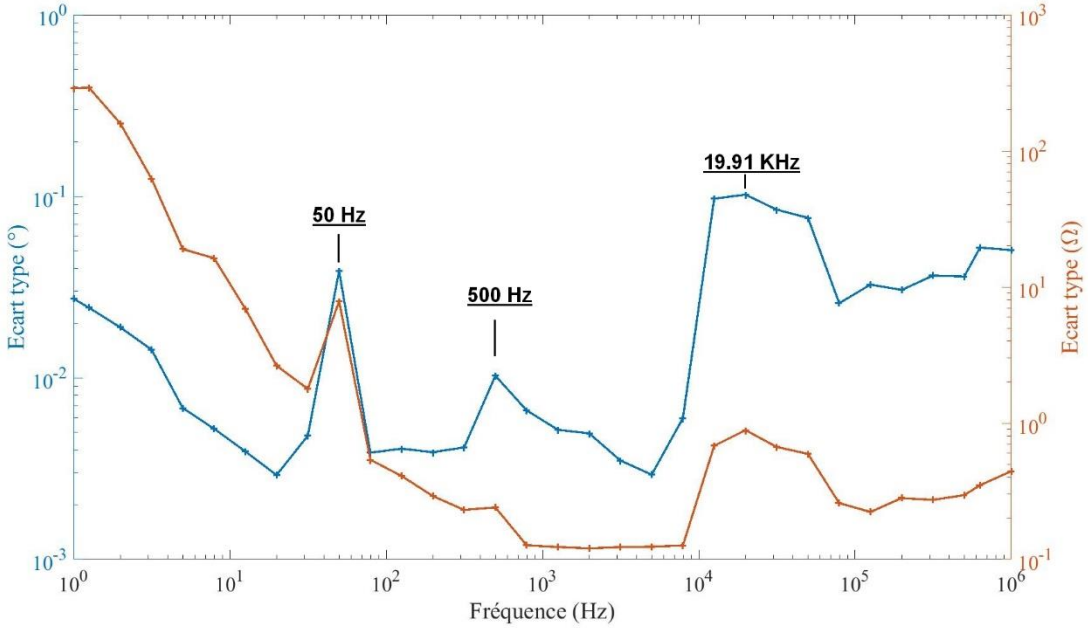

Figure 39 Ecart-type sur la phase (bleu) et sur le module (rouge) en fonction de la fréquence pour la série de 50 mesures

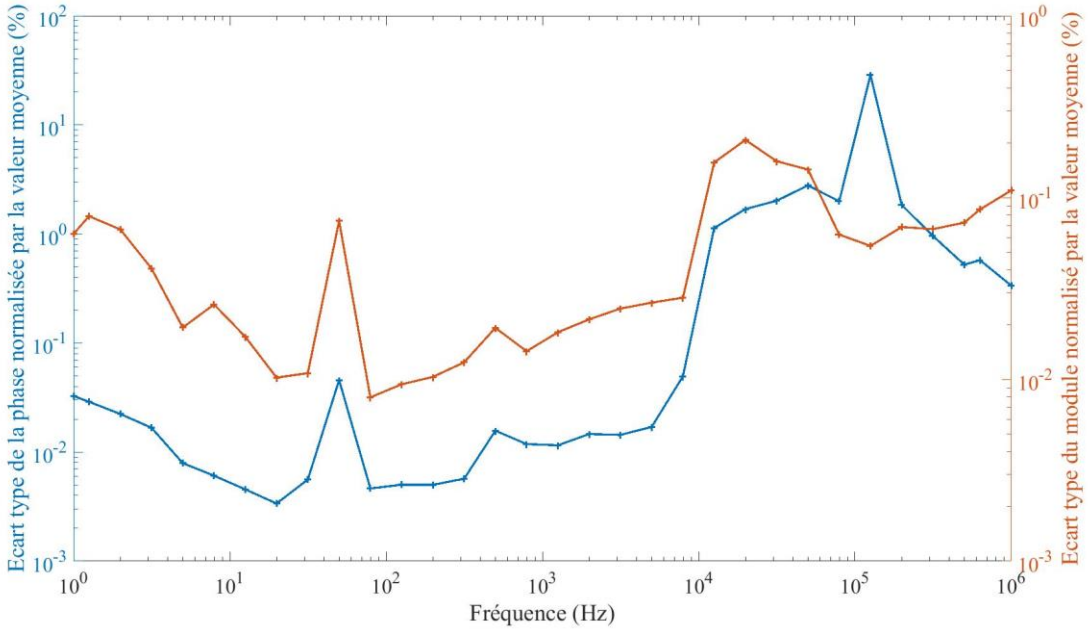

Figure 40 Ecart-type rapportés à la valeur moyenne mesurée pour la phase (bleu) et le module (rouge)

L'évaluation du bruit est généralement utilisée pour pouvoir placer les barres d'erreurs sur les mesures obtenues. En observant la Figure 38 on peut raisonnablement penser que les barres

d'erreurs seront extrêmement faibles. Dans la suite de cette thèse elles ne seront donc pas représentées afin de ne pas alourdir les représentations graphiques.

3.3. Le système d'éclairage LED

Le système LED a pour but d'éclairer les cultures avec une lumière bleue. Celle-ci a des effets toxiques en présence d'un chromophore de la lipofuscine, le N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) [94], [95]. On souhaite observer cet effet sur l'impédance du tapis cellulaire. Pour cela on va choisir la longueur d'onde pour laquelle la toxicité est maximale. C'est le cas des longueurs d'onde de 420 à 450 nm [96]. Par ailleurs l'irradiance nécessaire est très importante, de l'ordre de 0.5-1mW/cm².

Ces contraintes réduisent le nombre de composants qui sont susceptibles d'être sélectionnés.

Le composant retenu est la LED ProLight PK2N-3LLE-L. A cause de l'encombrement du dispositif et du support, les LEDs sont placées à une distance relativement importante du plan de culture, 72 mm. Un diaphragme imprimé en 3D est donc intercalé entre les LED et la culture pour s'assurer de la zone ciblée comme montré dans la Figure 41. Comme le choix des LEDs a été contraint, des LEDs peu focalisées sont utilisées. En effet d'après la documentation technique la largeur à mi-hauteur du cône d'éclairement est de +-65°. Une faible proportion de la lumière émise frappe donc effectivement la culture, qui représente les +-0.5° centraux. Ce choix loin d'être idéal est justifié par la nécessité d'utiliser des LEDs avec une longueur d'onde particulière, le nombre restreint de fournisseurs, et le fait qu'elles sont assez peu répandues puisqu'elles ne s'utilisent pas dans des applications d'éclairage. Les 4 LEDs sont soudées en séries sur un PCB. Elles font face aux 4 quartiers du dispositif que nous détailleront plus loin. Le montage en série permet qu'elles soient traversées par le même courant, qui est à l'origine du flux lumineux. La puissance mesurée dans le plan de la culture est de 0.6 mW/cm². La distribution des longueurs d'onde émises a un pic centré à 430 nm avec une largeur à mi-hauteur de [415nm-445nm]. Entre les lignes, le reste du PCB est également couvert de cuivre qui est connecté au contact thermique des LEDs. Ceci permet de dissiper la chaleur produite par les LEDs. Pour résister à l'environnement corrosif de l'incubateur, une couche micrométrique de parylène est déposée sur le PCB. Cette couche s'étant révélée insuffisante

pour protéger le PCB, une fine couche de PDMS (moins de 0.5 mm d'épaisseur) a été ajoutée ensuite.

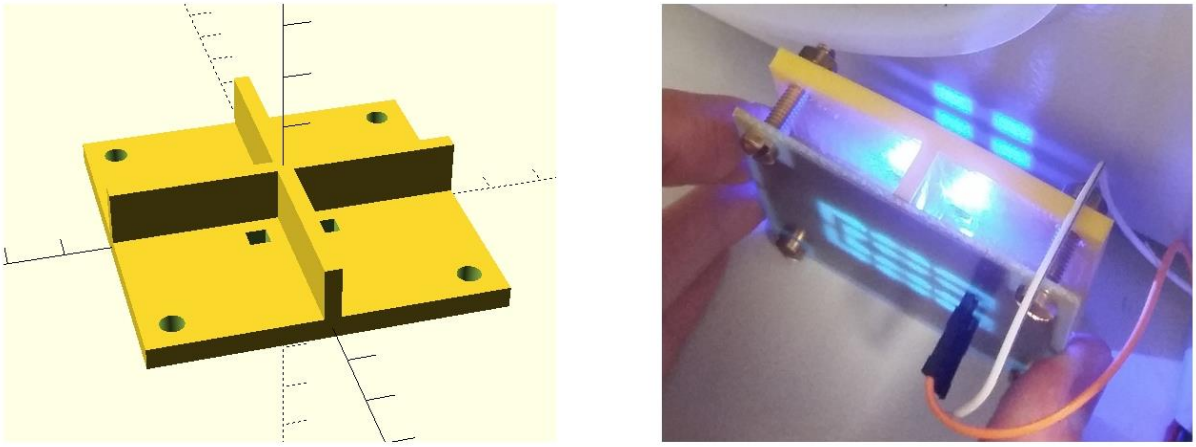

Figure 41 Dessin 3D du diaphragme et système LED-diaphragme en fonctionnement

L'incertitude sur la hauteur de placement des LEDs est estimée à 1 mm car un système vis-écrous est utilisé. En effet des écrous sont placés sur des vis pour servir de support au diaphragme et aux LEDs au-dessus de la culture. Le pas de vis normalisé pour les vis M4 utilisées est de 0.7 mm. C'est-à-dire qu'un tour d'écrous le déplace sur la vis de 0.7 mm. Ceci cumulé avec d'autres imprécisions éventuelles permet de donner la valeur raisonnable de 1 mm. En fonctionnement les 4 LEDs utilisent 12 V et 250 mA. Le circuit de contrôle utilise un transistor MOSFET en série avec les LEDs et est aussi connecté à l'un des pins GPIO de la Raspberry Pi qui génère un signal en modulation de largeur d'impulsion (PWM en anglais) qu'on peut configurer. Ceci permet de moduler la puissance des LEDs et d'être interfacé avec le reste de l'expérience.

4. Micro-fabrication des dispositifs

4.1. Choix des designs

Les mesures préliminaires sont faites sur des matrices d'électrodes commerciales (Multi Channel System) et seront détaillées dans le Chapitre 3. Une photo de celles-ci est montrée à la Figure 42.

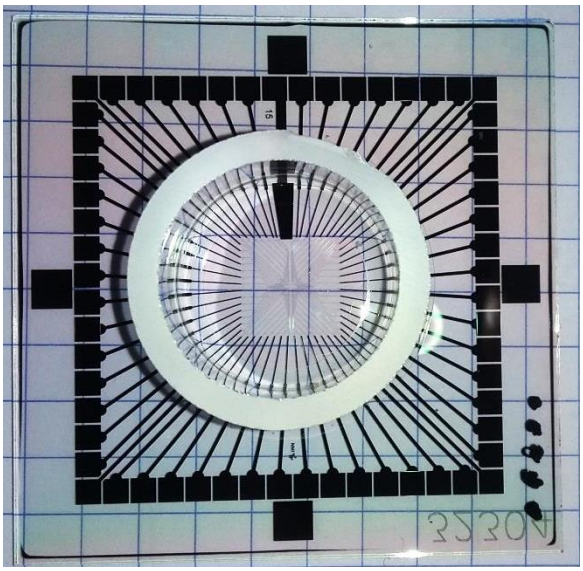

Figure 42 Une MEA commerciale de MCS utilisée pour les tests préliminaires

Cependant un seul dispositif peut être mesuré en même temps. Dans nos expériences on peut souhaiter réaliser plusieurs fois la même expérience en parallèle ou encore mesurer un témoin. Pour cette raison il a été choisi de réaliser un dispositif qui contient 4 quartiers identiques et séparés. Ceci permet d'obtenir de la répétabilité dans les expériences. Dans chaque quartier on place deux types d'électrodes divisées en deux groupes. Un groupe de macroélectrodes et un groupe de microélectrodes qu'on peut facilement distinguer sur la Figure 45 ou Figure 46 via la taille de l'électrode de référence associée. En effet pour s'assurer que la mesure d'impédance ait lieu principalement au niveau de l'électrode voulue et non de l'électrode de référence, la surface de cette dernière est dictée par celle de la plus grosse électrode. Pour chaque groupe on s'assure que la surface de l'électrode de référence soit au moins dix fois plus grande que celle de la plus grosse électrode.

En revanche, le nombre limité de relais ne permet d'accéder qu'à 16 canaux. Ainsi avec une électrode de référence connectée par quartier (un par groupe d'électrodes), il reste 3 électrodes accessibles pour un quartier donc 12 au total.

La première série de matrice possède des macroélectrodes dont le rapport de surface est fixé. Nous détaillerons l'utilisation de ceci dans la partie 4.3 de ce chapitre. La seconde série de dispositif possède des macroélectrodes sous forme de peignes et de disques. Les peignes sont utilisés pour des essais d'électroporation et seront détaillés dans le chapitre suivant. L'électrode disque a une surface identique à celle du plus grand peigne. La couche de passivation est également modifiée pour améliorer son adhésion. Pour chacune des séries la partie microélectrodes reste inchangée (hormis au niveau de la passivation). Pour limiter les capacités parasites les lignes (d'une largeur de 20 µm) qui traversent la plus grosse électrode de référence le font avec une séparation de 50 µm de part et d'autre de la ligne.

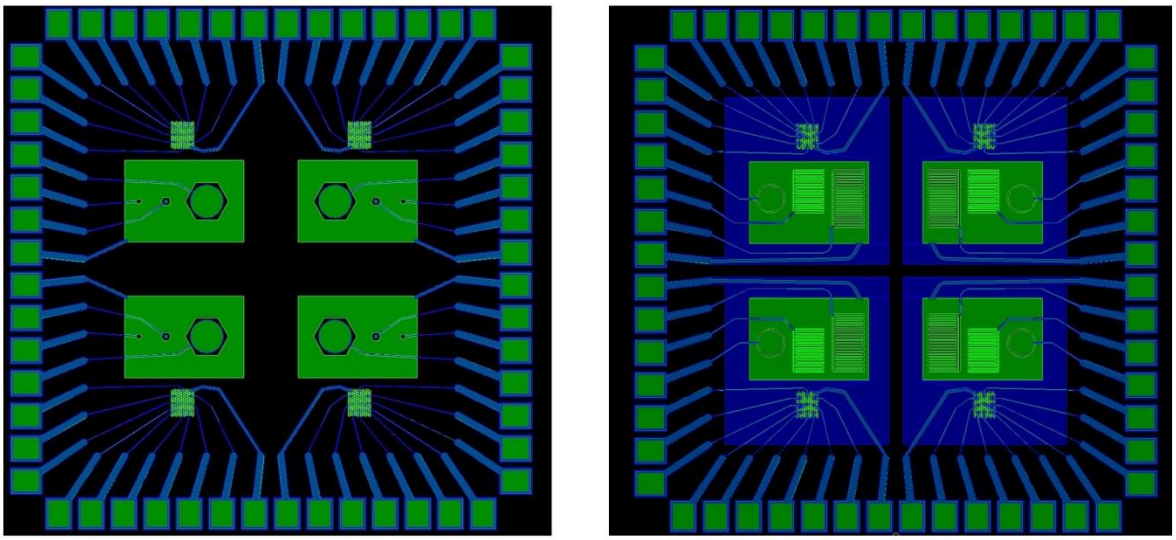

Figure 43 Vue globale des deux séries de matrice réalisées. Gauche) Première version. Droite) Seconde version. La couche verte représente le métal alors que la couche bleue représente la passivation.

Les figures Figure 45 et Figure 46 montrent des photos des quartiers pour les deux séries de matrices dont la réalisation suit un processus identique détaillé dans les sous partie suivantes. La Figure 44 montre le détail des microélectrodes.

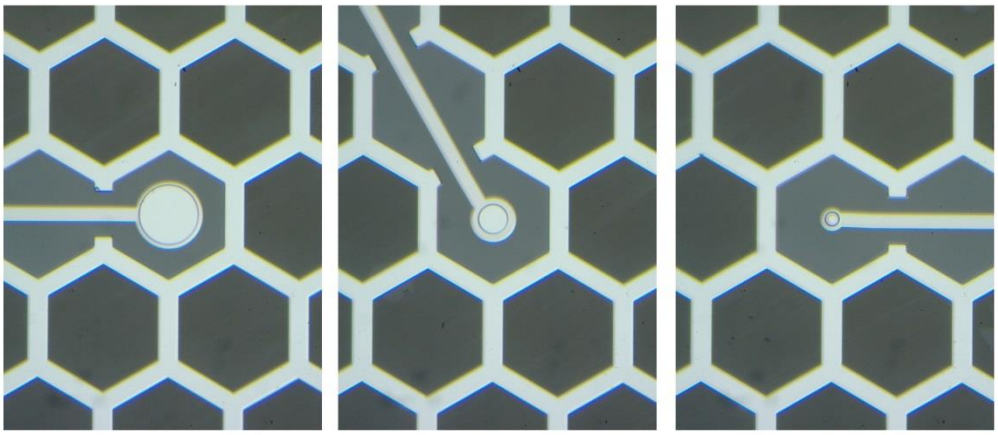

Figure 44 Détail des trois types de microélectrodes fabriquées. Les diamètres des électrodes sont de 80, 40 et 20 µm

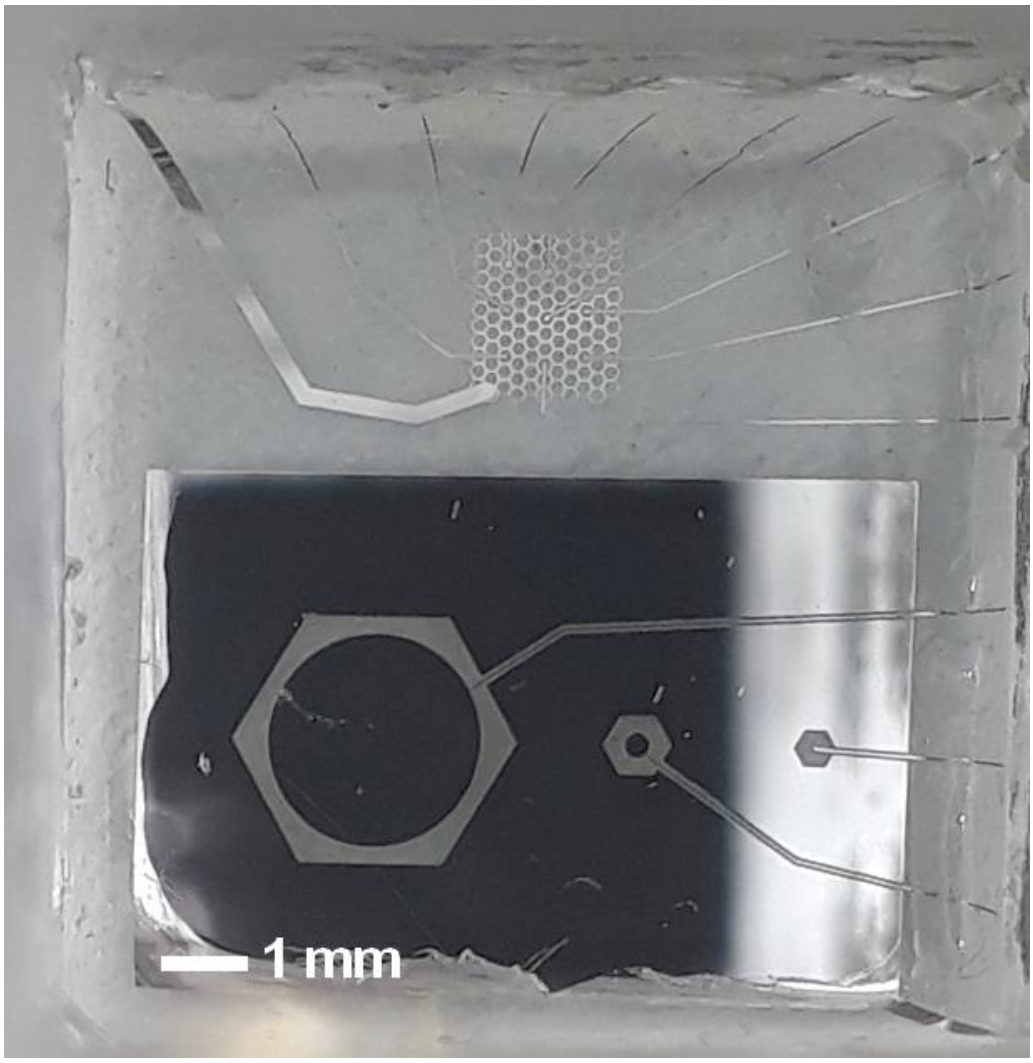

Figure 45 Photo d'un quartier pour une matrice de la première série.

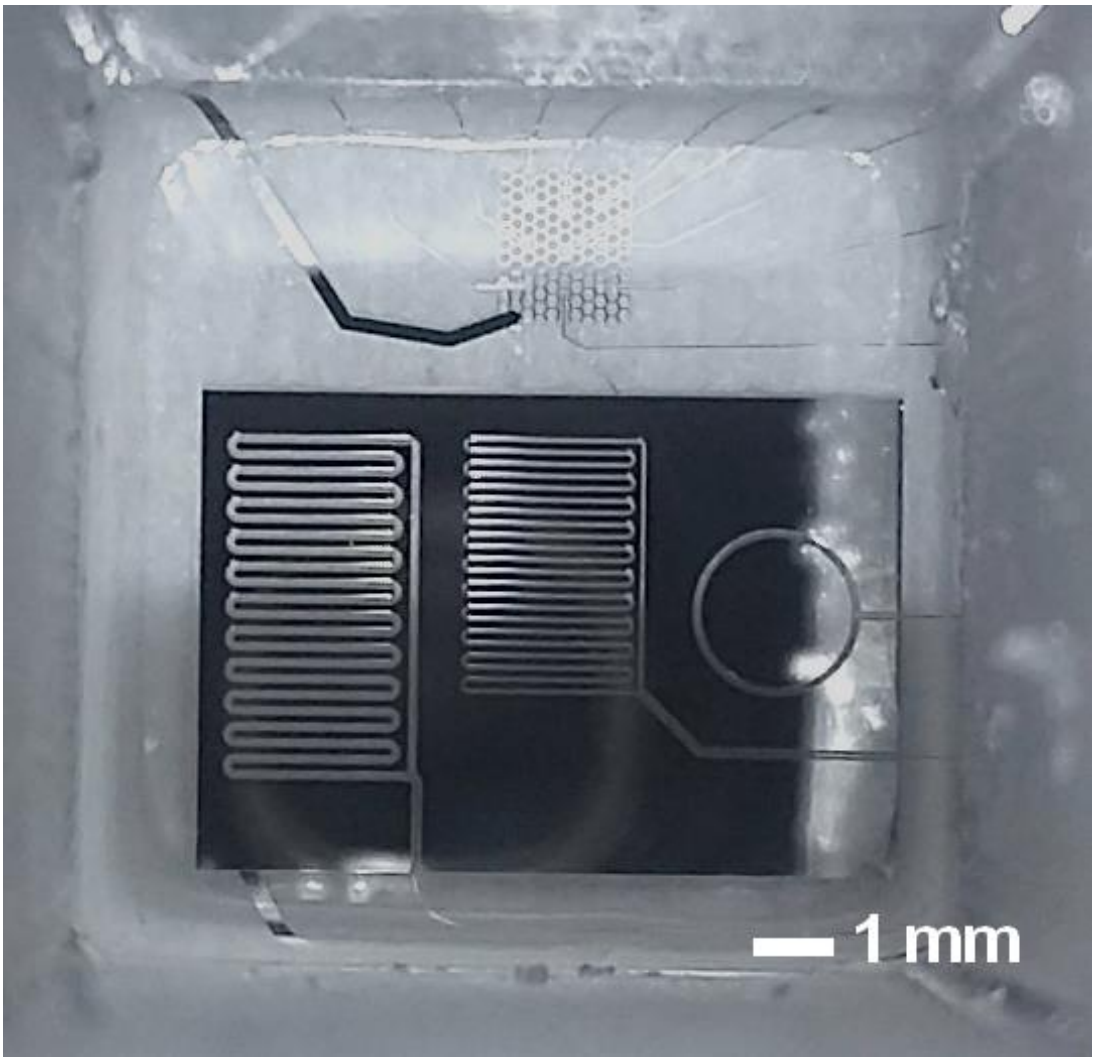

Figure 46 Photo d'un quartier pour une matrice de la seconde série.

4.2. Micro-fabrication en salle blanche

Les matrices d'électrode sont réalisées en salle blanche. Les différentes étapes sont synthétisées dans la Figure 47. Pour cela on réalise deux photolithographies sur des substrats de 4 pouces en verre de 500 µm d'épaisseur. La première étape consiste à réaliser les électrodes dont les lignes seront ensuite isolées durant la deuxième étape. On commence donc tout d'abord par étaler sur le substrat une résine photosensible à l'aide d'une machine de dépôt centrifuge. On utilise la résine AZ nLof 2020 (MicroChemicals). L'épaisseur cible est de 2 µm à 3000 tr/min. Le substrat est ensuite placé sur une plaque chauffante pour permettre au solvant de s'évaporer et à la résine de se solidifier. Pour éviter un choc thermique qui pourrait endommager la couche de résine on réalise ceci progressivement. Ainsi l'étape de cuisson

consiste en une séquence de 1 min (65°C), 2 min (95 °C), 1 min (65°C). Ensuite le substrat est exposé à une lumière ultraviolette de 365 nm et reçoit la dose appropriée. Ceci a pour effet de modifier la structure de la résine aux endroits où la lumière l'insole. Pour cela on place donc un masque entre la source de lumière et le substrat. Celui-ci contient des motifs en chrome qui sont opaques à la lumière UV utilisée. Ainsi la résine est exposée sélectivement. La résine utilisée est de type négatif, c'est-à-dire qu'elle polymérise aux endroits où elle reçoit la lumière. Pour amplifier la polymérisation on recuit le substrat avec une séquence identique à la première. Ensuite on utilise un développeur pour dissoudre les parties de la résine qui n'ont pas polymérisé et on obtient sur la résine le négatif des motifs du masque. On dépose ensuite la couche métal par pulvérisation cathodique. Durant cette procédure un plasma d'Argon est réalisé et les ions qui le compose sont accélérés vers une cible qui est ainsi pulvérisée et se dépose sur le substrat. Au préalable une courte pré-gravure est effectuée sur le substrat (en accélérant les ions vers ce dernier à la place de la cible). De cette façon on enlève les résidus de résine qui auraient pu survivre au développeur. Ensuite on dépose une couche de 10 nm de Titane suivie par 200 nm de Platine. Le Platine est utilisé pour son absence de réactivité chimique vis-à-vis des espèces en solution dans les cultures. Par la suite un bain d'acétone en présence d'ultrasons permet de décoller la résine et de faire apparaitre les motifs sur le substrat. L'étape suivante est presque identique. Cependant on utilise cette fois la résine SU-8, elle aussi négative, pour isoler les pistes de l'électrolyte. Elle est considérée biocompatible [97]. Un recuit supplémentaire à 175°C est également présent pour relaxer la résine et éviter que celle-ci ne se fissure. Les montées et descentes en température ne sont pas précisément contrôlées mais ont lieu en quelques dizaines de minutes pour la montée et quelques heures pour la descente.

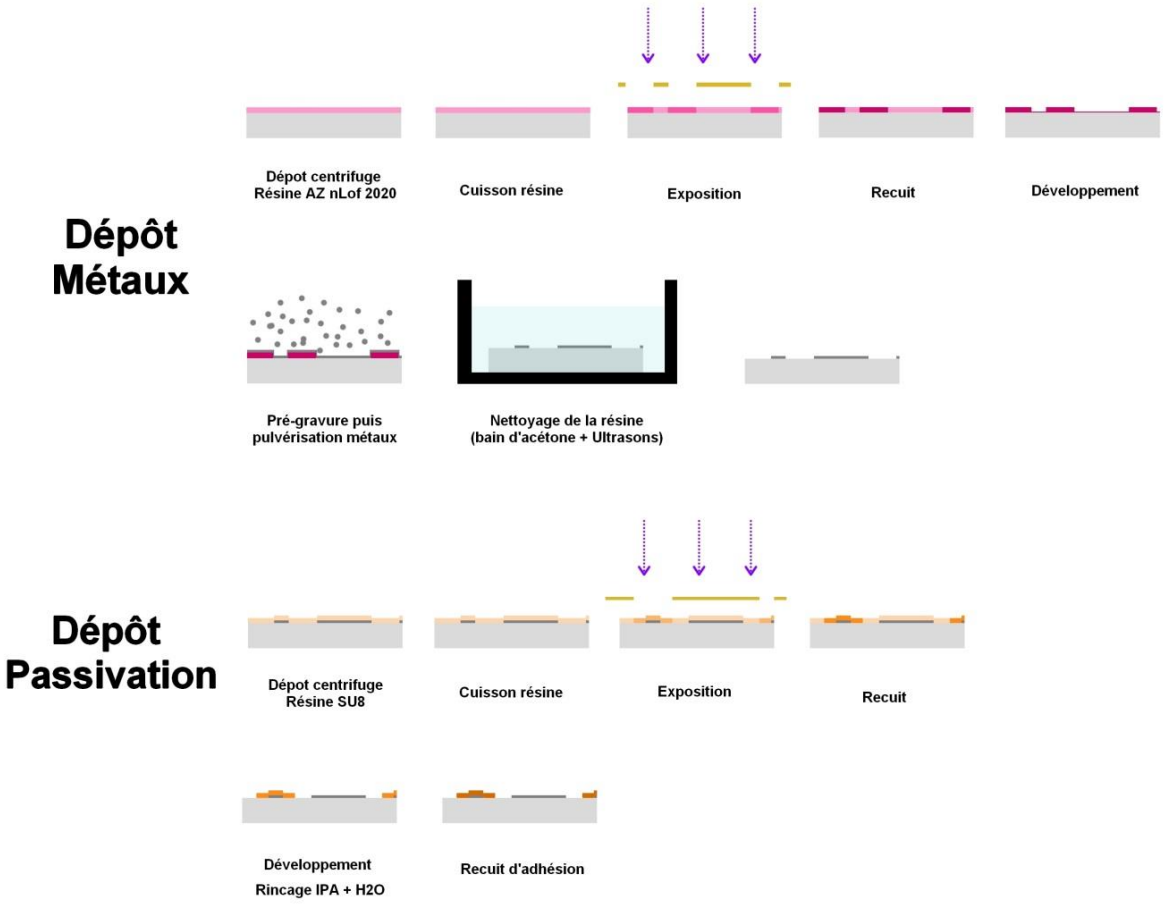

Figure 47 Les différentes étapes de micro-fabrication

4.3. Lien entre la taille de l'électrode et le spectre obtenu

Dans cette sous-partie on va évaluer par simulation l'effet d'un changement de géométrie sur les électrodes. On va tout d'abord présenter des simulations sous forme de circuits électriques qui correspondent à la simulation du modèle de Randles vu au Chapitre 1 qui a été modifié pour prendre en compte l'absence de réaction électrochimique.

Ensuite on présentera des simulations réalisées sur le logiciel Comsol.

- Simulation du modèle électrique

Dans la Figure 48 on a simulé le modèle de Randles. On rappelle la structure de celui-ci dans l'encadré. On construit tout d'abord le spectre qui représente la plus grosse électrode, qui a donc le module de son impédance le plus faible des trois. C'est le couple de courbes en traits pleins sur la Figure 48. Pour choisir les paramètres Q, α et R_e on détermine la valeur de Q et α à l'aide du module et de la phase à 1 Hz sur la mesure de l'électrode de 2430 µm que nous présenterons plus loin. Pour R_e on prend la valeur du module de l'impédance à 1 MHz. Pour construire le second couple de courbes (en traits interrompus dans la Figure 48) on divise la valeur du paramètre Q par un facteur K^2 et on multiplie la valeur du paramètre R_e par K. Dans la simulation K vaut 9. Le facteur K est associé à la réduction de taille de l'électrode que nous détaillerons plus loin. Pour obtenir le troisième couple de courbes (en pointillés dans la Figure 48) on répète cette opération.

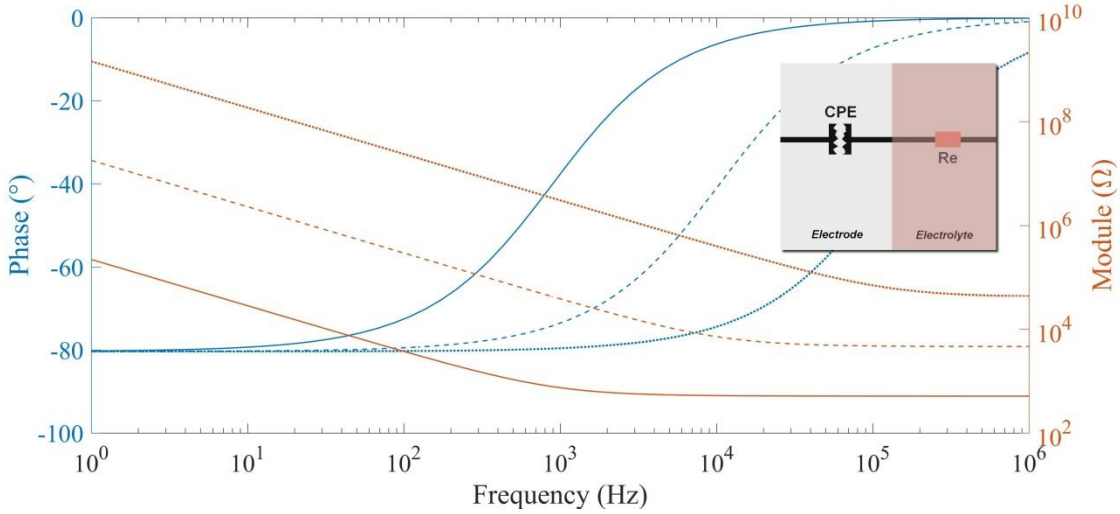

Figure 48 Simulation de spectres quand on fait varier Q et R_e

Le circuit de Randles (modifié pour tenir compte de l'absence de réactions électrochimiques) avec capacité parfaite se traduit par une coupure du premier ordre qui a lieu quand la phase atteint -45°. Cette coupure définit la transition entre le comportement capacitif et résistif. La fréquence de coupure, est, dans le cas d'un circuit RC du premier ordre, égale à $1/_{2\pi RC}$. Or

dans le cas des électrodes on a vu dans le Chapitre 1 que la capacité est une grandeur associée à la surface de l'électrode car les charges sont stockées sur toute la surface de celle-ci, là où s'établie la double couche. Quant à la résistance elle est associée au rayon et donc au périmètre de l'électrode car c'est le périmètre qui détermine l'ensemble des chemins résistifs possibles entre électrode et référence (à espace inter-électrode constant ce qui est notre cas ici). Toutes choses égales par ailleurs si l'on divise le diamètre (et donc le rayon) de l'électrode par K alors on divise la surface et donc la capacité par K^2. En même temps on divise le périmètre par K, donc on multiplie la résistance par K. Globalement le produit RC est donc divisé par K, et la fréquence de coupure multipliée par K.

Toutefois la présence de l'élément à constante de phase change la fréquence de coupure présentée précédemment et on prend plutôt comme critère sur la phase le seuil de - α45°.

En fonction de la pulsation $\omega = 2\pi f$, l'impédance du circuit RCPE vaut en effet :

$$Z = \frac{RQ(j\omega)^{\alpha} + 1}{Q(j\omega)^{\alpha}}$$

Avec :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^{\alpha}}$$

Soit encore :

$$Z = \frac{RQ\omega^{\alpha} j sin(\alpha\frac{\pi}{2}) + RQ\omega^{\alpha} cos(\alpha\frac{\pi}{2}) + 1}{Q(j\omega)^{\alpha}}$$

La pulsation qui permet d'atteindre une phase de - α45° s'écrit donc :

$$\tan^{-1}\left(\frac{RQ\omega_c^{\alpha} sin(\alpha\frac{\pi}{2})}{RQ\omega_c^{\alpha} cos(\alpha\frac{\pi}{2}) + 1}\right) - \alpha\frac{\pi}{2} = -\alpha\frac{\pi}{4}$$

Donc :

$$\omega_c = \left(\frac{\tan\frac{\pi}{4}\alpha}{RQsin\left(\alpha\frac{\pi}{2}\right) - RQcos\left(\alpha\frac{\pi}{2}\right)\tan\frac{\pi}{4}\alpha}\right)^{\frac{1}{\alpha}}$$

Ainsi si le produit RQ est divisé (multiplié) par K alors la pulsation (et donc la fréquence) de coupure est multipliée (divisée) par $K^{\frac{1}{\alpha}}$. Ceci est vérifié dans la Figure 48.

- Simulation de la géométrie sur Comsol

On va maintenant présenter les simulations réalisées sur Comsol. La géométrie simulée est celle des trois électrodes de 15, 270 et 2430 µm de diamètre tel que représenté dans la Figure 49 dans le cas de l'électrode de 270 µm. Les lignes de connexion n'ont pas été simulées.

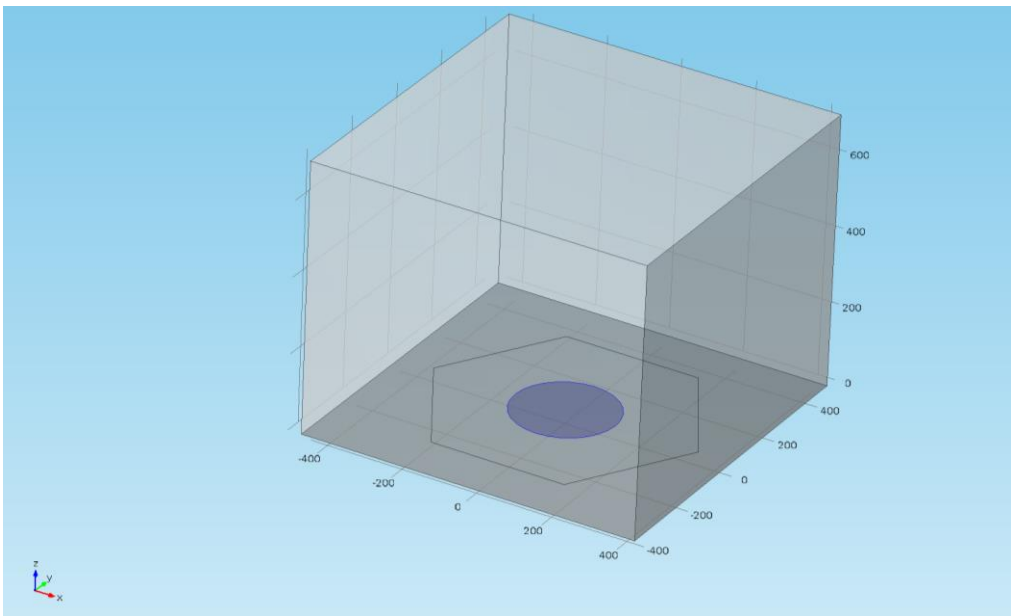

Figure 49 Illustration de la géométrie simulée dans le cas de l'électrode de 270 µm de diamètre (en bleu).

La Figure 50 montre le module de l'impédance et la Figure 51 la phase simulés par Comsol. L'impédance complexe est fournie directement par le module AC/DC de Comsol, et le maillage utilisé est laissé à la détermination du logiciel (maillage « contrôlé par la physique »). On a

utilisé une conductivité du milieu DMEM de 1.4 S/m [98] et une capacité surfacique pour l'interface électrode-électrolyte de 100 mF/m².

On obtient un spectre d'allure proche de ce qui est obtenu avec la simulation du modèle électrique RCPE. La différence principale se situe dans le module de l'impédance en hautes fréquences. Dans le cas de la simulation Comsol on n'a en effet pas inclus les lignes de connexions. Celles-ci ajoutent une résistance en série dont l'ordre de grandeur est de quelques centaines d'Ohms (précisément 259 Ω pour une ligne de Platine de 1 cm de long, 20 µm de large et 200 nm d'épaisseur). Cela explique, avec la résistance associée aux contacts à ressort, la différence observée.

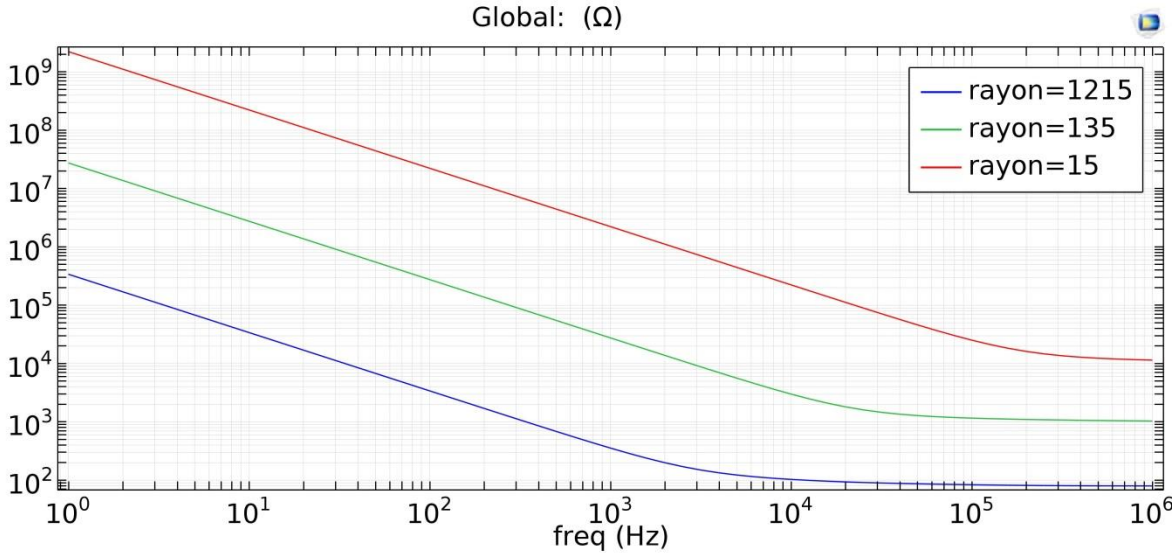

Figure 50 Simulation du module de l'impédance pour les trois électrodes. La valeur indiquée est le rayon de l'électrode en µm.

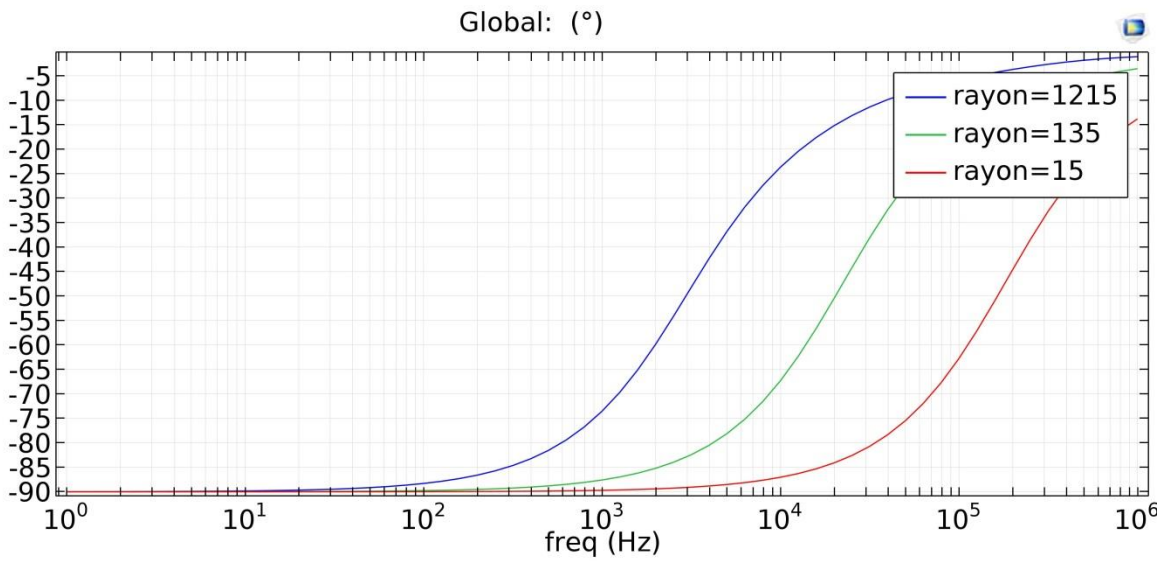

Figure 51 Simulation de la phase de l'impédance pour les trois électrodes. La valeur indiquée est le rayon de l'électrode en µm.

Par ailleurs sur la Figure 51 on remarque que la phase en basses fréquences atteint une valeur de -90°, puisqu'on est en présence d'une capacité idéale et non d'un élément à constante de phase ici.

- Mesures sur le dispositif

On s'intéresse donc aux 3 électrodes inférieures sur la Figure 45. La forme hexagonale de l'électrode de référence avait pour but initial de se rapprocher des structures existantes dans les implants rétiniens, dans le but d'une application éventuelle. Celles-ci ont un rapport de dimensions particulières entre elles. En effet pour la plus petite électrode à droite on a choisi un diamètre de 30 µm, identique à celui présent dans les MEAs commerciales. Ainsi cette électrode devrait donner des résultats similaires à ceux obtenus sur MEA commerciale. Pour l'électrode intermédiaire on a multiplié ce diamètre par 9 (270 µm). Enfin pour la macroélectrode on a encore une fois multiplié le diamètre par 9 afin d'obtenir un diamètre de 2430 µm. La distance électrode-référence (mesurée dans la direction verticale sur la photo) est fixée à 200 µm pour les 3 électrodes ce qui est proche de ce qu'on a avec les MEA

commerciales. Le rapport de diamètres produit un rapport de surface des électrodes d'une valeur de 81.

Le milieu de culture classique (DMEM + 20 % SVF) est utilisé pour les premières mesures mais aucune cellule n'est présente.

La Figure 52 montre les différents spectres des électrodes des 4 quartiers. Chaque flèche indique le diamètre du groupe d'électrode considéré là ou leurs modules et leurs phases se croisent. Les symboles sur les courbes représentent les quartiers. Pour le groupe d'électrodes de 30 µm seules 3 courbes sont présentes puisque l'une des électrodes a été couverte de PDMS durant le collage du puits.

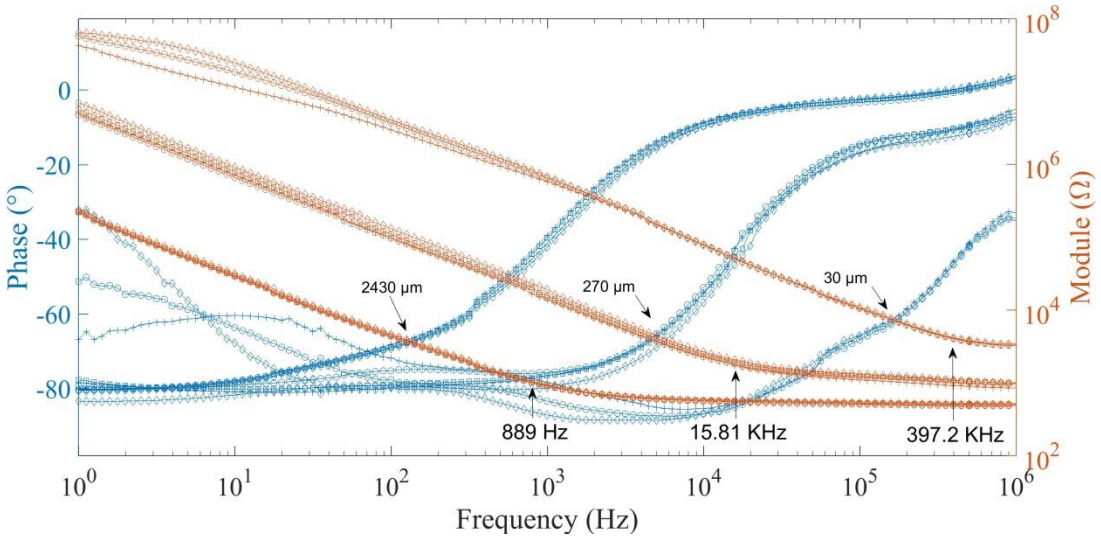

Figure 52 Les courbes d'impédance mesurées sur la série d'électrodes de 30, 270 et 2430 µm

On observe une nette différence d'impédance parmi les 3 types d'électrodes. Une électrode de surface plus faible étant associée à une impédance plus élevée comme attendu. On va s'intéresser aux fréquences de coupures présentées précédemment dans les simulations. Entre l'électrode de 2430 µm et celle de 270 µm on mesure un rapport des fréquences de coupures de 17.8. Entre celle de 270 µm et celle de 30 µm, un rapport de 25.1. Si l'on avait un circuit RC classique on s'attendrait à un rapport de 9 entre les fréquences. La différence peut s'expliquer par plusieurs facteurs. D'une part le circuit constitué par l'électrode et l'électrolyte n'est pas exactement un circuit RC puisqu'on a la présence d'un élément à constante de phase. D'autre

part électrode et référence ne sont pas dans le même plan et ne sont pas à l'infini. Enfin, on verra par la suite que des défauts apparaissent rapidement sur la passivation ce qui empêche, particulièrement au niveau de l'électrode de 30 µm, de faire une analyse détaillée sur les mesures de celle-ci vis-à-vis de sa géométrie.

Dans notre cas la phase se stabilise en basse fréquence autour de -80° aussi bien pour l'électrode de 2430 µm que pour celle de 270 µm dans le cas présenté. On a donc $\alpha = \frac{80}{90} = 0.89$. Si l'on admet que le facteur RQ varie comme le facteur RC quand la géométrie de l'électrode change tel que présenté précédemment, alors le facteur 9 précèdent devient $9^{\frac{1}{0.89}} = 11.81$. On se rapproche un peu du rapport de 17.8 mesuré.

En ce qui concerne l'électrode de 30 µm, l'analyse de son impédance est difficile car on a constaté des décollements de la passivation. Celle-ci isole normalement la ligne qui relie les pads de contacts à l'électrode. Or dans le cas des électrodes de 30 µm et de 270 µm, la surface de cette ligne n'est pas négligeable vis-à-vis de celle de l'électrode. Si l'on considère la longueur de la ligne entre l'électrode et le bord du puits en PDMS collé sur le dispositif (Figure 53), et en sachant que la largeur de la ligne est de 20 µm, on peut calculer le rapport de sa surface avec celle de l'électrode.

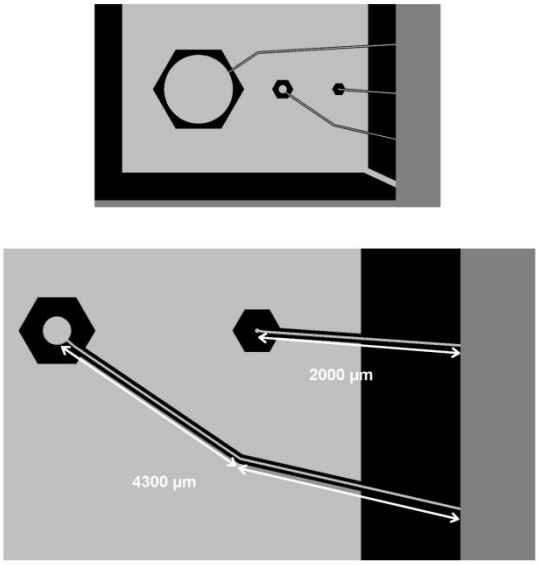

Figure 53 Schéma des électrodes mesurées avec dimension des lignes associées

Pour l'électrode de 270 µm, la ligne a une surface 1.5 fois plus grande que l'électrode. Quant à l'électrode de 30 µm, la ligne a une surface 56 fois plus grande que l'électrode.

En ce qui concerne la macroélectrode de 2430 µm, la surface de la ligne représente 2 % de l'électrode.

Ainsi excepté pour la macroélectrode, un décollement de la passivation même partiel aura des conséquences sur la mesure.

Un décollement de passivation est l'interprétation proposée pour la différence d'impédance entre deux électrodes de 30 µm présentées dans la Figure 54.

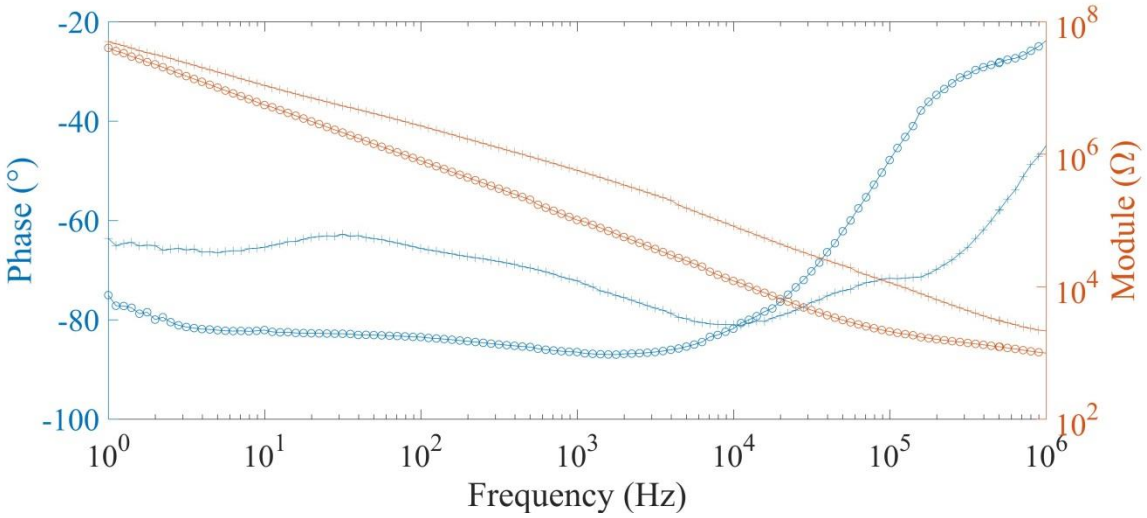

Figure 54 Spectre de deux électrodes de 30 µm juste après ensemencement de cellules

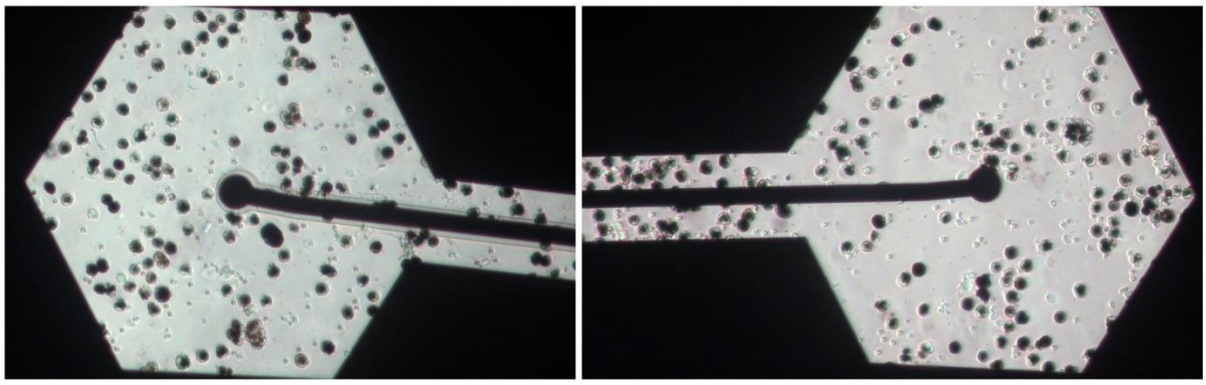

Figure 55 Photo d'une électrode de 30 µm avec la passivation intacte (gauche, spectre marqué « + ») et d'une autre avec la passivation décollée (droite, spectre marqué « o »)

Ces deux spectres sont associés aux deux électrodes dans la Figure 55. Pour les deux électrodes la mesure est faite juste après ensemencement des cellules, et on remarque que leur forme indique qu'elles ne sont pas collées à la surface. Celles-ci n'ont donc pas encore d'influence sur la mesure. Dans la Figure 55 la photo de gauche correspond au spectre marqué « + » alors que celle de droite correspond au spectre marqué « o ».

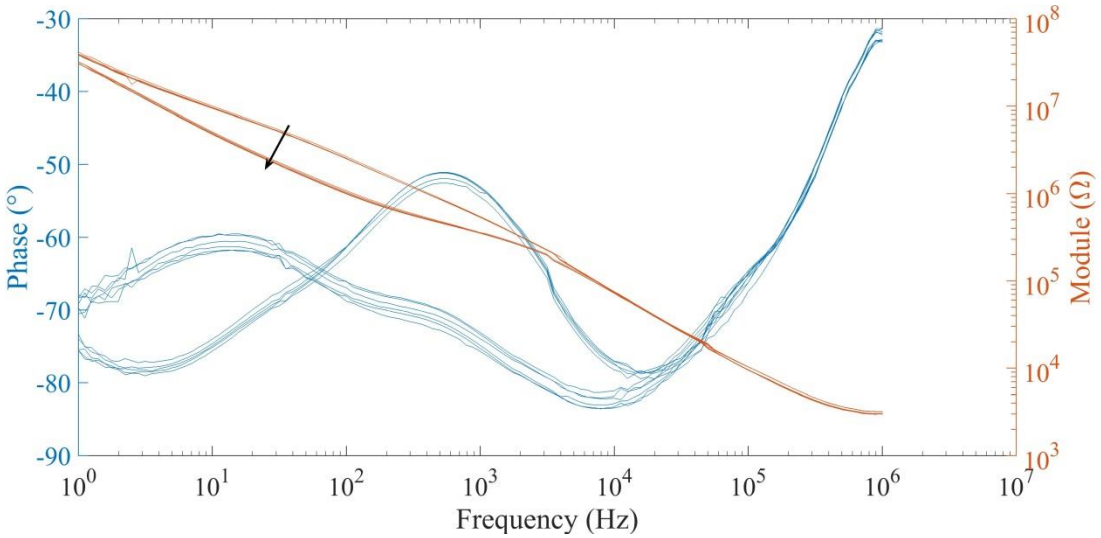

Figure 56 Evolution du spectre d'une électrode de 30 µm en présence de milieu de culture uniquement. La flèche indique le sens de variation des courbes.

La Figure 56 montre l'évolution du spectre d'une électrode de 30 µm en présence de milieu de culture uniquement. La variation de l'impédance a eu lieu dans un intervalle de temps de 2 jours durant lequel le dispositif n'était pas mesuré. Après constatation du changement dans le spectre le dispositif a été retiré du support et le milieu de culture remplacé mais la mesure est restée identique ce qui exclut un problème de court-circuit. La variation de l'état de la passivation est une hypothèse possible ici. Cependant, il est surprenant que la variation du module de l'impédance en hautes fréquences soit si faible (-175 Ω contre -1.5 kΩ dans l'exemple de la Figure 54)

5. Réalisation de la partie mécanique

5.1. Fabrication des puits en PDMS

La culture cellulaire a lieu dans un milieu liquide. Pour pouvoir remplir les matrices d'électrodes avec le milieu de culture il faut donc ajouter un puits qui donne une troisième dimension au système. Les puits sont fabriqués en Polydiméthylsiloxane (PDMS), un polymère siliconé. On utilise ce matériau car il est couramment utilisé dans des applications en présence de cellules vivantes et est considéré biocompatible [99]. Par ailleurs on peut le mouler pour réaliser une forme qui s'adapte aux matrices d'électrodes décrites précédemment. Celui-ci se présente sous forme d'un liquide visqueux qui durcit en présence d'un agent de polymérisation ajouté à une concentration de l'ordre de 10 % (en masse). Le temps de durcissement dépend grandement de la température. Ainsi à la température ambiante le durcissement complet a lieu en 3 à 4 jours. A 70°C le durcissement complet a lieu en 1h. On peut augmenter la température et/ou le temps de cuisson pour augmenter la dureté finale. Cependant ceci aura lieu également durant la phase de stérilisation des dispositifs.

Les puits sont moulés dans des moules imprimés en 3D. Pour faciliter le démoulage sans détruire le moule (ou le puits) les moules sont réalisés en plusieurs pièces. Ceci permet aussi de couvrir convenablement l'ensemble des parois internes du moule avec un agent de démoulage (sous forme d'aérosol).

Les moules sont imprimés en 3D, d'abord en PLA, puis en PETG. Le PETG (Polyethylene Terephthalate Glycol) est un matériau d'impression 3D FDM qui présente une température de transition vitreuse plus élevée que le PLA (88 °C contre 60 °C). Ainsi les moules remplis peuvent être placés au four (65-70°C) ce qui diminue grandement le temps de durcissement. Un moule en PLA ne peut pas être placé au four le durcissement se fait donc à l'air libre. La Figure 57 montre le modèle 3D des pièces réalisées. On peut adapter les piliers centraux ainsi que les deux côtés pour modifier la structure du puits. La Figure 58 montre différents types de puits réalisés avec cette méthode.

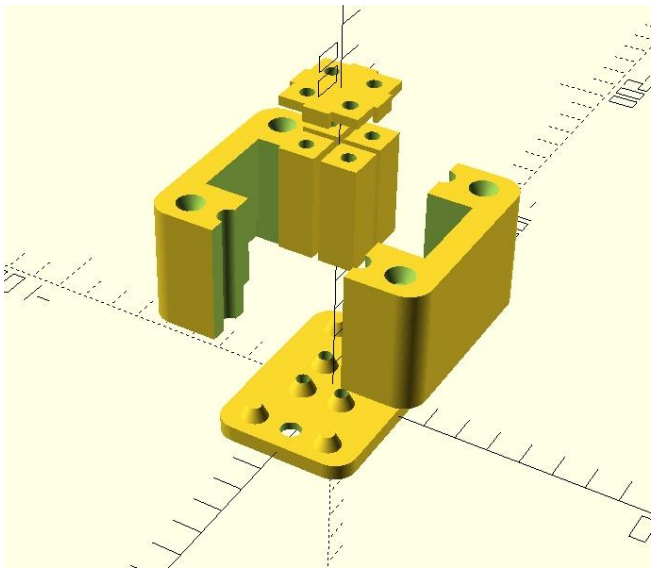

Figure 57 Les différentes pièces pour l'une des versions du moule. Les éléments sont assemblés à l'aide de vis (non représentées) et des joints en parafilm sont utilisés.

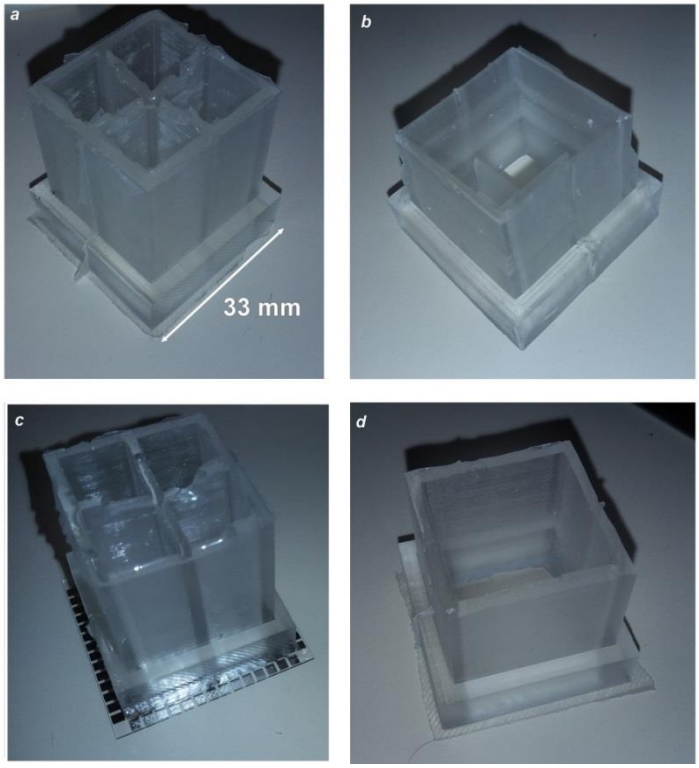

Figure 58 Quelques puits fabriqués. a) Un puits classique. b) Un puits à débordement. c) Un puit classique fixé sur une matrice d'électrodes. d) Un puits sans séparations centrales.

5.2. Collage des puits

Une fois un puits fabriqué celui-ci doit être collé sur la matrice d'électrode. La colle utilisée est d'une importance critique car encore plus que le matériau du puits, elle sera en contact direct avec la culture cellulaire qui se développe sur la matrice. On utilise donc également du PDMS, identique à celui utilisé pour fabriquer les puits. Pour réaliser l'alignement entre le puits et la matrice d'électrodes, un aligneur est réalisé en 3D et imprimé en PETG. Il est représenté dans la Figure 59. Le puits s'emboite dans la partie supérieure et la matrice est placée sur la partie inférieure. Des vis (non représentées) maintenues dans la partie inférieure sont utilisées pour le guidage entre les deux parties.

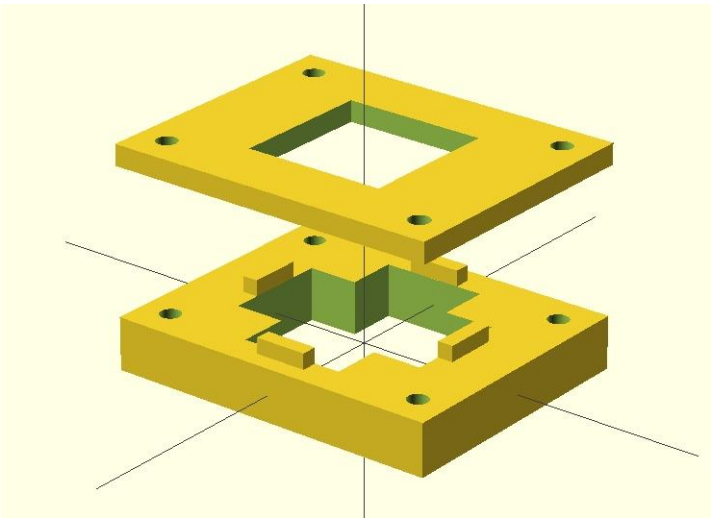

Figure 59 Pièce d'alignement

Le puits est placé sur la partie supérieure de l'aligneur puis une couche de PDMS est étalée avec le doigt sur le dessous. Après quelques minutes d'homogénéisation à l'envers le surplus qui a débordé sur les bords du puits est nettoyé puis le puits est placé au four à 70°C pendant 5 à 10 minutes. Le puits est placé dans le four à l'envers et le plus perpendiculairement au sol que possible. Ensuite le puits et son support sont lentement coulissés sur la partie inférieure pour venir reposer sur la matrice. L'ensemble est ensuite placé au four pendant 1 heure. Un test d'étanchéité est par la suite réalisé en ajoutant du rouge de phénol concentré dans chacun des puits. La Figure 60 montre une fuite sur une partie d'un puits (vue du dessus) et un autre puits étanche (vue du dessous).

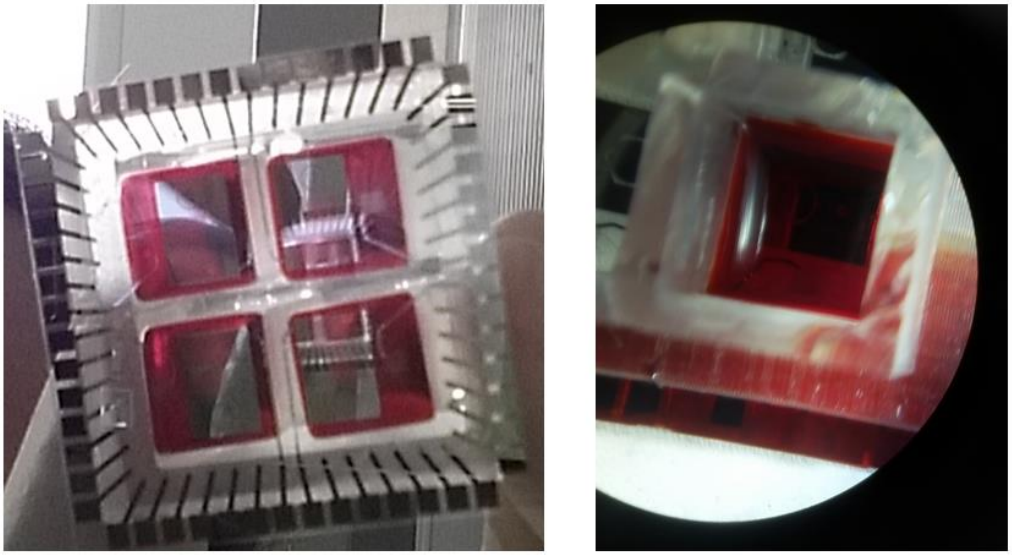

Figure 60 Vérification de l'étanchéité du puit au rouge de phénol. (gauche : étanche, droite : fuite)

5.3. Choix et fabrication du support et des éléments associés

Le support permet l'alignement entre les contacts de la matrice d'électrode et les fils de connexion. Ceci se fait par l'intermédiaire de pointes à ressort. Le support est réalisé par fraisage d'une plaque de polyéthylène, un matériau non toxique et qui résiste à la solution désinfectante à base d'alcool. Une illustration est montrée à la Figure 61.

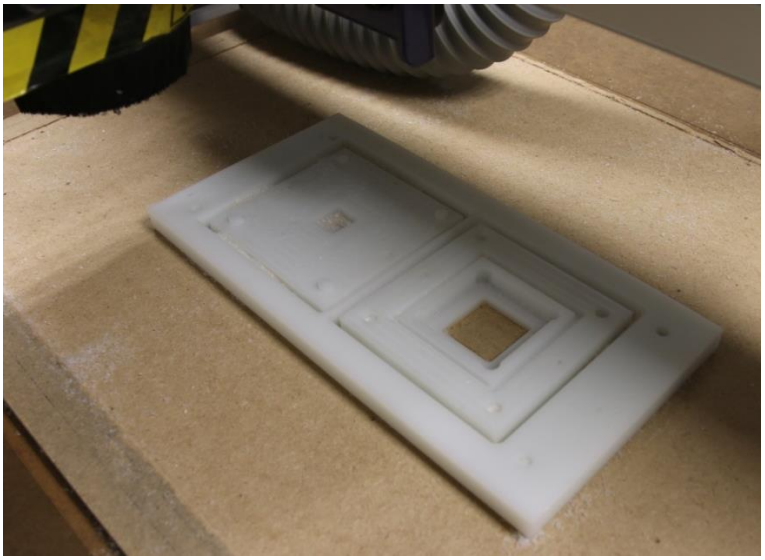

Figure 61 Support en polyéthylène en cours de fraisage.

Les pointes à ressort sont retenues en position par un PCB qui est lui-même vissé sur le support. Deux murets imprimés en ABS sont ajoutés de part et d'autre des pointes et l'espace qui les sépare est rempli de PDMS. Ceci permet d'isoler les connexions de l'environnement de l'incubateur. Les vis qui viennent fixer le PCB sont également celles qui permettent l'ajout d'éléments au-dessus de la matrice. Ainsi ils sont convenablement alignés avec la matrice d'électrodes. Ces éléments peuvent être le groupe diaphragme et LEDs ou encore un porte-pipette. Ce dernier permet de remplacer le milieu de culture sans avoir à ouvrir le support. Ceci permet une augmentation de la reproductibilité et un gain de temps qui a son importance dans les expériences réalisées. Ces éléments ont également une seconde fonction. Ils permettent de couvrir la matrice. En effet celle-ci n'a pas de couvercle et se retrouve donc à l'air libre quand on ouvre l'incubateur pour la retirer du support. Cette couverture permet de limiter les contaminations contenues dans l'air et qui pourraient tomber dans le milieu de culture. Une représentation schématique en demi vue de l'ensemble est présentée dans la Figure 62. Les différents éléments ne sont pas à l'échelle pour permettre une meilleure visualisation.

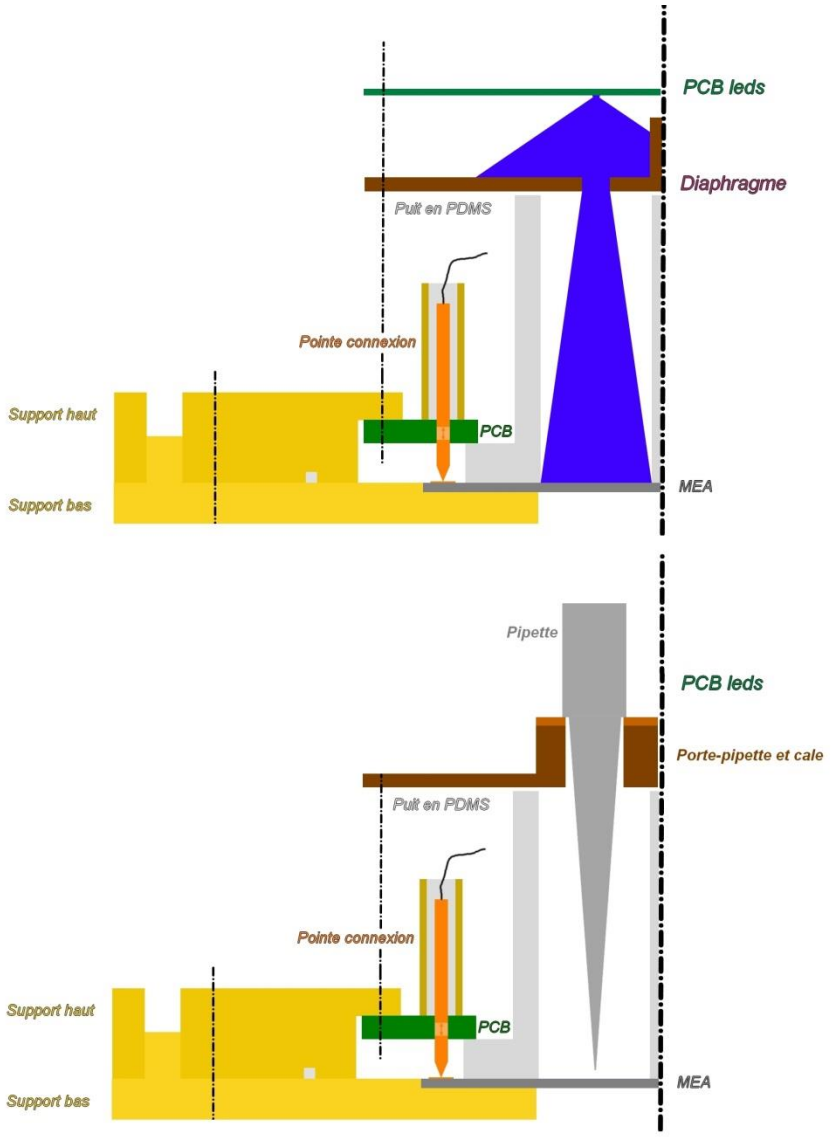

Figure 62 Représentation schématique en demi vue du support et des éléments associés. Les vis sont représentées par les traits mixtes fin et l'axe de symétrie par un trait mixte fort. Le dessin n'est pas à l'échelle pour améliorer la visualisation des différentes parties.

Concernant le porte-pipette et afin de s'assurer que la pipette ne touche pas le fond de la matrice où se trouvent les cellules, le porte-pipette est sous-dimensionné et un ensemble de cales est utilisé. Le réglage est fait de la façon suivante. Tout d'abord une matrice vide est placée et le support refermé. En positionnant un cône de pipette dans le support on peut sentir si celui-ci touche la MEA avant de toucher les bords du support. Une calle de 1 mm est alors ajoutée. Tout comme le porte-pipette les cales sont imprimées en 3D et sont mesurées pour

s'assurer de leurs dimensions. Dans notre cas deux cales sont ajoutées et collées ce qui permet de dire que l'extrémité de la pipette se situe entre 1 et 2 mm au-dessus de la culture. Ceci correspond à un volume de 115 à 231 µL restant après pipetage. La Figure 63 montre le porte-pipette et les cales en détails. Un couvercle est ajouté sur le porte-pipette quand aucune pipette n'est insérée

.

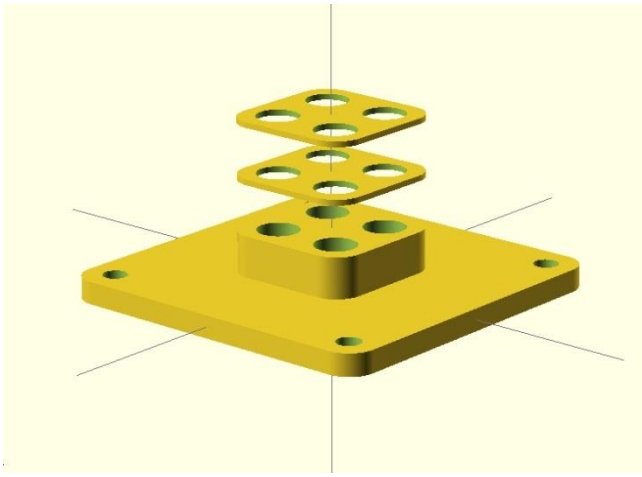

Figure 63 Porte-pipette et cales

L'ensemble est représenté dans la Figure 64. Par la suite certains fils ont été modifiés pour que la connexion se fasse en dehors de l'incubateur.

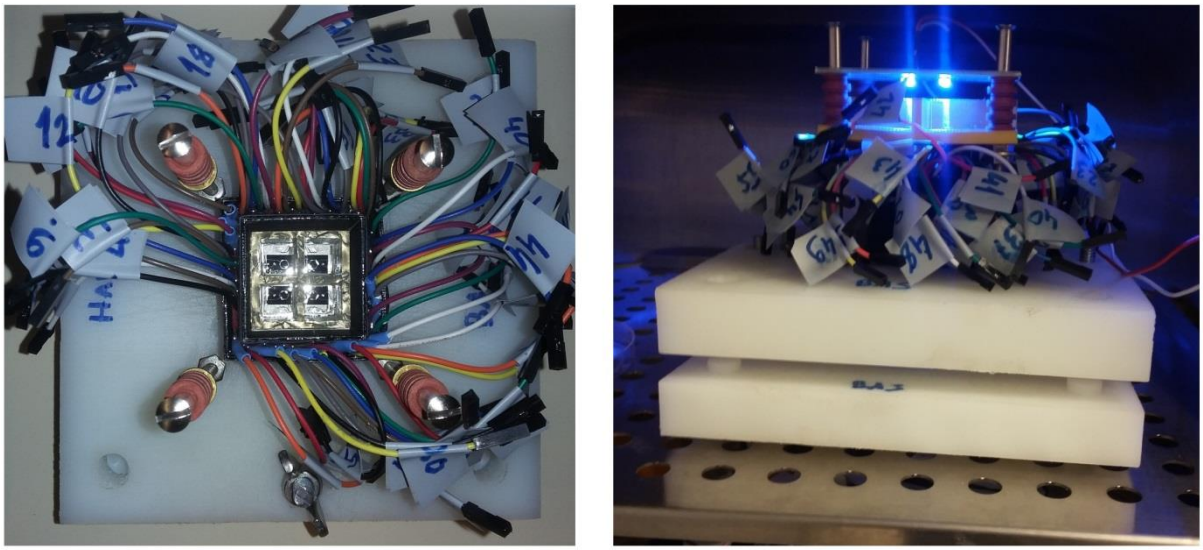

Figure 64 Support et matrice d'électrode vue de dessus (gauche). Support ouvert avec système d'éclairage allumé (droite)

En conclusion, dans ce chapitre on a montré les éléments matériels qui permettent de mettre en œuvre des mesures d'impédance automatisées et à distance sur des cultures de cellules RPE. Les contraintes ont été prises en compte et intégrées dans les solutions technologiques proposées. Une étude du bruit du système a également été réalisée Les résultats des mesures sur cultures cellulaires seront présentés dans les chapitres 3 et 4.

Chapitre 3

Modèle électrique et croissance du tapis cellulaire

Dans ce chapitre on présente les premiers résultats obtenus. On peut les diviser en deux groupes. La première série de résultats concerne des MEA commerciales et a essentiellement permit de valider le banc de mesure. La seconde série concerne les dispositifs réalisés pendant la thèse, que ce soit du premier ou du second type. Dans ce chapitre on s'intéresse tout d'abord à l'étude de la croissance cellulaire, en observant les paramètres de l'élément à constante de phase associé.

1. Résultats préliminaires sur MEA commerciales

Dans le but de valider le banc expérimental décrit au Chapitre 2 on utilise une matrice de microélectrodes (MEA) de la société MultiChannel Systems (MCS) dont une photo est présentée à la Figure 65.

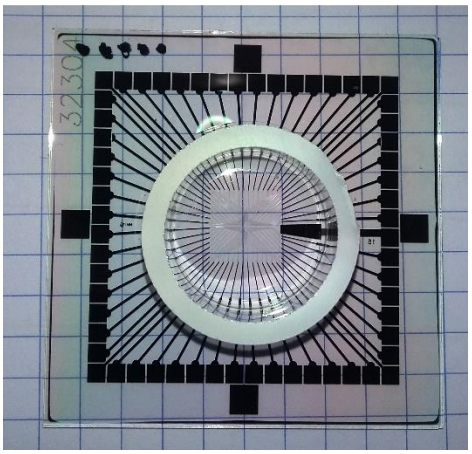

Figure 65 Une matrice de microélectrodes

La partie centrale contient un puits qui vient accueillir le milieu de culture et les cellules. On utilise du DMEM avec 20 % de SVF pour favoriser la croissance cellulaire. La MEA contient des électrodes de 30 µm de diamètre espacées de 200 µm. La Figure 66 montre l'évolution de la culture au niveau d'une électrode mesurée. La mesure se fait entre l'électrode centrale et les 8 électrodes qui l'entourent et qui connectées ensemble servent de référence. Au jour 0 les cellules sont ensemencées puis on place la MEA dans son support et on démarre les mesures à raison d'une mesure toute les 45 min environ. La Figure 67 présente l'évolution du spectre de l'impédance entre le jour 4 et le jour 6. La flèche indique le sens de variation des courbes du module de l'impédance.

- Visualisation et procédure de réalignement des données

On remarque que des « sauts » existent dans les mesures. Ceux-ci correspondent aux points de mesure entre lesquels le potentiostat change de calibre pour la mesure du courant. On peut compenser ceci en faisant les hypothèses suivantes :

- ❖ Le spectre de l'impédance doit être continu
- ❖ Plus la mesure est en hautes fréquences plus elle est de meilleure qualité dans la bande de fréquence considérée

L'hypothèse 1 est justifiée par le fait qu'une discontinuité de ce type est incompatible avec un système linéaire, ce qu'on considère comme étant le cadre des mesures effectuées. L'hypothèse 2 est justifiée par le fait qu'en haute fréquence l'impédance mesurée est la plus faible, le courant correspondant est donc le plus important. Par ailleurs dans le chapitre précédent on a montré que l'incertitude sur la mesure en haute fréquence est plus faible que celle en basse fréquences à cause à cause de la présence du bruit en 1/f.

Pour corriger les données on peut donc, en partant des hautes fréquences, réaligner les données en basses fréquence de sorte qu'elles s'alignent avec les données en haute fréquence. Ceci est présenté dans la Figure 68. Ceci améliore la visualisation des données en particulier quand de nombreux spectres sont superposés et est uniquement nécessaire pour les meures dans le cas de microélectrodes (module de l'impédance plus élevée).

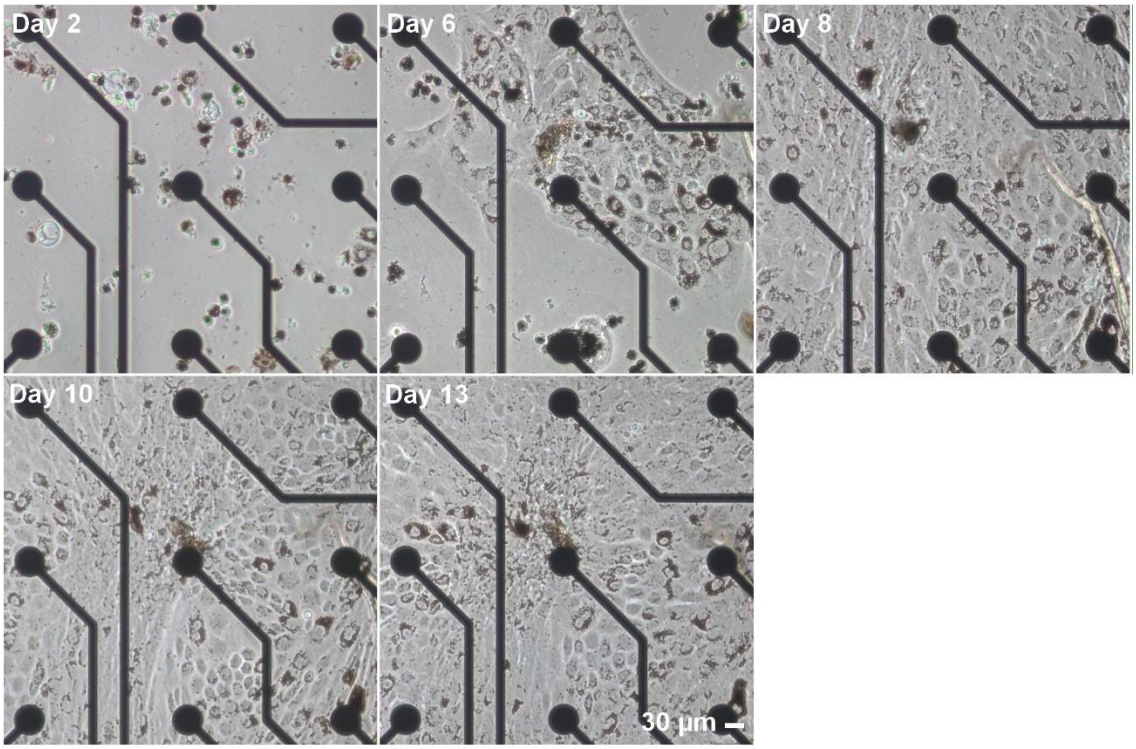

Figure 66 Evolution de la culture au court du temps observée sur la même zone. Les électrodes ont un diamètre de 30 µm.

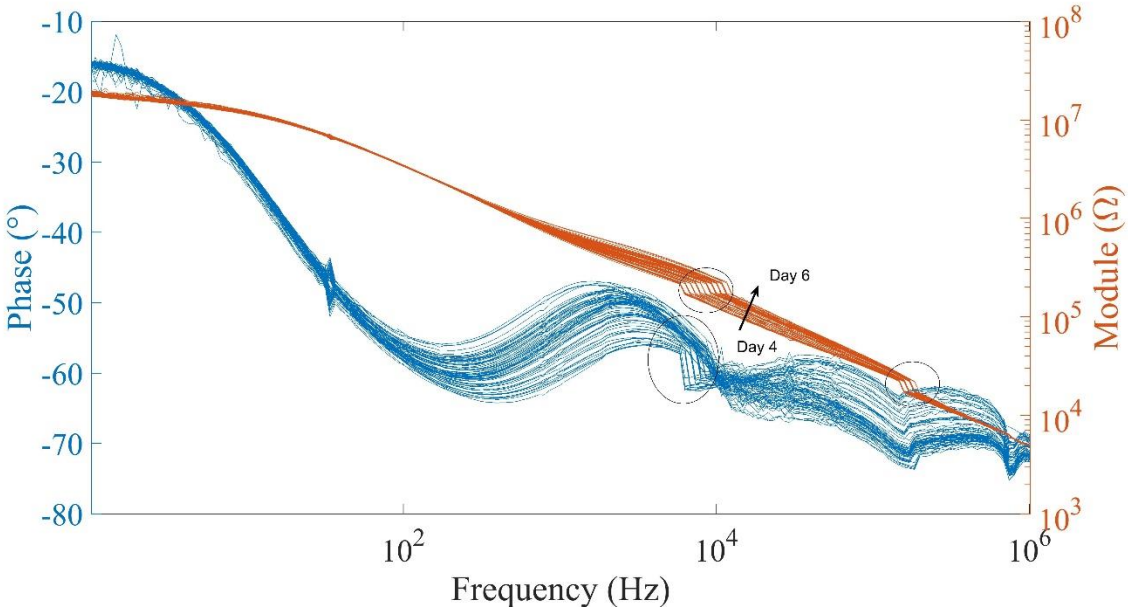

Figure 67 Diagrammes de Bode de l'impédance mesurée entre les jours 4 et 6 de la culture. La flèche montre le sens de variation des courbes du module de l'impédance. Les cercles indiquent les changements de calibre du potentiostat.

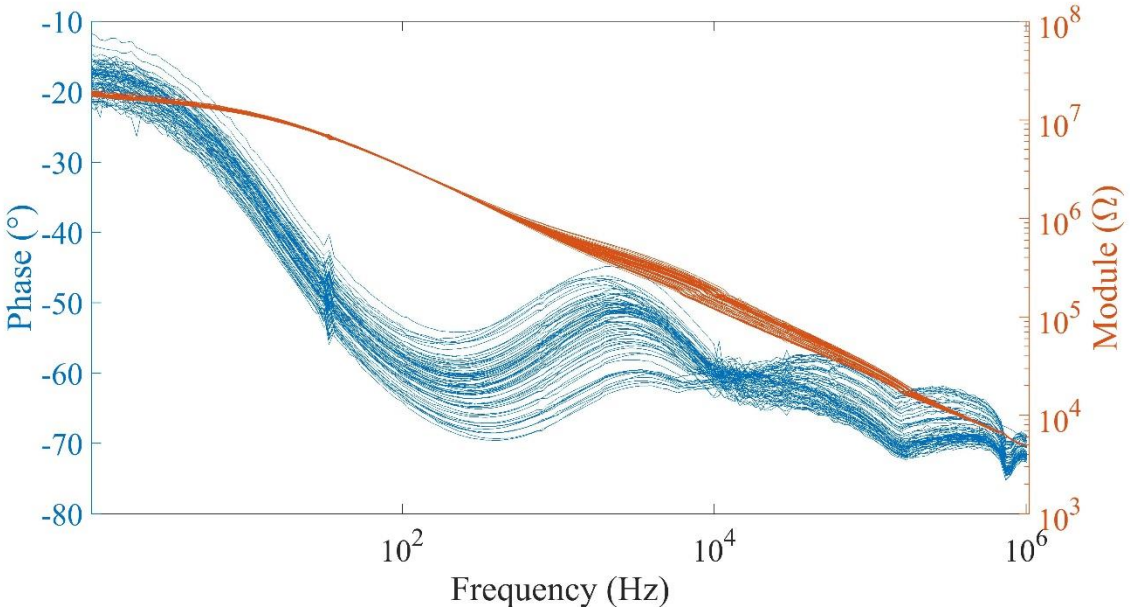

Figure 68 Diagrammes de Bode de l'impédance corrigée (par suppression des changements de calibre) entre les jours 4 et 6 de la culture.

On peut par la suite tracer la variation du module de l'impédance à 4.5 KHz (qui correspond au maximum de variation de l'impédance) afin de visualiser la croissance des cellules. Ceci est présenté à la Figure 69. Une autre alternative consiste à observer la variation de la phase. En fonction de la fréquence observée, celle-ci va varier en sens opposé quand la culture se développe. Ainsi si on trace par exemple la différence entre la phase à 2 KHz et la phase à 100 KHz on obtient également un indicateur de la croissance cellulaire (Figure 70).

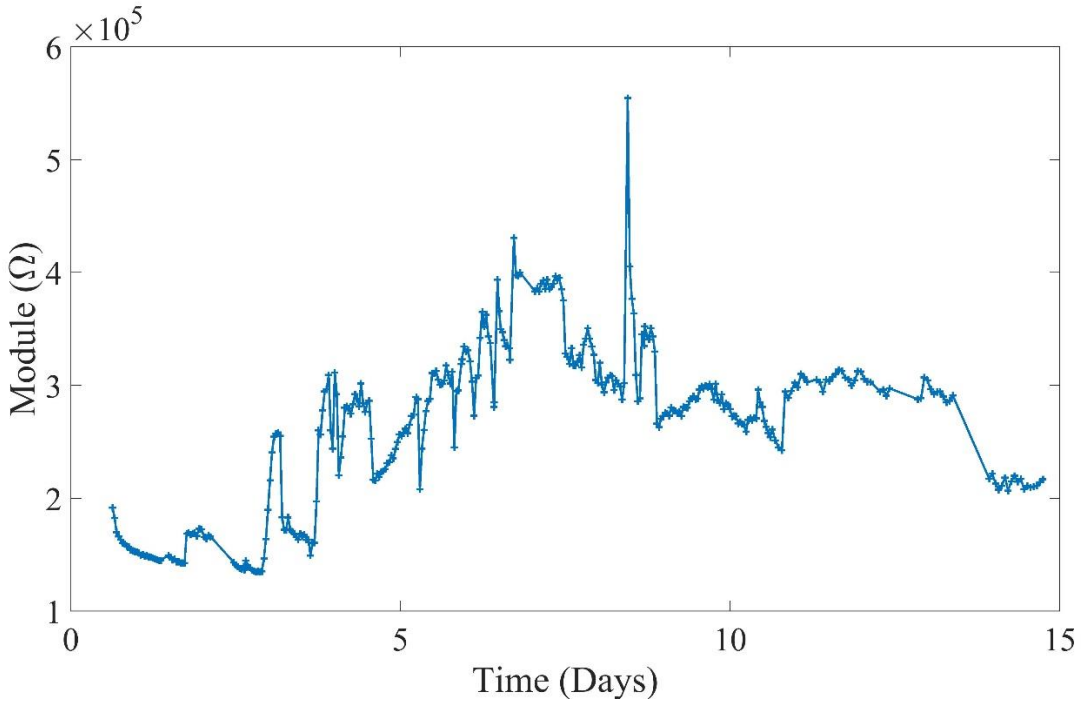

Figure 69 Module de l'impédance à 4.5 KHz en fonction du temps

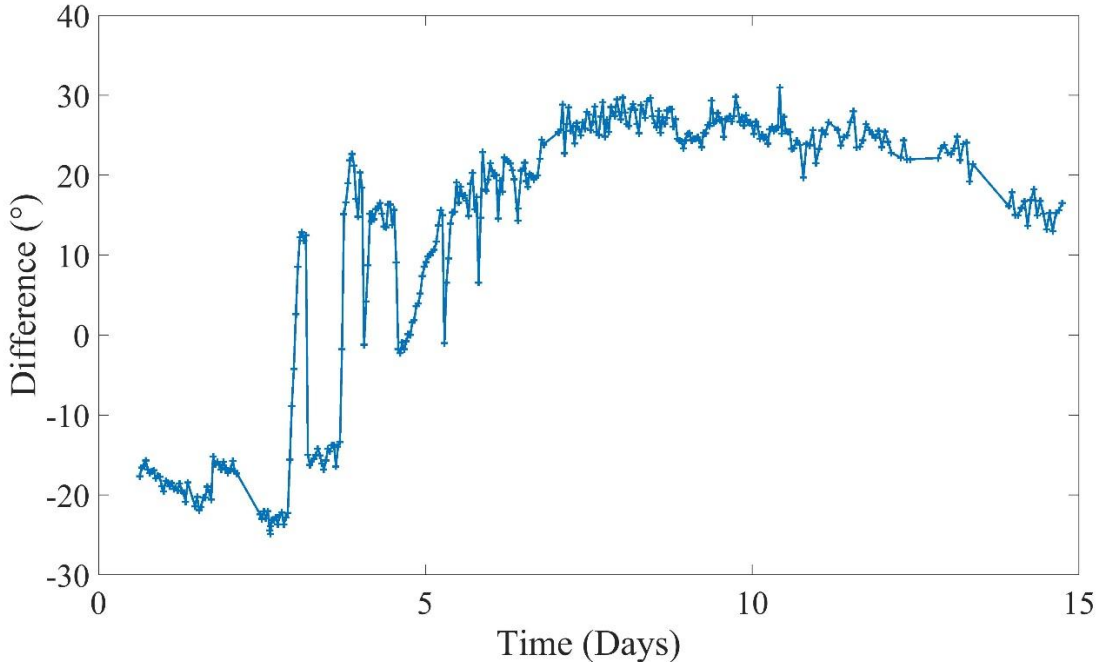

Figure 70 Phase de l'impédance à 2 KHz moins phase de l'impédance à 100 KHz en fonction du temps

- Comportement parasite en basses fréquence (f < 100 Hz)

On observe par ailleurs un comportement particulier en basses fréquence. En effet l'impédance semble se stabiliser vers un plateau en basses fréquences. Ceci indique un comportement résistif. La possibilité de l'existence de réactions électrochimiques que ce comportement peut parfois traduire est exclue ici. En effet avec un biais nul et une amplitude appliquée de seulement 10 mVrms entre les électrodes, il est délicat de désigner un couple oxydant réducteur candidat pour une réaction électrochimique dans ces conditions. Des espèces adsorbées à la surface de l'électrode pourraient éventuellement provoquer ce type de comportement mais aucune étude approfondie n'a été conduite en ce sens et il est donc difficile de conclure. En revanche ce comportement en basses fréquences est corrélé avec l'ouverture de l'incubateur et les manipulations de la MEA telles que l'observation au microscope ou le changement de milieu de culture. Dans la Figure 71 on visualise des pics de l'impédance à 1 Hz qui ont lieu après de telles manipulations. La constante de temps associée à la décroissance du pic présenté dans l'encadré a une valeur de l'ordre de 75 min. Ce pic correspond à la variation du module telle que représentée dans la Figure 72.

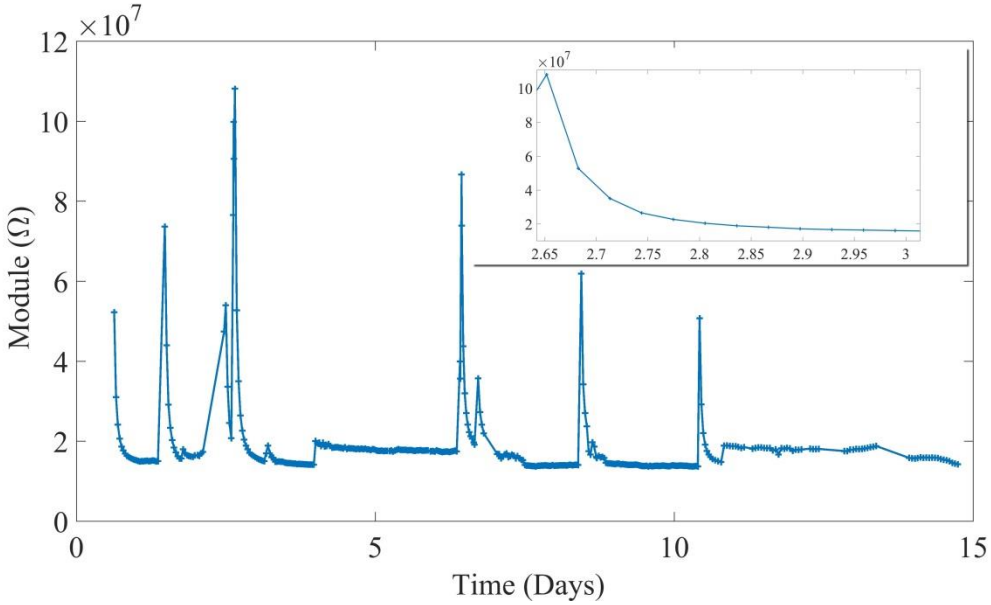

Figure 71 Module de l'impédance à 1 Hz en fonction du temps

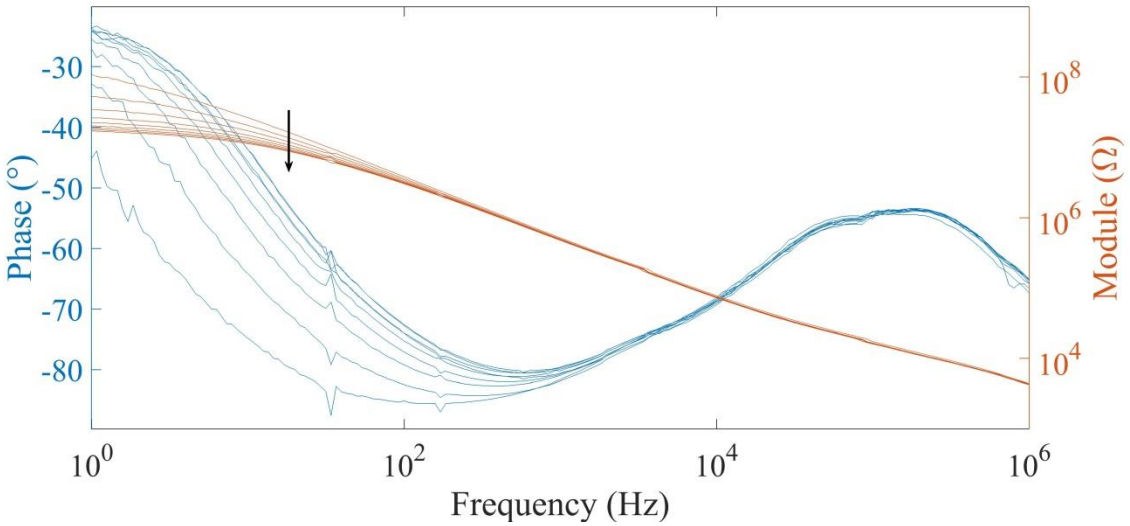

Figure 72 Variation de l'impédance à la suite d'une sortie de la MEA. La flèche indique le sens de variation des courbes du module après la reprise des mesures.

- Explication proposée pour le comportement parasite en basses fréquences (f < 100 Hz) : présence d'humidité dans l'incubateur

L'explication proposée pour ce phénomène est la suivante. Quand on ouvre l'incubateur, l'humidité relative à l'intérieur décroit brusquement. De plus, si l'on sort la MEA pour prendre des photos ou changer le milieu de culture, le film d'eau présent à sa surface se vaporise. Il en va de même pour le support présent dans l'incubateur puisque l'humidité relative dans celui-ci est alors faible. Quand la MEA est replacée dans l'incubateur, il y a un délai avant que le réservoir d'eau liquide ne se vaporise à nouveau en partie ce qui provoque l'augmentation de l'humidité relative dans l'incubateur. Un film d'eau liquide se forme à nouveau sur les plots de la MEA ainsi que sur le support. Ce film d'eau court-circuite l'électrode de mesure et la référence de la MEA ce qui provoque le comportement observé en basses fréquences. Ce court-circuit se fait via les électrodes que constituent les surfaces métalliques des pins et plots de contacts. Ainsi si on mesure l'impédance à des fréquences aussi basses que 1 mHz (Figure 73) on observe une reprise d'un comportement capacitif compatible avec cette interprétation. En revanche une mesure en si basse fréquence n'est pas applicable en routine car celle-ci s'étend sur une durée de 2h45min qui s'explique par les très basses fréquences observées.

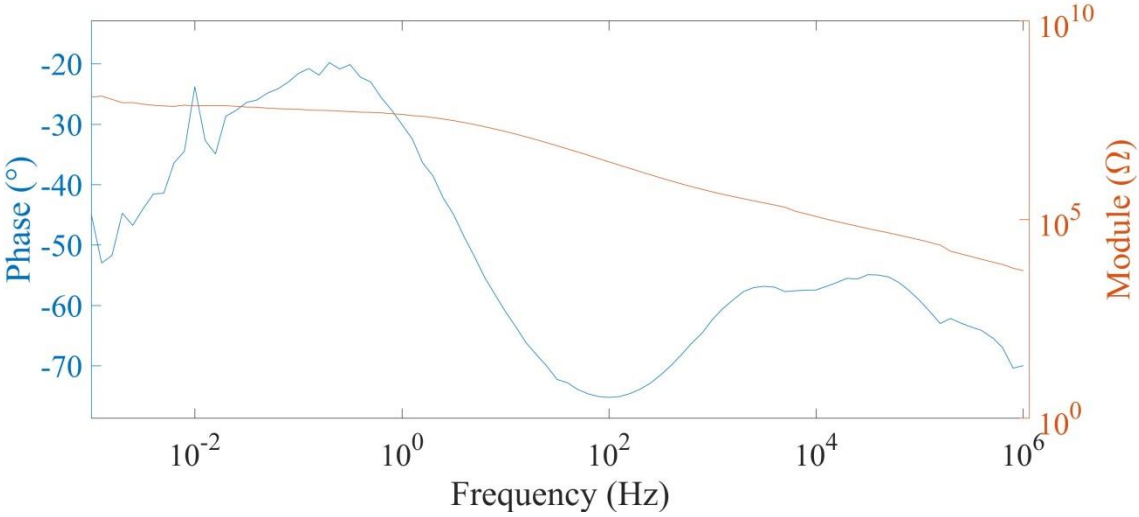

Figure 73 Diagramme de Bode d'une mesure d'impédance de 1 mHz à 1 MHz

La Figure 74 est le résultat d'une erreur qu'il est toutefois intéressant de présenter. Au jour 0 une MEA avec du milieu de culture (sans cellules) est placée dans l'incubateur et les mesures commencent. Le module de l'impédance à 1 Hz décroit pour atteindre une valeur stable. Cependant le réservoir d'eau de l'incubateur avait un niveau critique et s'est rapidement retrouvé vide. Le niveau d'humidité de l'incubateur a donc chuté et on observe à partir du repère 1 une augmentation de l'impédance à 1 Hz. Le module de l'impédance à 1 MHz qui représente plutôt la résistance du milieu de culture reste stable. Au niveau du repère 2 le module de l'impédance en basse fréquence a retrouvé un niveau équivalent à celui du début de l'expérience signe que le niveau d'humidité est à son minimum. A 1 MHz le module a une valeur légèrement inférieure à la valeur initiale car la concentration en espèces ioniques du milieu a augmenté, ce qui augmente la conductivité de celui-ci. Au repère 3 le milieu s'est à son tour évaporé et le module de l'impédance à 1 MHz est mesuré à une valeur élevée. La MEA est alors nettoyée et le milieu de culture remplacé tout comme le réservoir d'eau de l'incubateur et on retrouve des valeurs proches de celles initialement mesurées (repère 4).

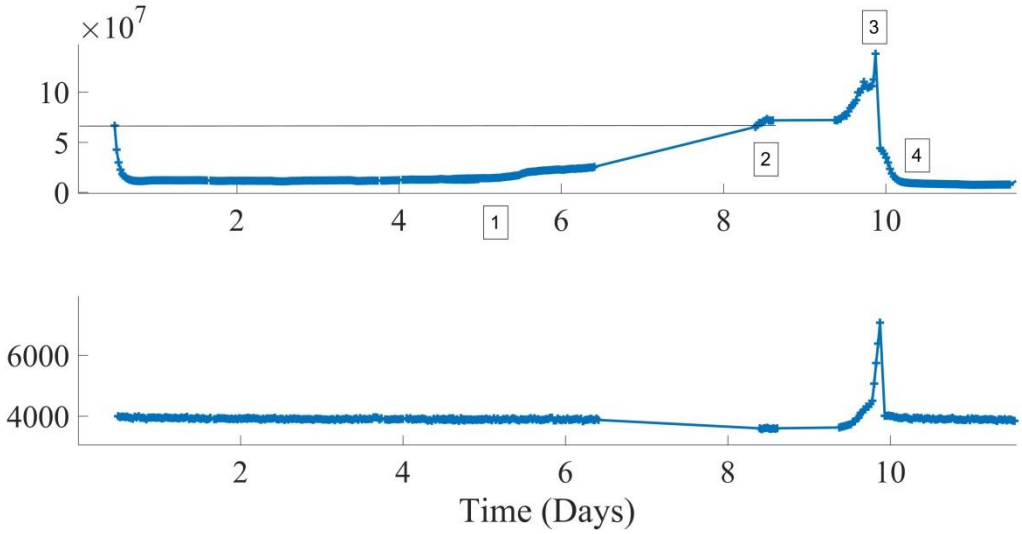

Figure 74 Module de l'impédance à 1 Hz (haut) et 1 MHz (bas) en fonction du temps

Pour conclure, on vérifie que ce comportement est également présent si l'on ne place pas de MEA dans le support et que celui-ci est simplement refermé à vide comme c'est le cas dans la Figure 75. Le support utilisé dans cette figure n'est par contre pas exactement le même que celui utilisé pour les mesures précédentes car il s'agit cette fois du support spécialement conçu pour les dispositifs fabriqués durant la thèse. Toutefois sa structure est très fortement similaire à celui utilisé pour les MEA commerciales (utilisation de pointes à ressort).

Dans la suite la résistance « parasite » inclut cet effet résistif.

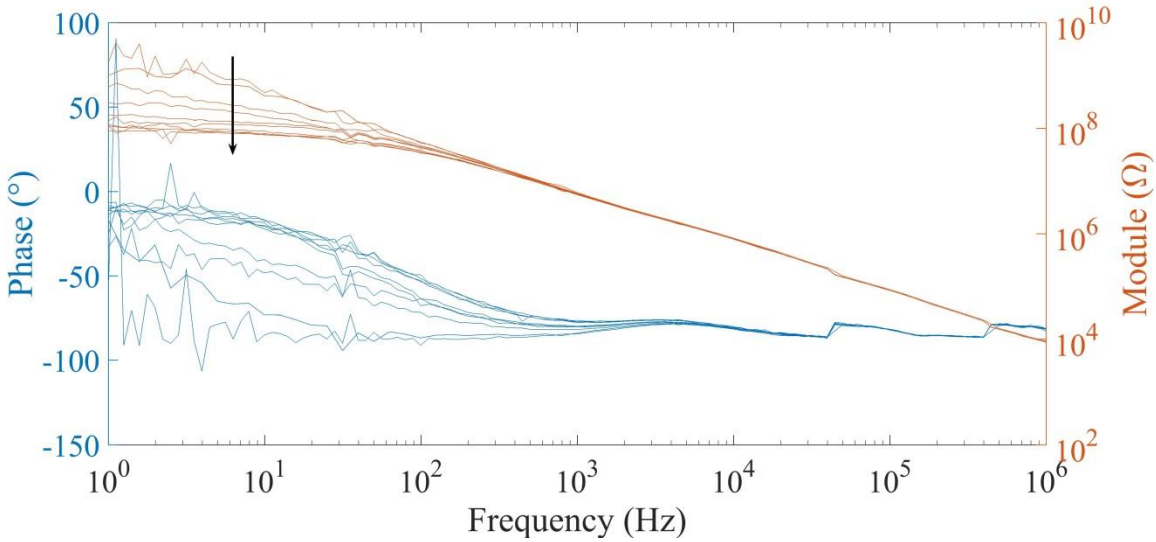

Figure 75 Variation de l'impédance du support à vide La flèche indique le sens de variation des courbes du module après la reprise des mesures.

2. Le modèle électrique utilisé

Différents modèles de représentation du tapis cellulaire sont envisageables. On associe tout d'abord un élément à constante de phase aux membranes cellulaires, de manière analogue à la surface de l'électrode, et pour représenter le fait que la capacité associée à chacune d'entre elles est distribuée dans le tapis cellulaire. Cette distribution se fait aussi bien en série dans le plan (le long d'un chemin entre électrode et électrode de référence) qu'en parallèle perpendiculairement au plan (le long d'un chemin parallèle au contour de l'électrode). On admet ici que la combinaison d'une distribution des capacités membranaires en série et en parallèle produisent ensemble un comportement d'élément à constante de phase, partant du principe que ces deux distributions prises séparément y sont associées telle que présenté dans [64]. On fait donc l'hypothèse implicite que cette distribution est log-normale. On associe par ailleurs différentes résistances, au milieu intracellulaire et au milieu extracellulaire (milieu de culture) ainsi qu'à la résistance membranaire. Comme la culture se fait sur un plan, on distingue le chemin perpendiculaire au plan des électrodes, qui permet d'atteindre le milieu de culture (milieu extracellulaire) du chemin parallèle à celui-ci qui fait apparaitre le milieu intracellulaire.

Les Figure 76 et Figure 77 font apparaitre deux vues d'un tapis cellulaire où sont représentés les différents éléments.

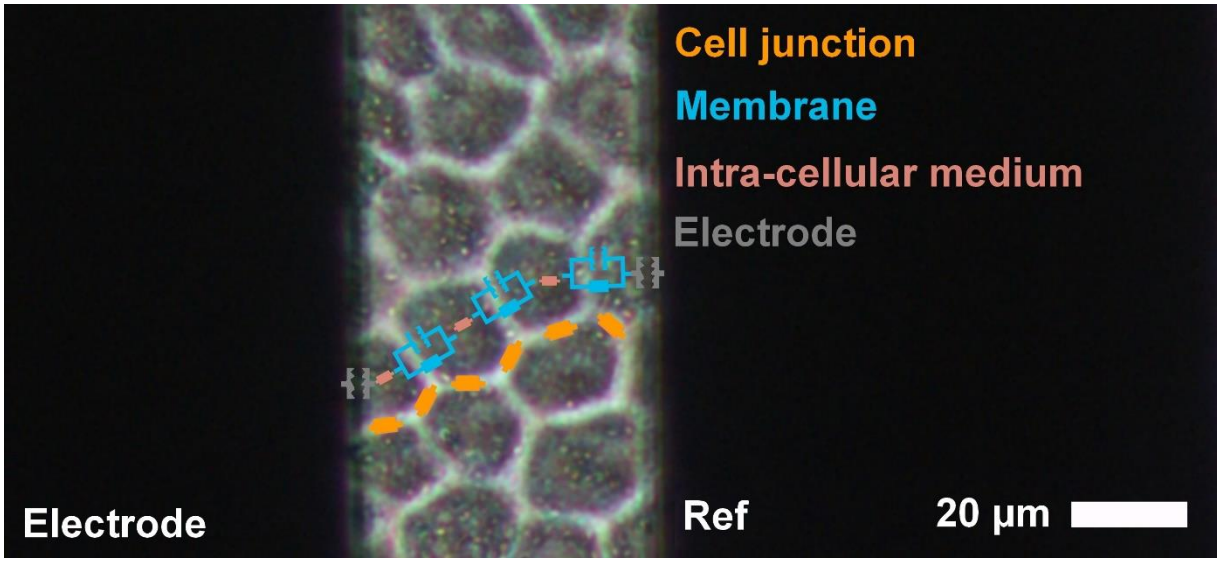

Figure 76 Modèle électrique faisant apparaitre les éléments dans le plan pour un tapis de cellules RPE

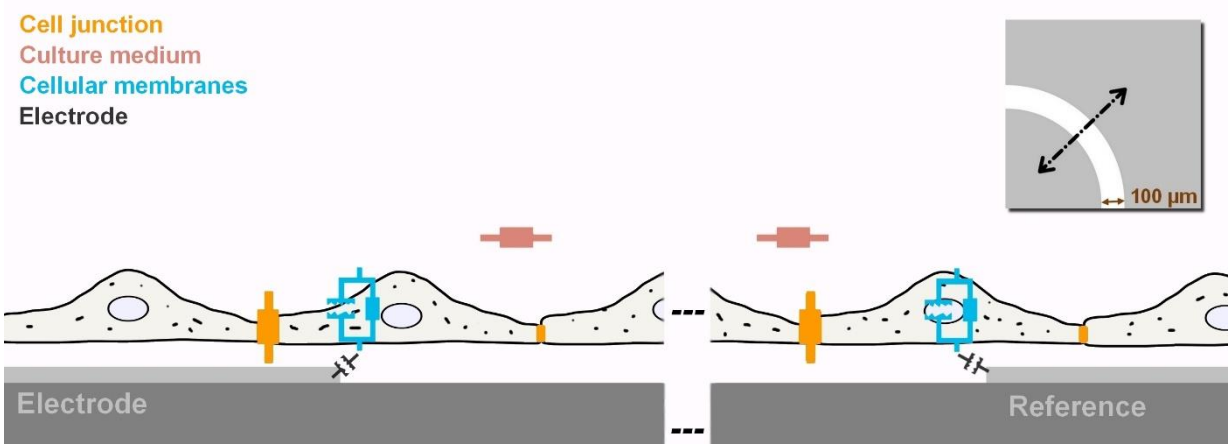

Figure 77 Modèle électrique faisant apparaitre les éléments perpendiculaires au plan pour un tapis de cellules RPE

Pour un tapis cellulaire couvrant des électrodes, le modèle le plus général faisant intervenir ces éléments dans le cadre des hypothèses mentionnées est celui de la Figure 78 (pour un modèle électrique de l'interface électrode électrolyte sans réactions électrochimiques).

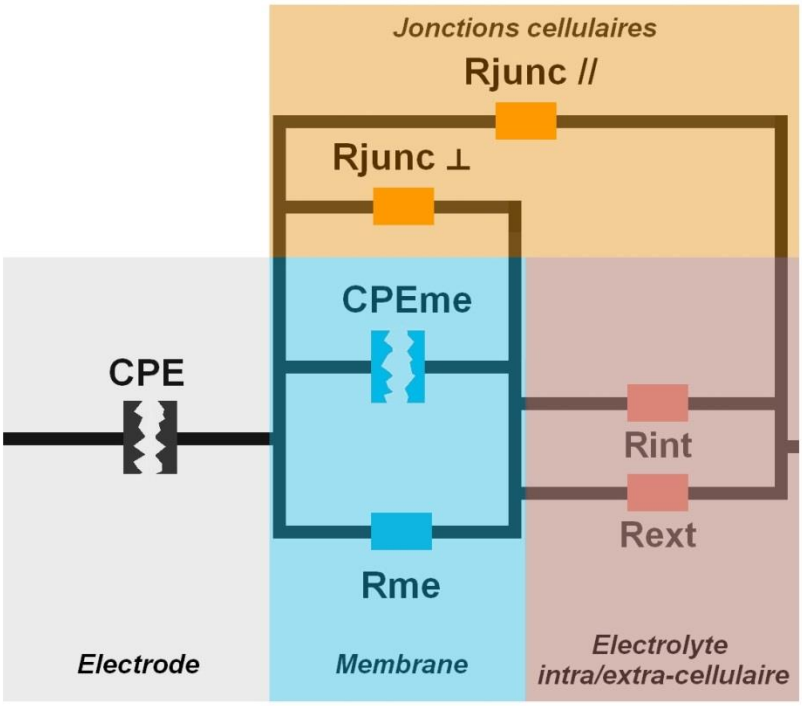

Figure 78 Modèle de circuit électrique général pour un tapis de cellules couvrant des électrodes. R_{me} : résistance des membranes, R_{junc} : résistance des jonctions (perpendiculairement au tapis cellulaire comme représenté dans la Figure 77 ou parallèlement à celui-ci comme représenté dans la Figure 76). R_{ext} : résistance du milieu extracellulaire (milieu de culture), R_{int} : résistance du milieu intracellulaire, CPE : Elément à constante de phase associé à l'interface électrode-électrolyte, CPEme : élément à constante de phase associé aux membranes cellulaires.

Ce modèle fait intervenir de nombreux éléments. Ceci implique que les fréquences de relaxations dépendent de nombreuses variables du système. Cependant sous certaines hypothèses on peut simplifier ce modèle.

- Tout d'abord au niveau des milieux intra et extracellulaires : la résistance associée au milieu intracellulaire existe dans un volume très faible (une couche de quelques µm d'épaisseur) et est associée à une conductivité de l'ordre de 0.2 S/m. D'autre part la

résistance extracellulaire au-dessus du tapis cellulaire est plus faible puisqu'elle est associée à un volume de milieu plus grand et à une conductivité plus grande (de l'ordre de 1.5 S/m). En haute fréquence, quand toutes les capacités sont court-circuitées, on mesure donc une combinaison en parallèle des milieux intra et extracellulaires dans laquelle on peut raisonnablement penser que ce dernier prend une part plus importante. On va donc considérer qu'on peut négliger R_{int} devant R_{ext} et donc remplacer les résistances R_{int} et R_{ext} (en parallèles) par une seule résistance qui est celle du milieu de culture et qui correspond de manière prépondérante à R_{ext}. On note celle-ci R_{med} et on considère donc $R_{med} = R_{ext}$. Dans les chapitre 1 et 2 on faisait référence à cette résistance sous le terme R_e puisqu'on s'intéressait à l'électrolyte de manière générale, l'électrolyte étant maintenant spécifiquement associé au milieu de culture utilisé.

- Au niveau des jonctions cellulaires : Pour les cellules RPE qui sont étudiées ici, les jonctions entre cellules sont dites « serrées ». Le milieu ionique intercellulaire est donc réduit au minimum. La résistance associée est déjà grande puisqu'elle est associée à la bicouche lipidique, et d'autant plus que le chemin dans la jonction augmente. On peut donc négliger la résistance des jonctions parallèlement au plan devant les autres résistances en parallèle de celle-ci. La seule résistance relative aux jonctions restante est donc celle perpendiculaire au plan du tapis cellulaire comme représenté dans la Figure 77. Dans la suite on omet de préciser la direction de la résistance de jonctions observée et on fera référence à R_{junc} pour désigner la résistance de jonctions perpendiculairement au plan. La Figure 79 montre les simplifications réalisées dans le modèle.

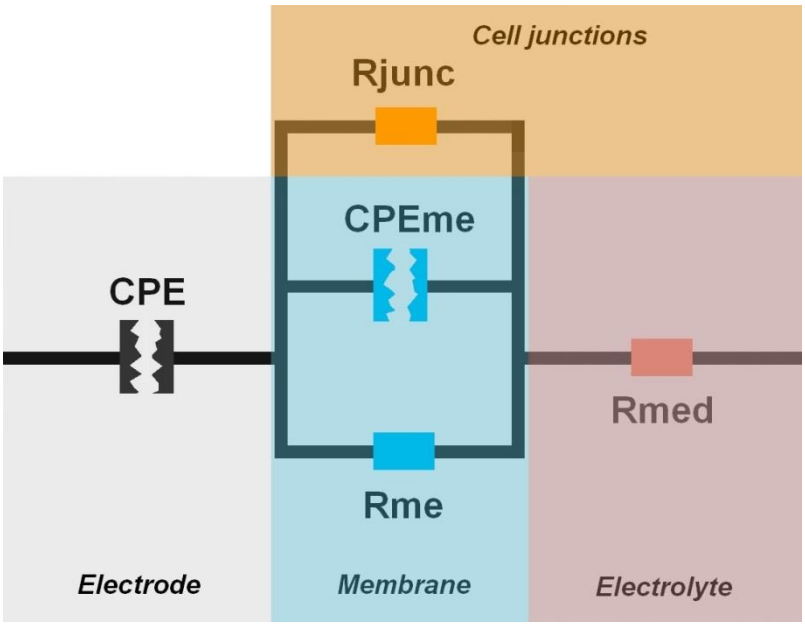

Figure 79 Simplification du modèle électrique utilisé. R_{med} : résistance du milieu extracellulaire (milieu de culture).

A ce stade, on ne peut plus simplifier le modèle. En effet, la résistance des membranes n'a pas une valeur aussi importante qu'on pourrait l'imaginer. Dans [100] les auteurs présentent, pour différents types de cellules, des conductances de l'ordre de 100 à 900 S/m², soit de 1100 à 10000 $\Omega.mm^2$. Cette plage de valeur contient l'ordre de grandeur des valeurs de résistance mesurées qui seront présentées par la suite. Pour autant, la résistance associée aux jonctions est aussi présente et peut varier indépendamment comme on le détaillera dans le chapitre suivant. Comme les ordres de grandeur sont proches on doit conserver ces deux résistances en parallèle dans le modèle.

En revanche la technique de mesure employée ne permet pas de mesurer indépendamment ces deux résistances puisqu'elles sont associées à la même fréquence de coupure, on proposera dans la suite des hypothèses sur la variation de l'une ou l'autre de ces résistances dans la résistance totale mesurée en fonction de l'état de croissance du tapis cellulaire ou de la perturbation appliquée. La résistance cellulaire totale, combinaison en parallèle de la contribution des membranes et des jonctions sera désignée R_{cell} dans la suite.

L'équation de l'impédance du circuit Figure 79 est donné par :

$$Z = \frac{1}{Q_{electrode}(j\omega)^{\alpha_{electrode}}} + \frac{R_{cell}}{1 + R_{cell}Q_{cell}(j\omega)^{\alpha_{cell}}} + R_{med}$$

Dans le Chapitre 2 on a mentionné la présence d'une capacité et d'une inductance parasite. Une résistance parasite qui contient notamment le phénomène de court-circuit présenté à la partie 1 est aussi présente. Ces éléments s'ajoutent au modèle tels que présenté dans la Figure 79 pour former la Figure 80. Une simulation est tracée dans la Figure 81 avec des valeurs issues d'une mesure du tapis cellulaire à confluence (traits forts). Chacune des impédances du modèle est également superposée au spectre global (traits fins). De cette façon, et particulièrement sur les courbes du module de l'impédance (rouge), on visualise bien qu'en basses fréquences c'est l'impédance de l'électrode qui domine. Quand la fréquence augmente on rencontre d'abord la résistance cellulaire (en plus de la résistance de l'électrolyte) suivie par l'impédance des membranes cellulaires. Enfin en hautes fréquences, l'impédance totale est dominée par la résistance du milieu de culture.

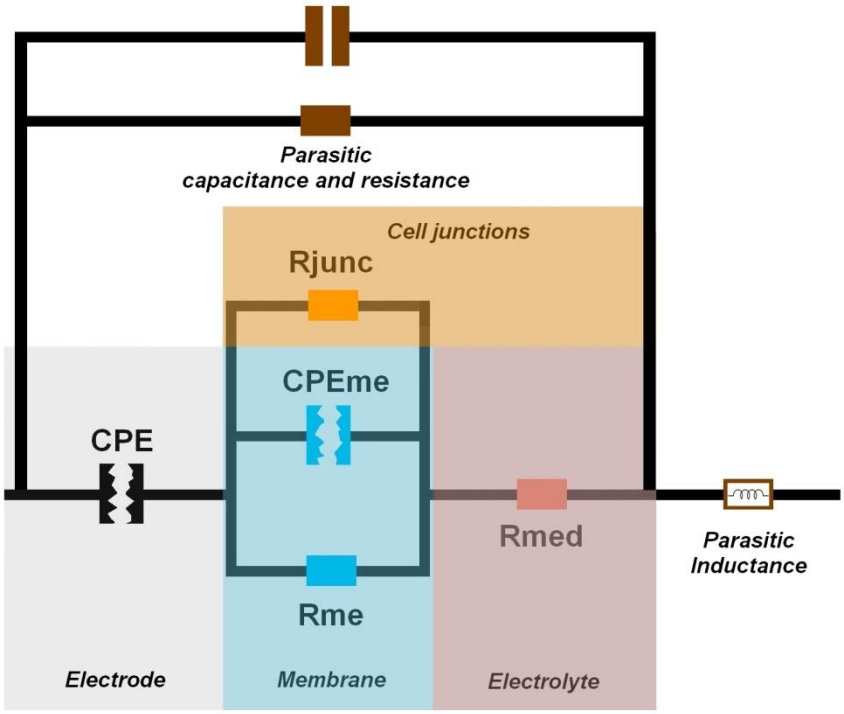

Figure 80 Modèle électrique utilisé avec impédances parasites

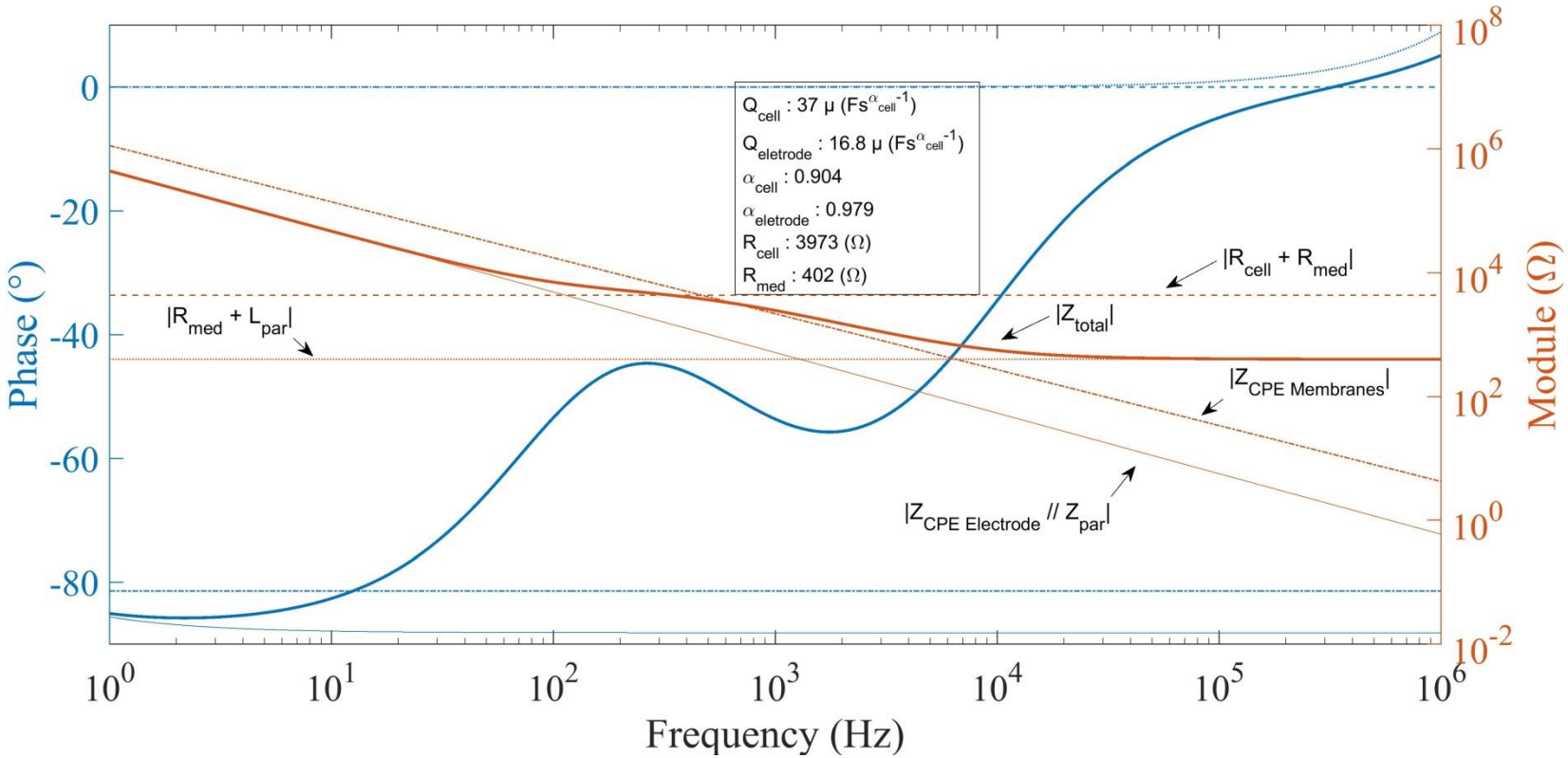

Figure 81 Simulation du spectre mesuré pour un tapis cellulaire à confluence sur une macroélectrode. Z_{par} représente la capacité et la résistance parasite en parallèle avec $R_{par} = 10\ M\Omega$, $C_{par} = 22\ pF$. $L_{par} = 10\ \mu H$ est l'inductance parasite en série.

3. Mesures sur la première série de dispositifs

3.1. Croissance du tapis cellulaire sur les électrodes

On présente ici les mesures sur les 3 électrodes citées précédemment. Toutes les mesures ici sont issues de cultures réalisées dans du DMEM contenant 20 % de sérum de veau fœtal. Le milieu est changé au troisième jour de la culture. Les phénomènes de saut aux moments des changements de calibre du potentiostat sont corrigés pour les deux plus petites électrodes, comme présenté partie 1. Ceci n'est pas ou peu visible pour l'électrode de 2430 µm et la correction n'est donc pas appliquée.

- Croissance sur électrode de 30 µm

Une croissance sur une électrode de 30 µm est présentée dans les Figure 82 et Figure 83. La passivation semble stable sur 3 jours dans la mesure du champ d'observation des photos Figure 83. La variation du module de l'impédance en hautes fréquences est à rapprocher de ce qui est observé dans la Figure 68 où la croissance cellulaire apparait dans une bande de fréquence similaire. On a en effet dans les deux cas une électrode de 30 µm de diamètre et une électrode de référence à environ 200 µm de l'électrode. Ceci, en association avec ce qui a été présenté dans le Chapitre 2, où aucune cellule n'étaient présente, permet de dire que l'évolution du module en basses fréquences sur la Figure 82 n'est pas interprétable en termes de croissance cellulaire sans que l'on puisse pour autant l'associer à un défaut de passivation avec certitude, vu les images observées.

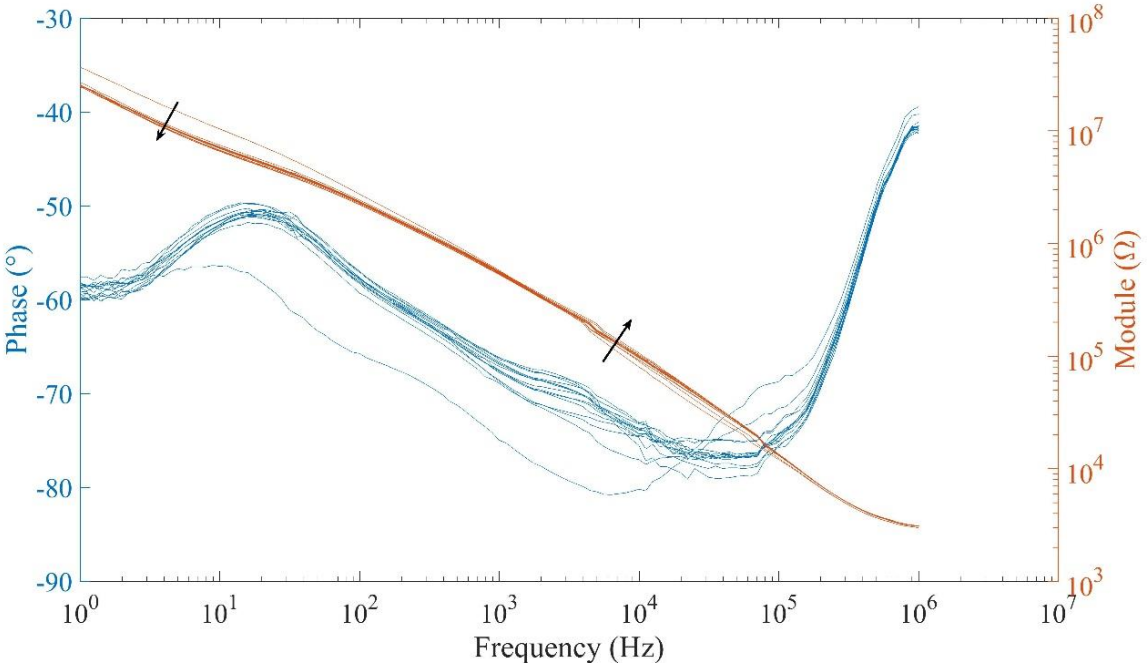

Figure 82 Evolution du diagramme de Bode durant la croissance des cellules sur une électrode de 30 µm de diamètre. Les flèches indiquent l'évolution du module de l'impédance du jour 0 jusqu'au milieu du jour 2.

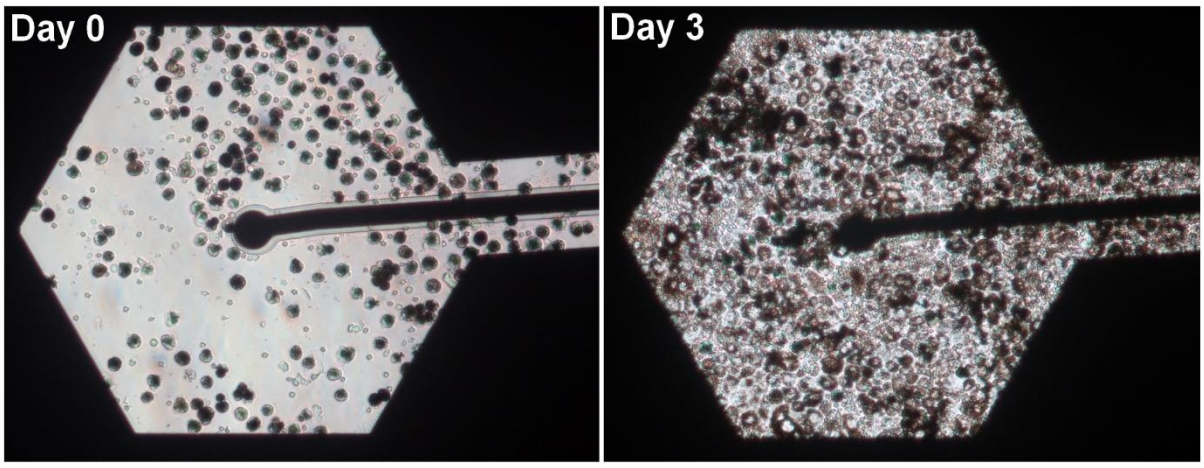

Figure 83 Photos de la croissance sur une électrode de 30 µm de diamètre

- Croissance sur électrode de 2430 µm

On va ensuite présenter les résultats de croissance sur la macroélectrode de 2430 µm. Ce sont les mesures les plus distinctes et révélatrices de possibles étapes durant la croissance cellulaire. Les mesures sur l'électrode de 270 µm seront donc ensuite interprétées en regard de celles-ci.

La Figure 84 montre l'évolution des cellules au cours de la culture. Le défaut de fabrication présent dans la partie droite de chaque image ne représente pas plus de 1.3 % de la surface totale de l'électrode et n'évolue pas. Il sera donc négligé. Au jour 0, c'est-à-dire peu de temps après l'ensemencement, les cellules ont un aspect plutôt rond puisqu'elles n'ont pas encore complétement adhéré à la surface. Puis on observe que dès le 6ème jour le tapis cellulaire semble couvrir l'électrode (en partant du principe que l'ensemencement a été homogène).

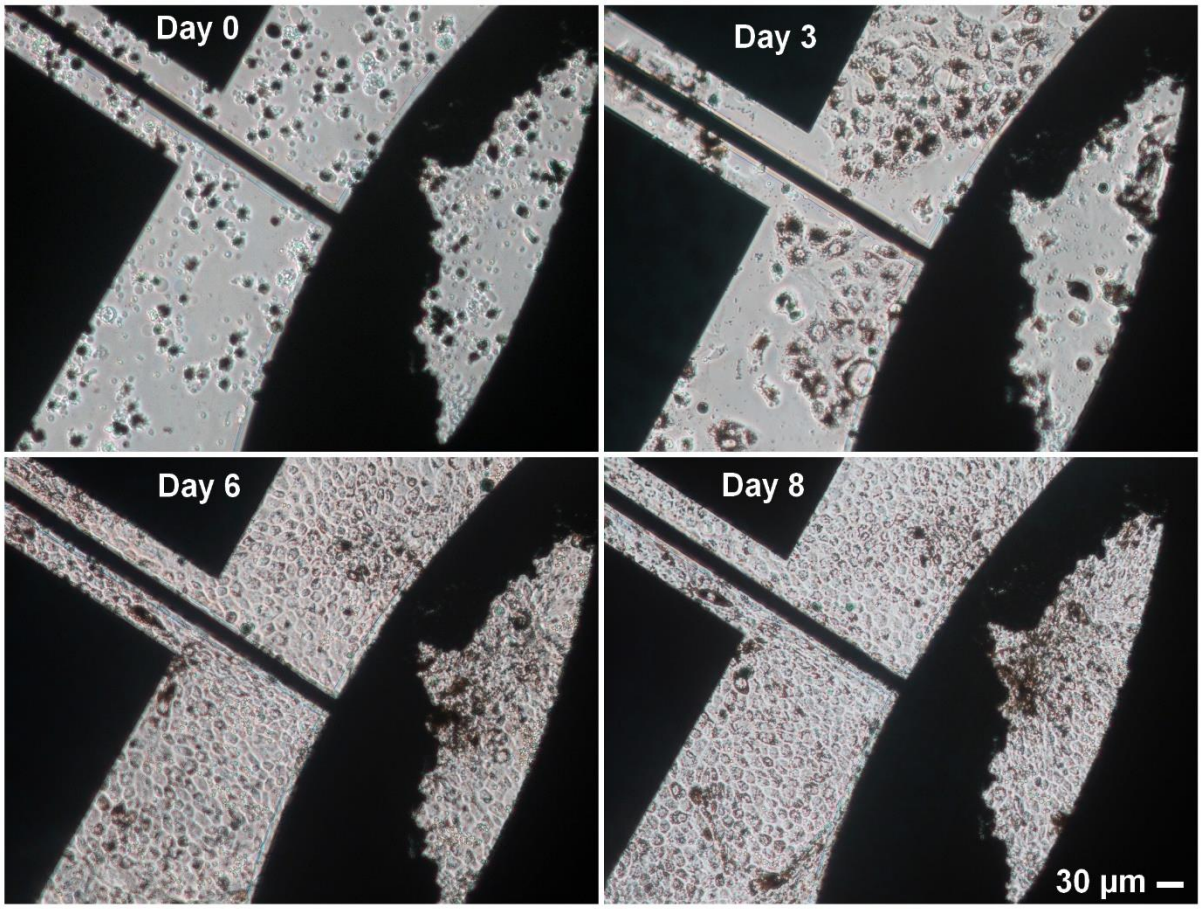

Figure 84 Evolution de la culture cellulaire sur une électrode de 2430 µm de diamètre. Le défaut de fabrication dans la surface de l'électrode représente moins de 1.3 % de la surface totale de celle-ci.

En ce qui concerne les mesures d'impédance, en observant les spectres on peut diviser la croissance en deux étapes. La première correspond à la Figure 85 pour laquelle les 53 spectres s'étendent du jour 0 (16h21) au jour 5 (14h40). Les flèches indiquent le sens de variation des

différentes courbes. La courbe du module évolue à la fois vers le haut et vers la droite comme représenté par les deux flèches.

La deuxième étape est présentée dans la Figure 86. Ici les 27 spectres s'étendent du jour 5 (16h38) au jour 8 (8h15). Dans cette phase la courbe du module évolue toujours vers le haut mais l'évolution vers la droite ralentit avant d'évoluer légèrement vers la gauche comme indiqué par les flèches. On peut mettre en regard ceci avec la Figure 81 où on représente les différentes parties du modèle. Si on se place à une fréquence entre 500 Hz et 1 KHz environ, le module de l'impédance représente préférentiellement la résistance cellulaire. Si l'on se place à une fréquence entre 2 KHz et 10 KHz celui-ci représente préférentiellement les membranes cellulaires. Mais dans tous les cas on n'a qu'une information partielle car on se place à une fréquence fixe et il y a ambiguïté sur le choix de ces fréquences.

On peut néanmoins interpréter la croissance comme une évolution monotone du paramètre de résistance cellulaire contrairement à celui des membranes cellulaires.

Toutefois le point de séparation entre les Figure 85 et Figure 86 est déterminé de manière graphique et arbitraire. Nous reviendrons sur ce point quand les modèles électriques seront appliqués aux mesures de la croissance puis aux perturbations du tapis cellulaire dans les parties suivantes.

La croissance entre le jour 0 et le jour 8 est représentée dans la Figure 87. Pour une meilleure visibilité la première étape (qui correspond à la Figure 85) est représentée en couleurs alors que la deuxième étape (qui correspond à la Figure 86) est représentée en niveaux de gris.

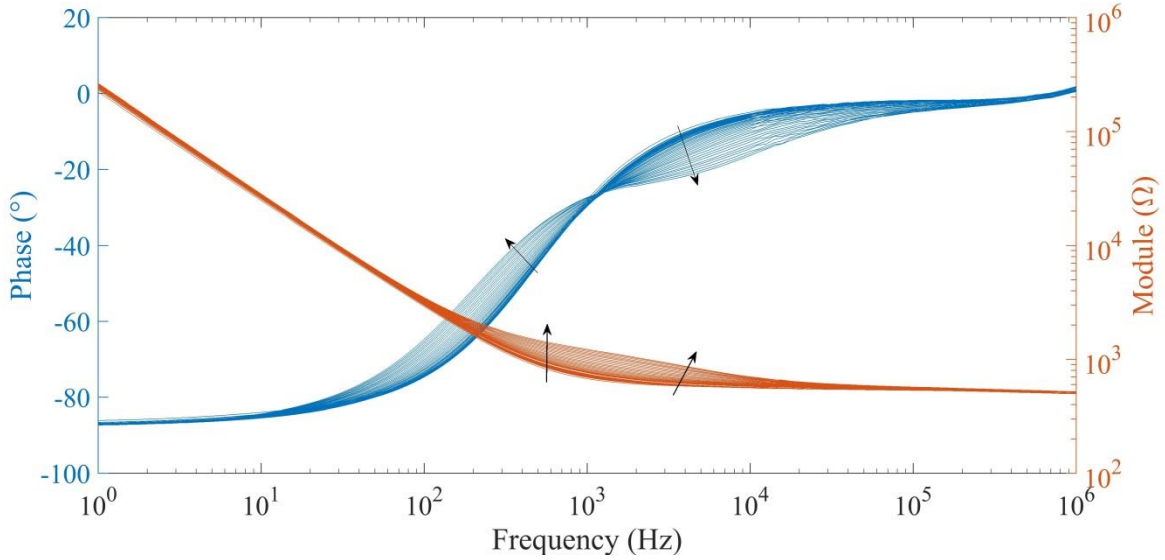

Figure 85 Evolution du spectre mesuré durant la croissance cellulaire sur une électrode de 2430 µm de diamètre entre le jour 0 et le jour 5.

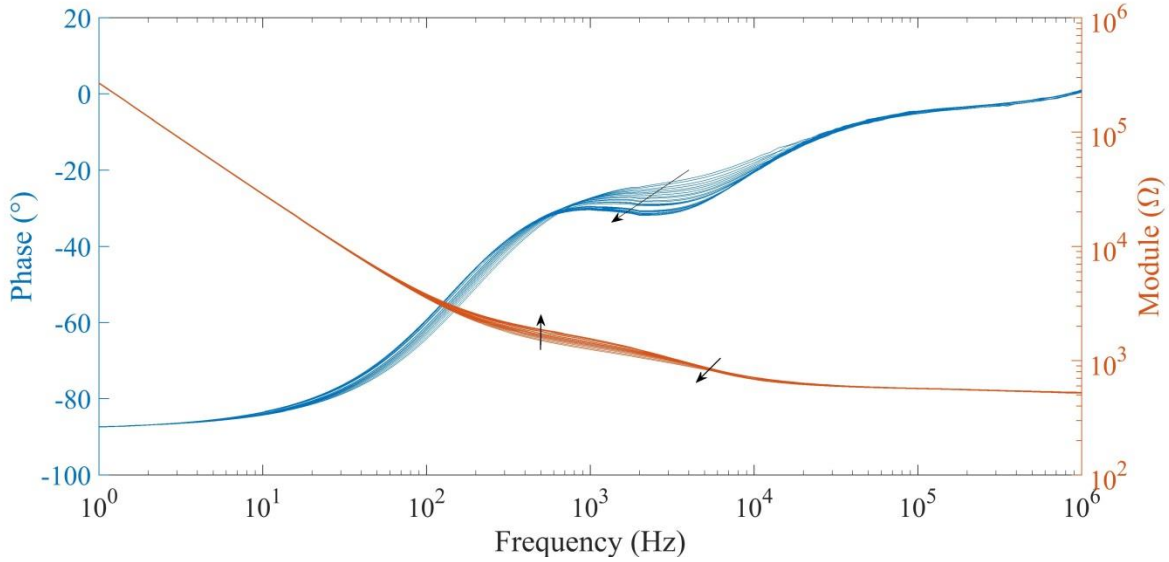

Figure 86 Evolution du spectre mesuré durant la croissance cellulaire sur une électrode de 2430 µm de diamètre entre le jour 5 et le jour 8.

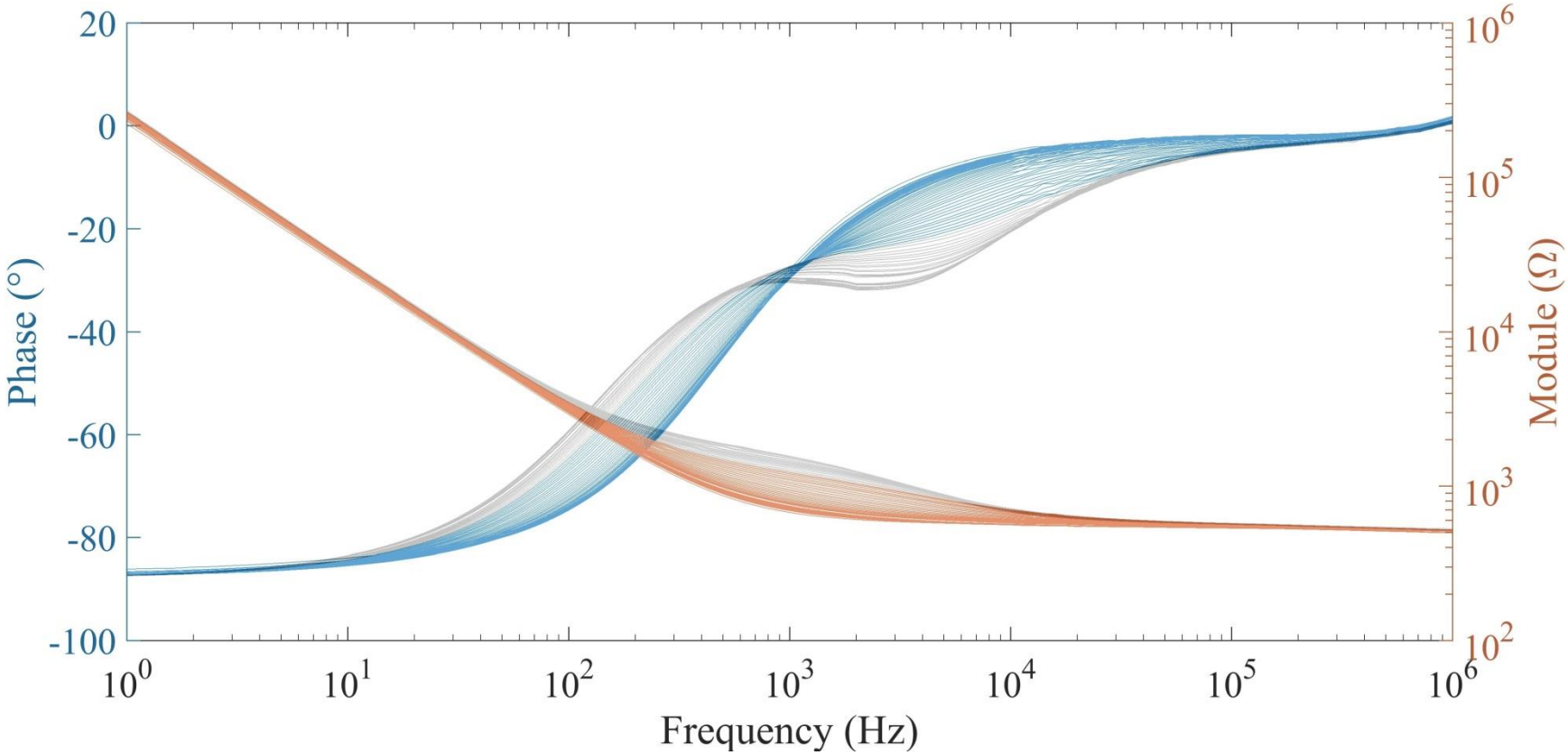

Figure 87 Evolution du spectre mesuré durant la croissance cellulaire sur une électrode de 2430 µm de diamètre entre le jour 0 et le jour 5 (couleur) puis entre le jour 5 et le jour 8 (gris).

- Croissance sur électrode de 270 µm

La croissance sur l'électrode de 270 µm montre un comportement similaire comme représenté dans la Figure 90. Par contre cette fois la première étape (Figure 89) a lieu du jour 0 (16h31) au jour 4 (3h25) et la seconde (Figure 90) du jour 4 au jour 8 (8h24). La durée plus courte pour atteindre la deuxième étape (environ 37h de moins par rapport à l'électrode de 2430 µm) dans le cas de l'électrode de 270 µm amène à penser que la première étape correspond à une phase de croissance où les cellules se développent avant que leur croissance ne ralentisse et qu'elles entrent dans une phase de maturation durant la deuxième étape. Ceci est compatible avec les images de l'électrode de 270 µm (Figure 91) où la confluence semble avoir été atteinte entre le jour 3 et le jour 6. Cependant les hypothèses sur les caractéristiques du tapis cellulaire et les points de transition qui caractérisent celui-ci seront discutées par la suite. On préfère en effet effectuer l'analyse détaillée de la croissance cellulaire sur une électrode identique à celle utilisée pour les essais de perturbations réalisées sur la seconde série de dispositifs.

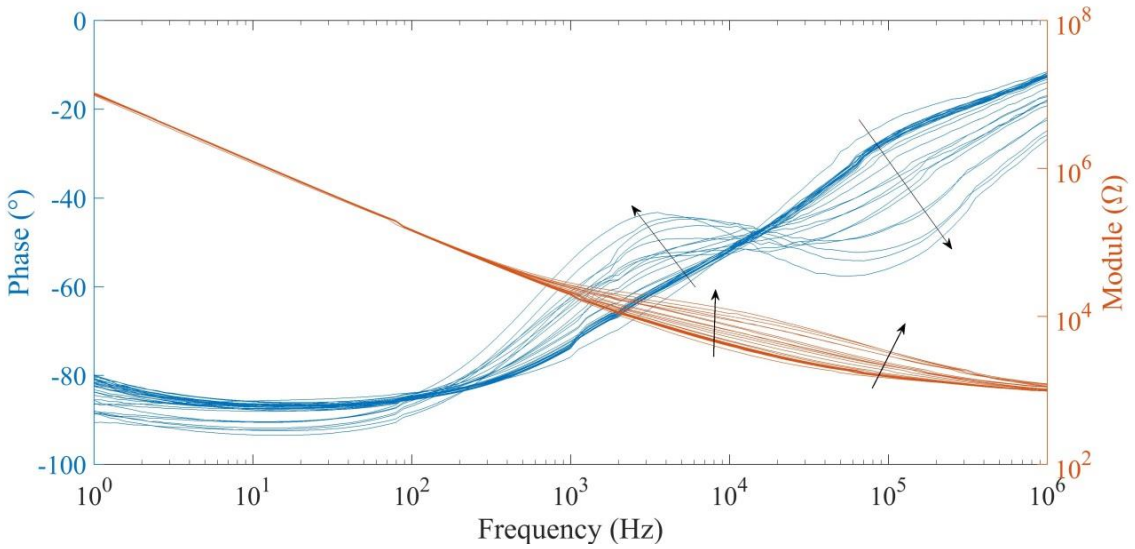

Figure 88 Evolution du spectre mesuré durant la croissance cellulaire sur une électrode de 270 µm de diamètre entre le jour 0 et le jour 4.

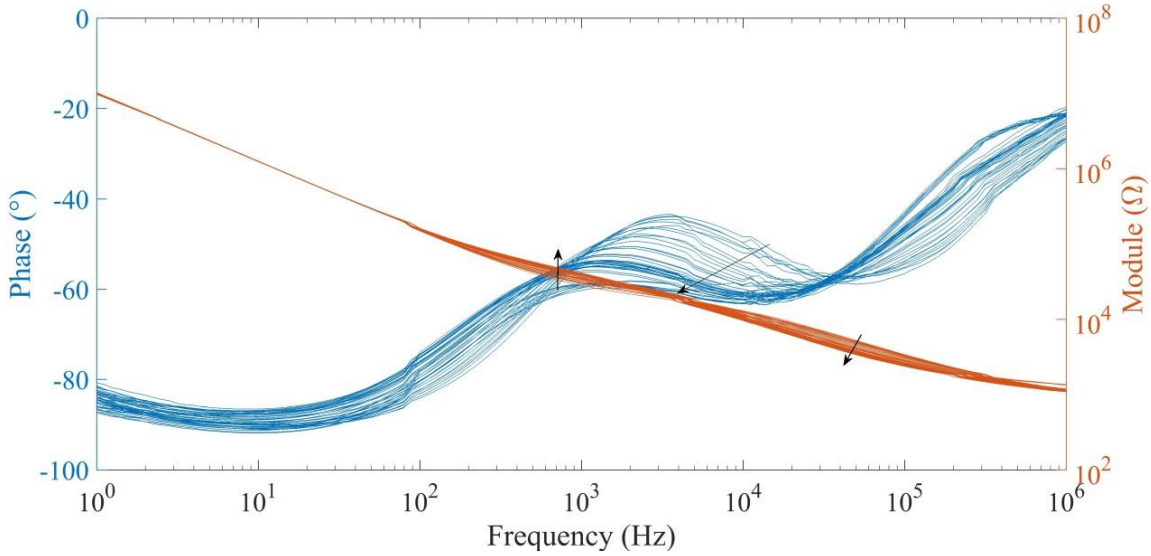

Figure 89 Evolution du spectre mesuré durant la croissance cellulaire sur une électrode de 270 µm de diamètre entre le jour 4 et le jour 8.

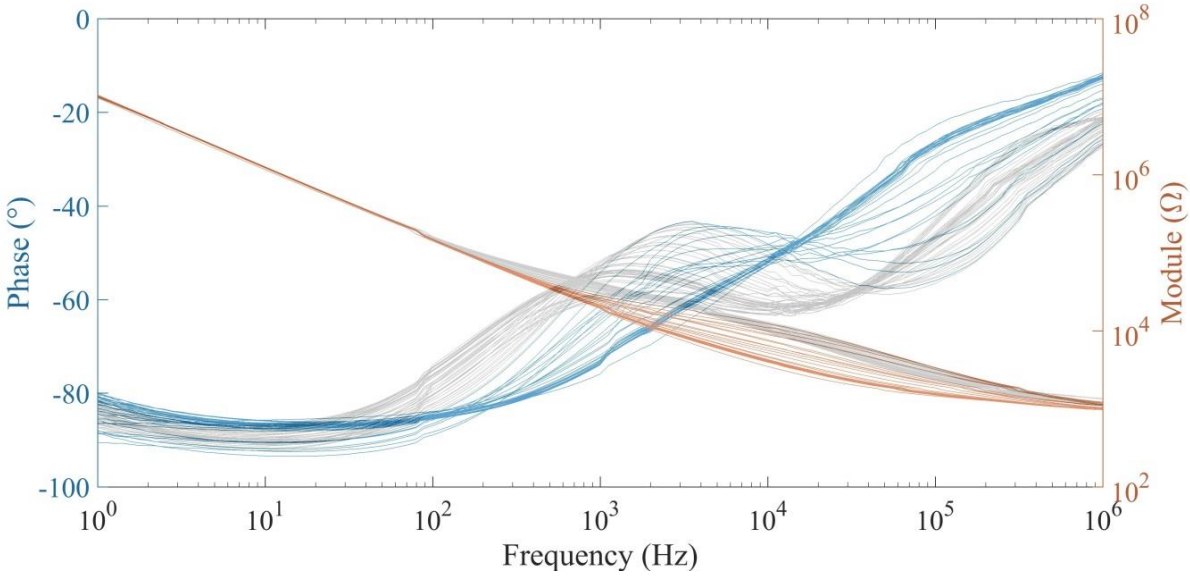

Figure 90 Evolution du spectre mesuré durant la croissance cellulaire sur une électrode de 270 µm de diamètre entre le jour 0 et le jour 4 (couleur) puis entre le jour 4 et le jour 8 (gris).

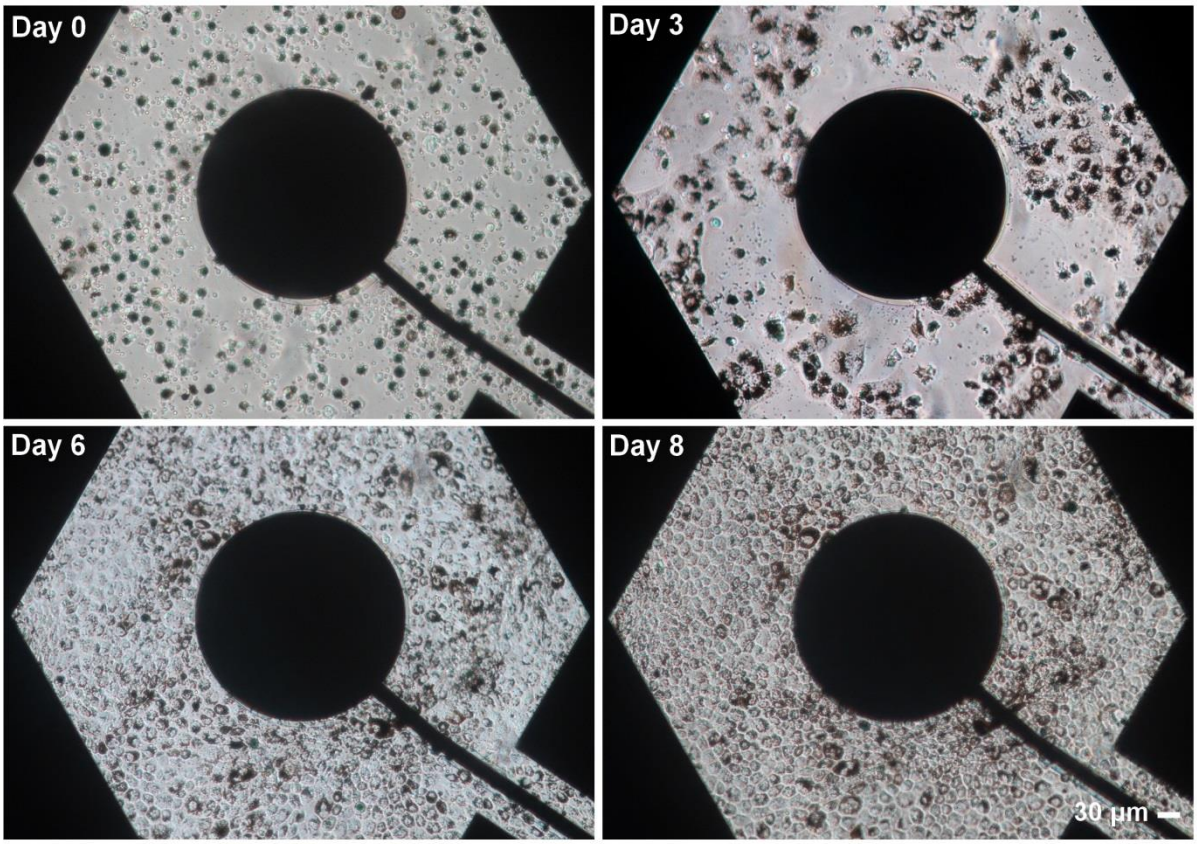

Figure 91 Evolution de la culture cellulaire sur une électrode de 270 µm de diamètre.

4. Mesures sur la seconde série de dispositifs

La Figure 92 montre une photo d'un quartier d'un dispositif de la seconde série. Trois électrodes sont à nouveau mesurées ici. Une électrode disque et deux électrodes peignes. Les deux types de peignes ont une longueur de 2200 µm. Le peigne de type 1, au milieu de l'image est constitué d'éléments qui ont une largeur de 100 µm et un espace inter-éléments de 50 µm. Le peigne de type 2, à gauche de l'image est identique au type 1 à la différence que l'espace inter-éléments est cette fois de 100 µm. L'électrode disque a une surface identique à celle du peigne de type 2 (2.78 mm^2) avec un diamètre de 1880 µm et une séparation de 100 µm avec l'électrode de référence. La surface de l'électrode peigne de type 1 est quant à elle légèrement inférieure (2.53 mm^2) mais reste du même ordre de grandeur puisque la longueur d'un élément est grande devant l'espace inter-éléments.

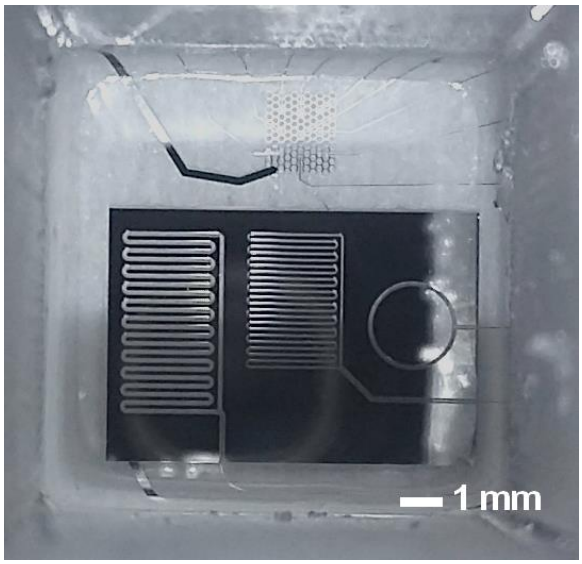

Figure 92 Photo d'un quartier pour une matrice de la seconde série.

La Figure 93 montre les spectres mesurés en présence de milieu DMEM avec 20 % de sérum de veau fœtal. En basse fréquence (< 100 Hz) le comportement est presque identique entre les différents types d'électrodes puisque leurs surfaces sont très proches. En hautes fréquences (> 100 KHz), la résistance varie de quelques centaines d'Ohms en fonctions du type d'électrode et de l'espace inter-électrodes.

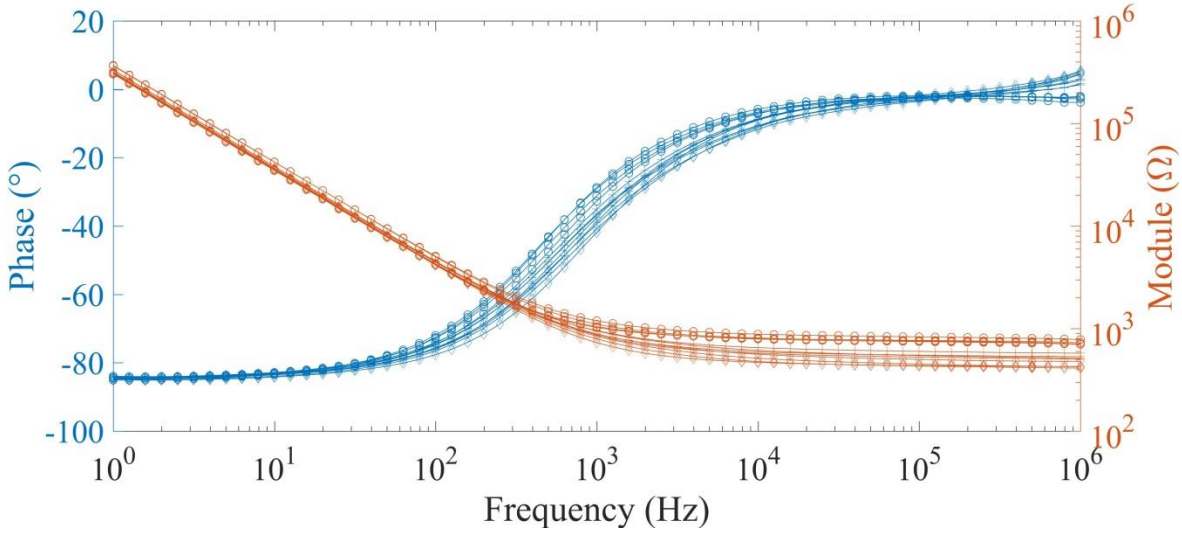

Figure 93 Spectres mesurés en présence de DMEM + 20 % SVF pour l'électrode disque (losanges), le peigne de type 1 (+) et le peigne de type 2 (o)

4.1. Croissance du tapis cellulaire sur électrode disque

Une croissance des cellules RPE sur la macroélectrode disque est présentée dans cette partie. Le milieu de culture utilisé est le DMEM avec 20 % de SVF. Les cellules sont ensemencées au jour 0 et le milieu est changé au jour 1 pour éliminer les cellules qui n'auraient pas adhéré à la surface. On va mettre en relation les spectres mesurés (tel que présenté dans la partie précédente) avec les paramètres du modèle extraits par un ajustement selon le critère des moindres carrés. A ce titre, on évalue tout d'abord la bonne association du modèle aux données présentées. La Figure 94 montre un spectre auquel on a ajusté le modèle introduit Figure 80. Dans les Figure 95 et Figure 96 on trace le maximum, sur la bande de fréquence [10 Hz, 100 KHz], de l'erreur sur le module et la phase entre données et modèle ajusté. On considère donc que le modèle est bien ajusté aux données sur toute la plage de mesures présentées ici. On peut toutefois noter que l'erreur augmente au court du temps avant de se stabiliser. Ceci est probablement dû au fait que dans les premiers jours de la culture, où les cellules sont moins présentes, le modèle possède plus de paramètre que nécessaire pour représenter mathématiquement les données.

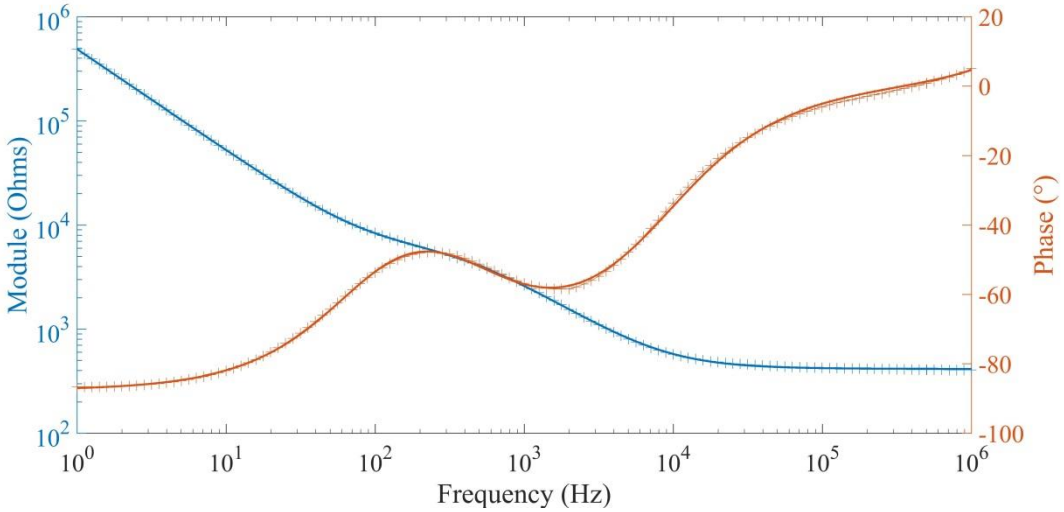

Figure 94 Données (traits fins avec +) et modèle ajusté (traits forts sans +) pour un spectre au jour 11, 4h43 (Jour 11.19). Le maximum de l'erreur sur le module est alors de 2.08 % et le maximum de l'erreur sur la phase de 1.14°

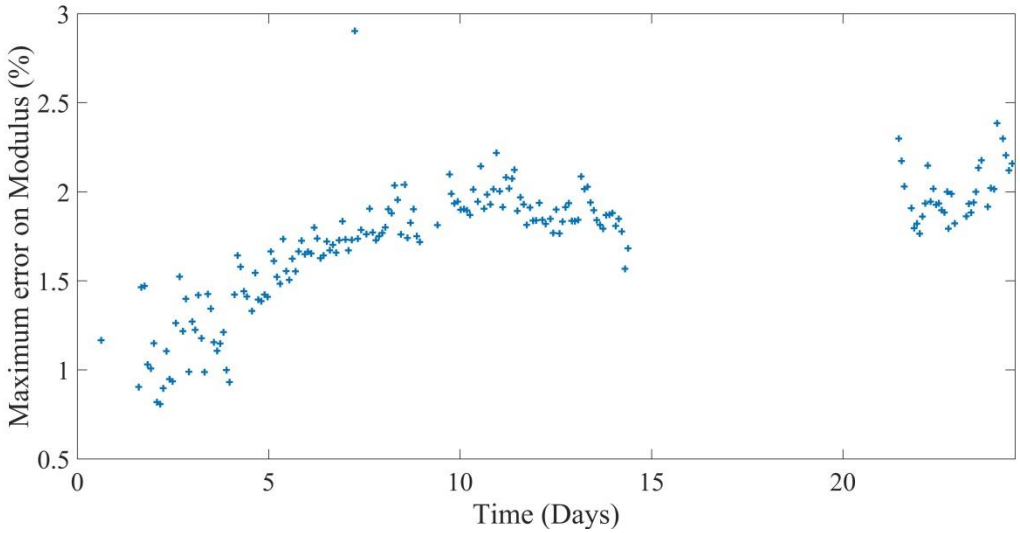

Figure 95 Maximum de l'erreur du module du modèle par rapport aux données (rapportée en pourcentage des données)

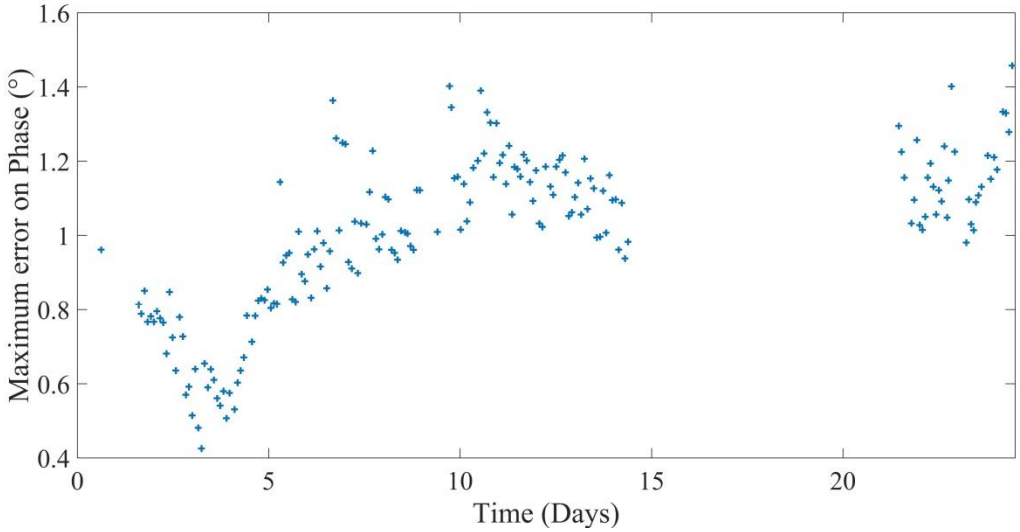

Figure 96 Maximum de l'erreur de la phase du modèle par rapport aux données (en valeur absolue)

La culture présentée ici était initialement prévue comme un témoin pour un essai d'exposition à la lumière bleu. C'est pour cette raison que du milieu de culture transparent a été utilisé, en association avec 10 % de sérum de veau fœtal à partir du 9ème jour. Cette version du DMEM ne contient pas de rouge de phénol, qui est simplement un indicateur de pH et n'a pas d'effet direct sur la croissance des cellules. La concentration réduite de sérum (10 % au lieu de 20 % en début de culture) est également mise en place dans le but de maintenir un milieu

transparent en considérant le fait que la culture étant à confluence, les facteurs de croissance présents dans le sérum sont moins nécessaires. La culture a également été éclairée par de la lumière bleu du 11ème au 15ème jour sans que son état n'en soit affecté. On montrera l'effet de la lumière bleu en présence d'un photo-sensibilisant dans le chapitre suivant.

L'évolution du spectre est analogue à ce qui a été vu dans la partie précédente pour la macroélectrode. On visualise bien les deux étapes présentées. Cette évolution est représentée dans la Figure 97.

Pour ne pas surcharger la figure on a uniquement représenté les 10 premiers jours.

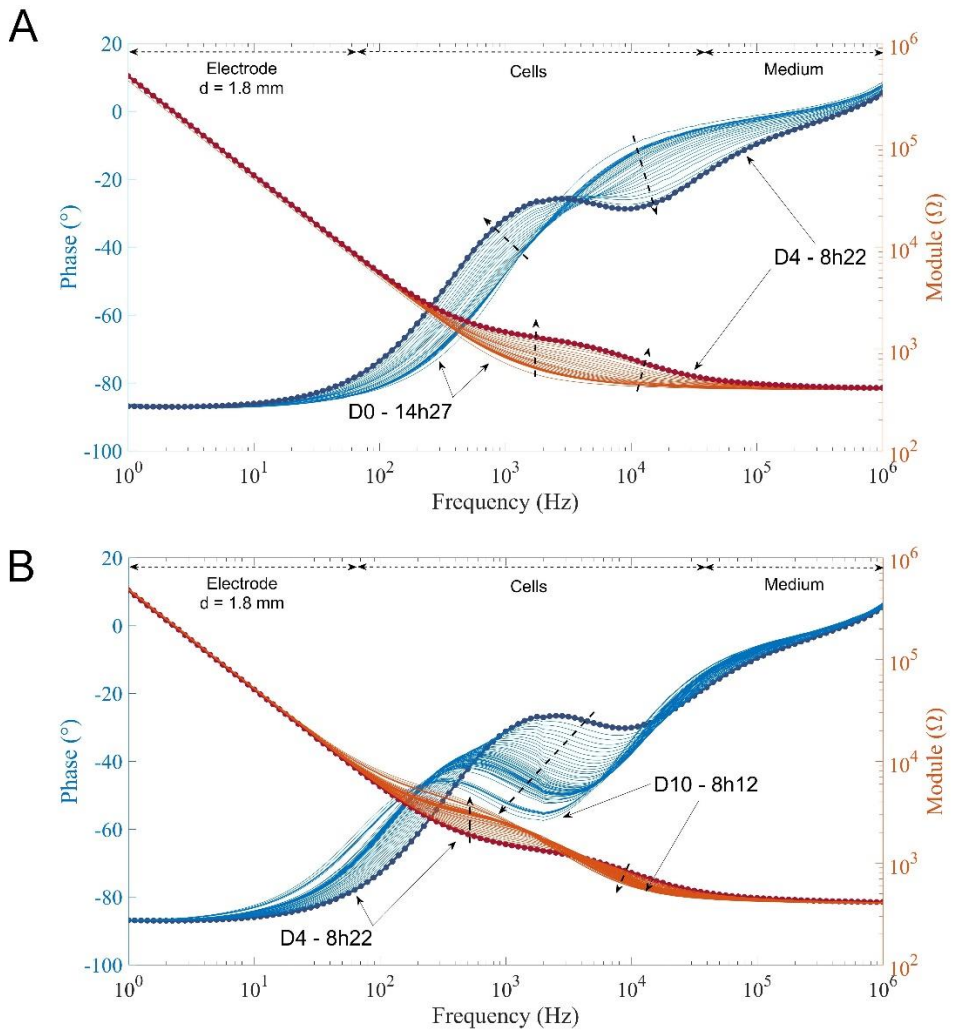

Figure 97 Spectres mesurés durant la croissance cellulaire sur l'électrode disque entre le jour 0 (14h57) et le jour 4 (8h22) (A), puis entre le jour 4 (8h22) et le jour 10 (8h12), (B). Le spectre qui contient les marqueurs • a lieu à la transition entre A et B. Les flèches pointillées indiquent l'évolution des spectres avec le temps.

Dans les Figure 99 et Figure 98 on montre les trois paramètres relatifs au tapis cellulaire du modèle présenté Figure 80. Sur la Figure 99 le maximum du paramètre $^{1}/_{Q_{cell}}$ a lieu au jour 6 à 4h39. C'est environ 48h après le point de séparation entre les deux étapes de croissances présentées dans les spectres Figure 97. Le maximum de ce paramètre ne correspond donc pas au point de transition associé à l'évolution des spectres.

En ce qui concerne l'évolution du paramètre R_{cell}, celui-ci atteint un premier plateau au moment où $^{1}/_{Q_{cell}}$ atteint son maximum. On note également des sursauts du paramètre R_{cell} aux jours 7, 9 et 21 (voir les encadrés dans la Figure 98). Ces sursauts correspondent à des perturbations de la culture. Aux jours 7 et 21, des photos de la culture sont prises. Cette étape est relativement longue (plus de 10 min). Et comme le volume de milieu est assez faible (1 mL par quartier du dispositif) celui-ci refroidit. Par ailleurs le pH peut aussi varier légèrement pendant cette période car on ne se trouve plus dans l'atmosphère de l'incubateur. On observe cependant un retour à un niveau cohérent vis-à-vis des points environnants. L'intervalle de temps entre deux points est ici de 2h. Au jour 9 un changement de milieu est effectué. En fonction de la température de celui-ci et de son pH, on retrouve également une forme de perturbation du tapis cellulaire. On note que ces sursauts ne sont pas présents dans la Figure 99 et semblent donc affecter uniquement le paramètre de résistance cellulaire.

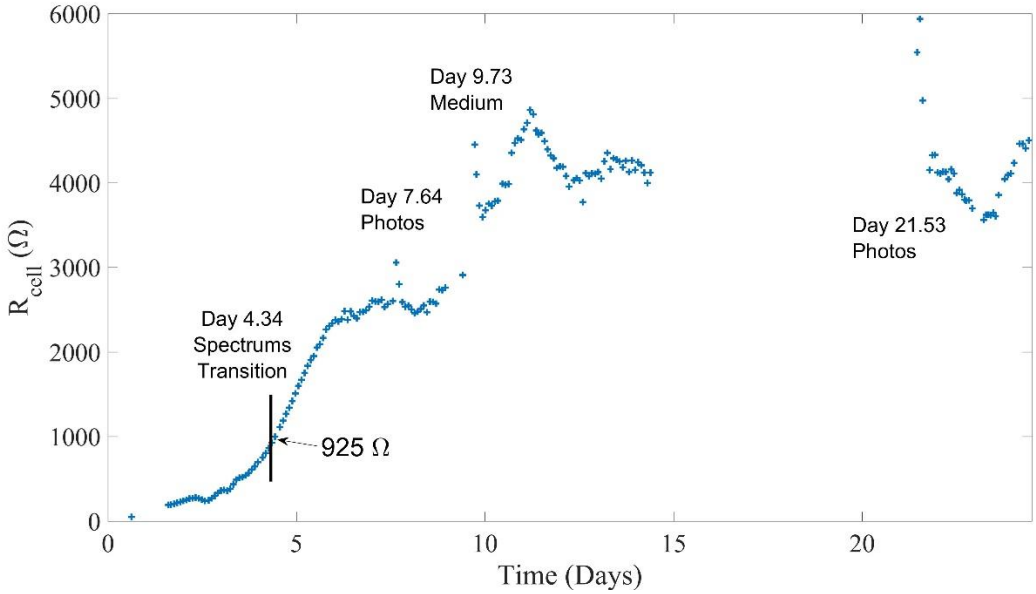

Figure 98 Résistance cellulaire issu de l'ajustement du modèle (présenté Figure 80) aux données mesurées. La barre verticale correspond à la transition entre les deux étapes présentées Figure 97.

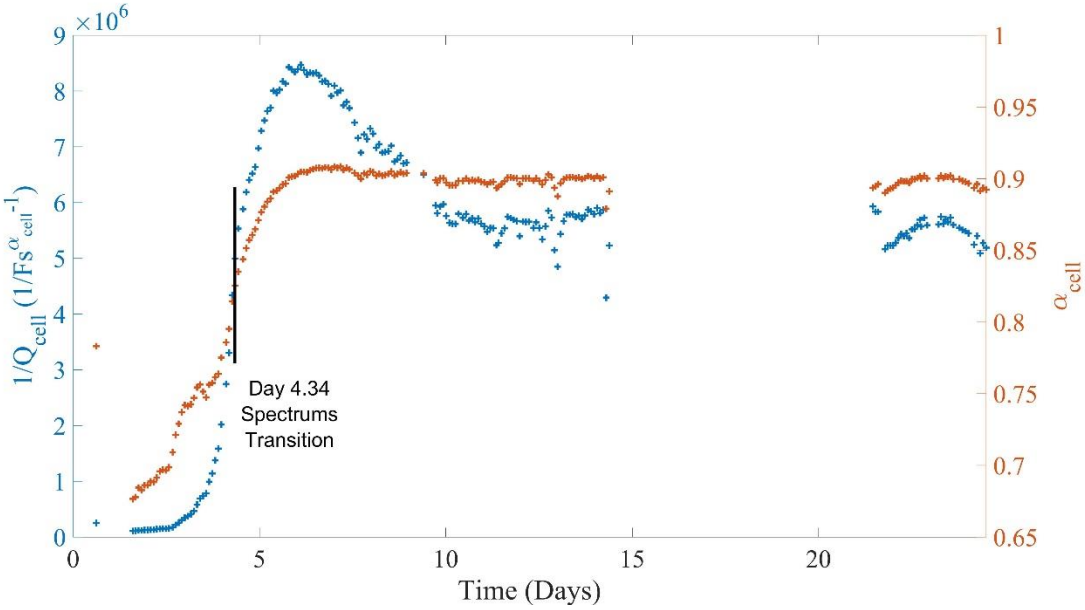

Figure 99 Paramètres de l'élément à constante de phase des cellules (CPEme dans la Figure 80) issus de l'ajustement du modèle aux données mesurées. Le maximum du paramètre $^{1}/_{Q_{cell}}$ a lieu au jour 6 à 4h39. La barre verticale correspond au point d'inflexion de $^{1}/_{Q_{cell}}$

- Le paramètre α_{cell}

On a jusqu'ici mis de côté le paramètre α_{cell}. On va maintenant interpréter la variation de celui-ci. Comme présenté dans le Chapitre 1, ce paramètre, quand il est associé à l'élément à constante de phase décrivant l'électrode, est souvent associé à l'homogénéité (si celui-ci est proche de 1) ou l'inhomogénéité (si celui-ci est significativement plus petit que 1) de la surface de celle-ci. La question de la grandeur pour laquelle on observe l'homogénéité ou encore de l'échelle d'observation considérée reste ouverte. Dans le cas d'une électrode, une explication dont on s'est alors satisfait est que le paramètre $\alpha_{électrode}$ représente l'homogénéité des plans cristallins de la surface de celle-ci en interaction avec l'électrolyte [77]. Ceci conduisant à une homogénéité des vitesses de réactions électrochimiques sur la surface de l'électrode dans le cas d'une réaction d'électro-dissolution de celle-ci. L'échelle considérée ici est de quelques atomes, à un niveau où les auteurs de [77] évaluent une sorte de régularité cristallographique.

Ici on ne considère pas la surface de l'électrode mais le tapis cellulaire auquel on a associé un second élément à constante de phase.
On propose donc l'hypothèse que le paramètre α_{cell} représente une certaine forme d'homogénéité du tapis cellulaire (quand il se rapproche de 1). Comme les phospholipides qui constituent les membranes cellulaires sont les plus petits éléments qui se répètent dans le tapis cellulaire tout en étant à l'origine des propriétés diélectriques de celui-ci, on propose que l'homogénéité de la distribution spatiale de ces molécules soit à l'origine du paramètre α_{cell}. Ainsi dans les stades où la culture se développe le paramètre α_{cell} est faible et augmente avant d'atteindre un maximum au point proposé pour la confluence. Ceci est cohérent puisque à la confluence le tapis cellulaire est exempt de trous et est donc relativement homogène.

- La capacité effective reconstruite

Cependant si l'on commençait la mesure du spectre de l'impédance à une fréquence de l'ordre de 1 KHz, on n'observerait pas l'impédance de l'électrode mais directement celle du tapis

cellulaire. Le modèle électrique serait donc identique à celui d'une électrode polarisée (c'est-à-dire en présence d'une réaction électrochimique) représentée par un élément à constante de phase en parallèle avec une résistance de transfert de charge le tout en série avec la résistance de l'électrolyte. Dans notre cas, la résistance de transfert de charge R_{ct} de cette électrode fictive correspond donc à R_{cell}, son élément à constante de phase correspond aux membranes cellulaires et la résistance de l'électrolyte R_e correspond à celle du milieu de culture.

Dans [101] les auteurs (qui sont par ailleurs les mêmes que dans [77]) mettent en avant le lien qui existe dans leurs mesures entre les paramètres Q et α pour un élément à constante de phase associé à une électrode qui a subi des réactions d'électro-dissolution afin de changer les paramètres Q et α. Bien que les auteurs fassent référence à l'élément à constante de phase utilisé pour modéliser l'interface électrode-électrolyte et non celui pour modéliser le tapis cellulaire, dans la suite on va évaluer ce lien dans le cas de nos mesures. En effet les modèles sont identiques et par ailleurs la question de la signification physique de l'élément à constante de phase ne semble pas définitivement tranchée. Retrouver un couplage identique à ce qui est présenté dans [101] pour l'élément à constante de phase du tapis cellulaire et ses éléments associés serait un argument pour affirmer que la cause sous-jacente qui provoque le comportement de CPE mesuré est commune au tapis cellulaire et à l'interface électrode-électrolyte.

Pour observer le lien entre les paramètres Q et α les auteurs de [77] et [101] utilisent les développements de [76]. Ceci a été présenté au Chapitre 1.

L'admittance d'un tel circuit est donnée par :

$$Y = \frac{1}{R_e}\left(1 - \frac{1}{1 + R_e R_{ct}^{-1} + R_e Q (i\omega)^{\alpha}}\right)$$

La pulsation qui maximise la partie imaginaire de l'admittance s'écrit :

$$\omega_{Y''max} = (Q^{-1}(R_e^{-1} + R_{ct}^{-1}))^{1/\alpha}$$

En posant $Q = C_{eff}$ dans le cas où $\alpha = 1$ les auteurs de [101] définissent une capacité, analogue à la capacité « effective » introduite dans [76].

$$C_{eff} = \omega_{Y''max}^{-1}(R_e^{-1} + R_{ct}^{-1})$$

En réorganisant les deux dernières équations on écrit α en fonction des autres paramètres :

$$\alpha = \frac{1}{\log \omega_{Y''max}} [\log(R_e^{-1} + R_{ct}^{-1}) - \log Q]$$

Soit :

$$\alpha = \frac{1}{\log[C_{eff}^{-1}(R_e^{-1} + R_{ct}^{-1})]} [\log(R_e^{-1} + R_{ct}^{-1}) - \log Q]$$

Dans cette dernière équation les auteurs prennent les valeurs moyennes de C_{eff}, R_e, et R_{ct} pour calculer la variation de α en fonction de Q. Ce choix n'est pas évident et est sans doute fait par les auteurs pour améliorer la visualisation de la courbe tracée qui joue alors le rôle d'une sorte de courbe de tendance vis-à-vis des données mesurées. Le tout est montré dans la Figure 100. Ce choix peut se justifier dans leur cas car les valeurs des paramètres C_{eff}, R_e, et R_{ct} ne s'étendent pas démesurément au-delà de leur valeur moyenne.

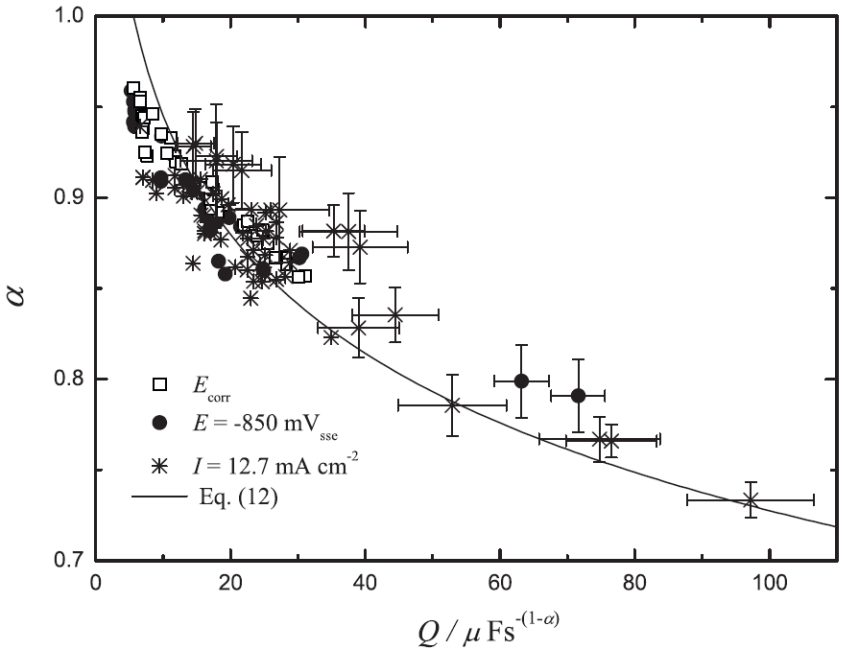

Figure 100 Lien entre alpha et Q obtenus après différentes conditions d'électro-dissolution de l'électrode. La courbe continue est issue de l'équation faisant le lien entre α, Q et les valeurs moyennes des paramètres extraits du modèle. Adapté de [101].

Dans notre cas on ne prendra pas les valeurs moyennes mais bien les valeurs mesurées issues de l'analyse des spectres et des ajustements effectués, puisque la plage de variation des paramètres R_e et R_{ct} est plus importante, il n'est donc pas adapté de les réduire à leur valeur moyenne.

Les valeurs de $R_e = R_{med}$ et $R_{ct} = R_{cell}$ sont issues des ajustements des spectres d'impédance mesurés alors que la valeur de $\omega_{Y''max}$ (et donc de C_{eff}) provient de l'analyse directe du spectre mesuré, après avoir converti l'impédance en admittance. On rappelle que $Y = \frac{1}{Z}$.

Afin d'être en accord avec ce qui a été présenté précédemment on va plutôt considérer le paramètre $1/Q_{cell}$ à la place de Q_{cell}. Ceci ne change rien par rapport à ce qui est fait dans [101] dans la mesure où l'on trace plutôt :

$$\alpha_{cell} = \frac{1}{\log \omega_{Y''max}} \left[\log\left(R_{med}^{-1} + R_{cell}^{-1}\right) + \log \frac{1}{Q_{cell}}\right]$$

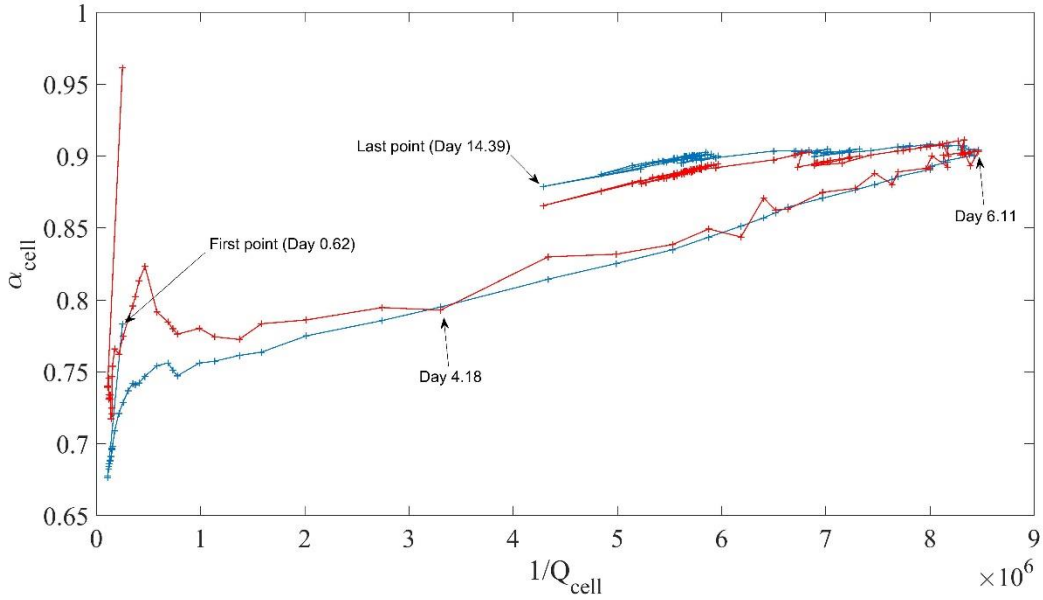

Figure 101 Lien entre les paramètres α_{cell} et $^1/_{Q_{cell}}$ entre les jours 0 et 14. La courbe bleue représente les données issues de l'ajustement alors que pour la courbe rouge le paramètre α_{cell} est reconstruit à l'aide de l'équation présentée.

La Figure 101 montre le lien entre α_{cell} et $^1/_{Q_{cell}}$ quand ces deux paramètres sont issus de l'ajustement du modèles aux spectres mesurés et quand le paramètre α_{cell} est reconstruit à partir de la méthode proposée dans [101]. On voit que dans notre cas également il semble qu'on puisse reconstruire α_{cell}, au moins en termes d'ordre de grandeur, en fonction des autres paramètres du modèle.

L'information présente dans α_{cell} est donc redondante avec celle contenue dans $^1/_{Q_{cell}}$ et dans les autres paramètres. Le fait qu'il existe un lien entre les paramètres du modèle complique l'analyse puisqu'on peut imaginer le cas où l'information totale se reporte « arbitrairement » sur chacun des paramètres sans qu'on puisse savoir dans quelle mesure c'est le cas. La démarche d'essais contrôlés présentée dans les parties suivantes est en partie utilisée pour clarifier cette situation et la signification physique des paramètres mesurés puisque le fait que les paramètres soient couplés ne permet pas de proposer des interprétations physiques univoques.

On devra donc questionner la variation des paramètres du modèle vis-à-vis de la variation du paramètre de capacité effective C_{eff} qui contient ces variations car reconstruit à partir des paramètres Q_{cell}, α_{cell}, R_{cell} et R_{med} tel que présenté précédemment et dans le Chapitre 1. Ce paramètre est parfois présenté dans la littérature comme contenant la signification physique de la mesure puisque son unité est le Farad, et représentant la capacité moyenne du tapis cellulaire. Nous avons choisi de retenir cette explication ici.

On rappelle que :

$$C_{eff} = Q_{cell}^{\frac{1}{\alpha}}(R_{med}^{-1} + R_{cell}^{-1})^{\frac{\alpha-1}{\alpha}}$$

Dans le cas de la croissance cellulaire sur l'électrode disque présentée ici, l'évolution du paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$ est montrée dans la Figure 102.

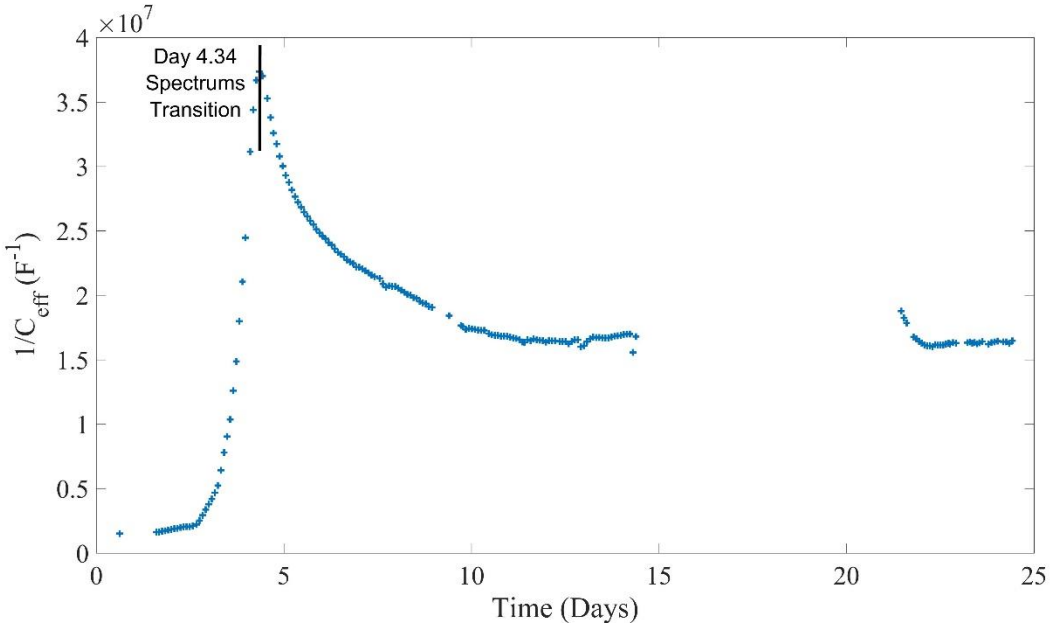

Figure 102 Paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$. Le maximum du paramètre a lieu au jour 4 à 8h22. La barre verticale correspond au point de transition des spectres telles que représenté sur les autres paramètres.

Cette évolution est similaire à celle du paramètre $^{1}/_{Q_{cell}}$. On observe cependant que le maximum de $^{1}/_{C_{eff}}$ a lieu au moment indiqué pour le point de transition des spectres Figure 97 et qui est très proche du point d'inflexion de $^{1}/_{Q_{cell}}$ comme présenté Figure 103.

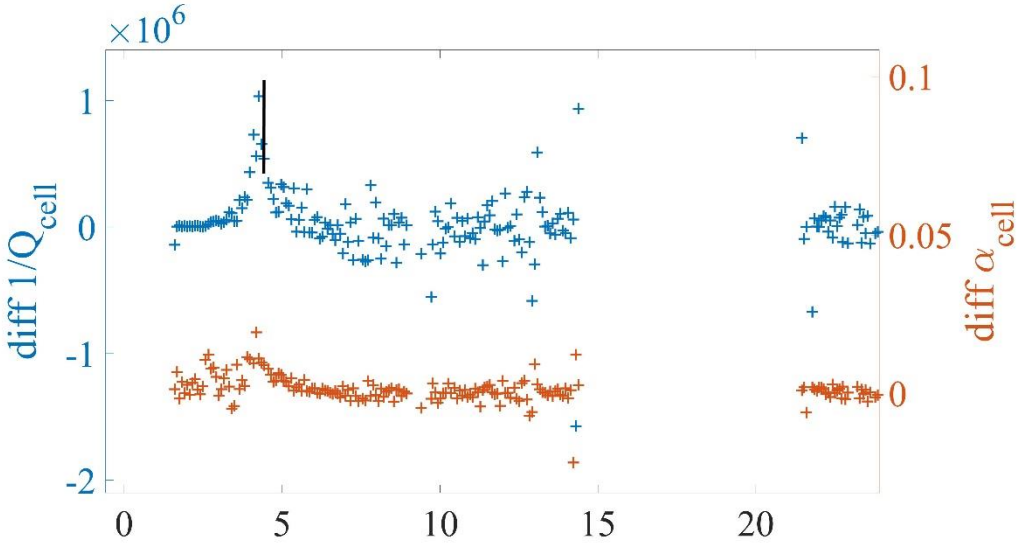

Figure 103 Différentielle des paramètres de l'élément à constante de phase des cellules (CPEme dans la Figure 16). La barre verticale correspond à la transition entre les deux étapes présentées Figure 97.

- Relation entre les paramètres du modèle et la croissance cellulaire

Afin de relier l'évolution de la culture avec l'évolution des paramètres on va maintenant présenter des images jours après jours d'une culture cellulaire qu'on a fait se développer dans les mêmes conditions que celle dont on a présenté les paramètres électriques précédemment. Les images ne sont pas prises sur la culture qui est mesurée pour limiter la perturbation des paramètres de celle-ci du fait des sorties intempestives de l'incubateur. Ces images sont présentées Figure 104. On observe que la confluence a lieu entre le jour 3 (18h59) et le jour 4 (17h36), ce qui est compatible avec le point de transition des spectres (J4 8h22) et le point de transition indiqué par la barre verticale noire dans les graphiques montrant l'évolution ses paramètres.

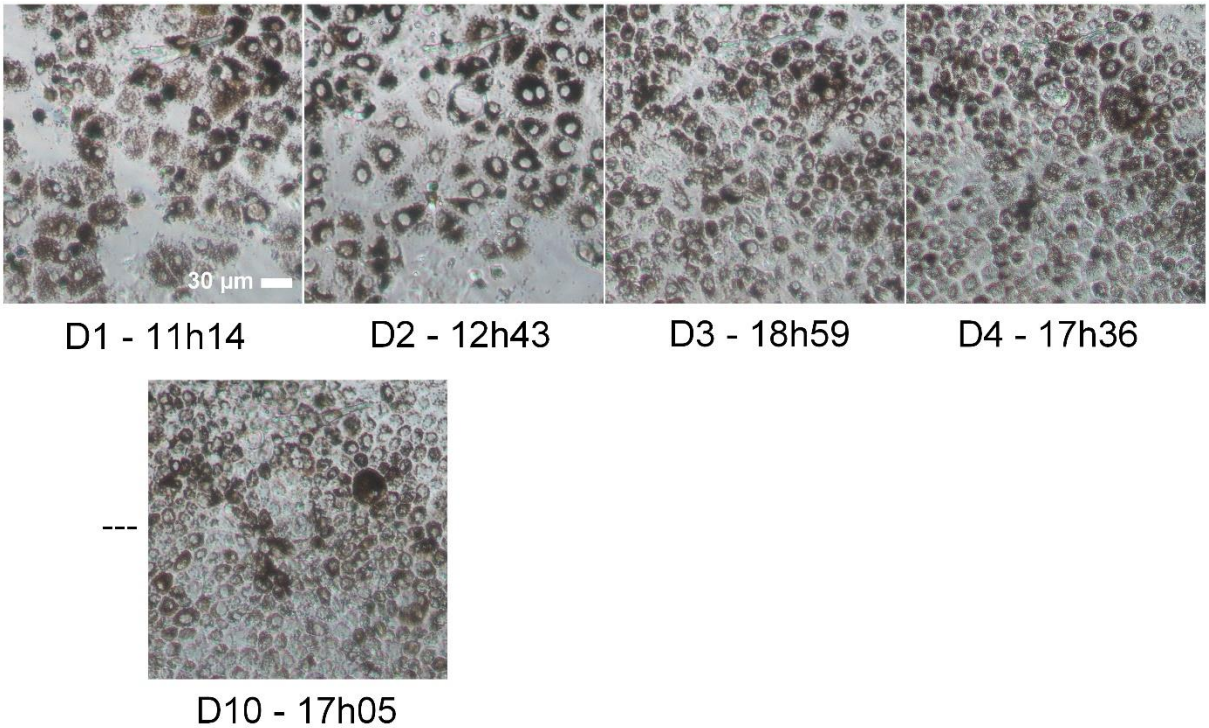

Figure 104 Images prises jours après jours du développement d'une culture cellulaire. On note que la confluence a lieu entre le jour 3 (18h59) et le jour 4 (17h36).

On propose donc que le point de transition des spectres représenté graphiquement Figure 97 et par une barre verticale noire dans les autres figures correspond au point où est atteinte la confluence. Au moment de la confluence les cellules n'ont cependant pas encore établies un grand nombre de jonctions ce qui explique la valeur faible du paramètre R_{cell} à ce stade. Par ailleurs la forme de celle-ci évoluant suite à l'établissement des jonctions, ceci peut expliquer la variation des paramètres qu'on a associé aux membranes cellulaires.

4.2. Croissance du tapis cellulaire sur électrode de type peigne

Dans cette sous-partie on présente la croissance du tapis cellulaire sur les deux électrodes de type peigne. On va particulièrement comparer l'électrode peigne de type 2 (distance inter-électrode de 100 µm) avec l'électrode disque présentée précédemment. En effet comme leurs surface et distance inter-électrode sont identiques on va donc oberver la conséquence de la différence dans le périmètre et dans la surface d'encombrement sur le dispositif au niveau des

paramètres mesurés. La surface d'encombrement sur le dispositif et le périmètre de chaque électrode sont donnés dans la Figure 105.

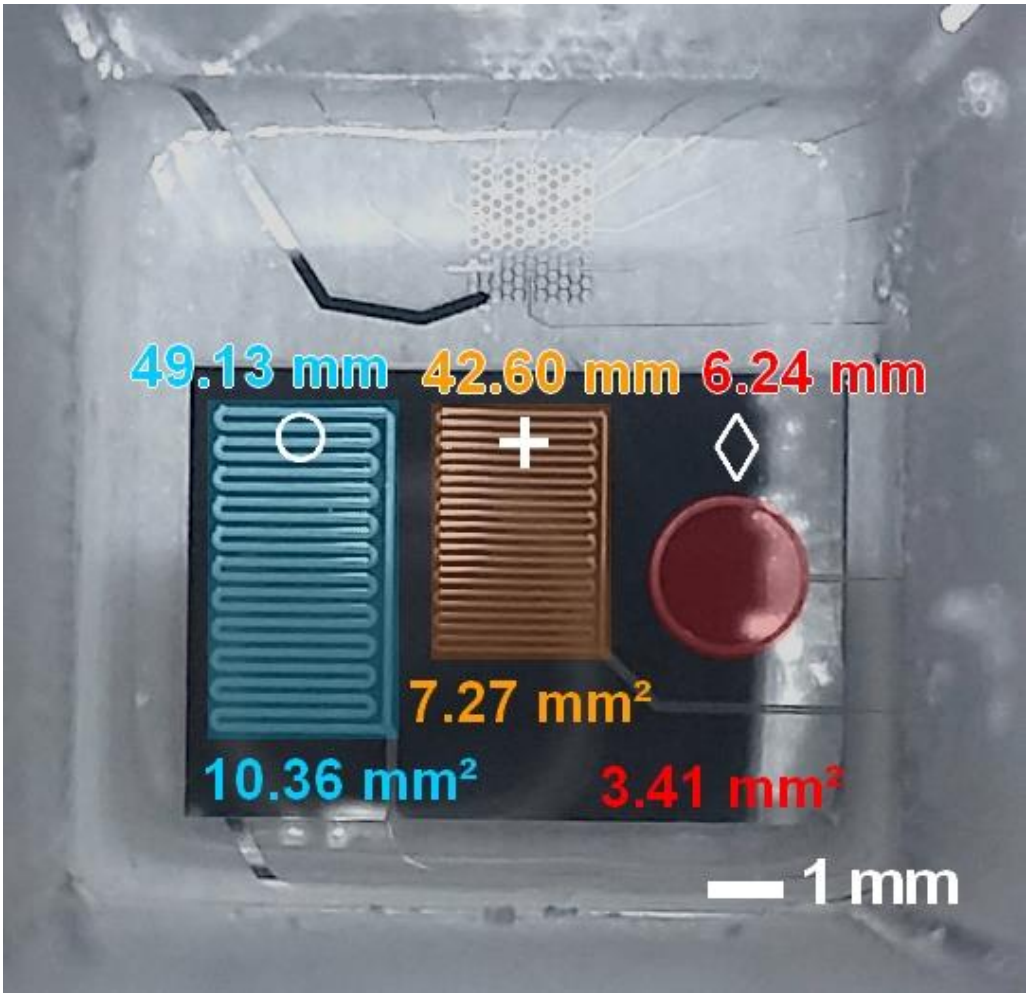

Figure 105 Un quartier d'un dispositif de la seconde série. La surface mentionnée sur l'image fait référence à l'encombrement de l'électrode sur le dispositif (zone de la couleur correspondante sur l'image). La distance fait référence au périmètre de l'électrode. Le symbole correspond à celui utilisé dans les courbes de cette sous-partie.

Les Figure 106 et Figure 107 montrent l'évolution des paramètres relatifs au tapis cellulaire pour les trois électrodes. La Figure 108 montre l'évolution du paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$.

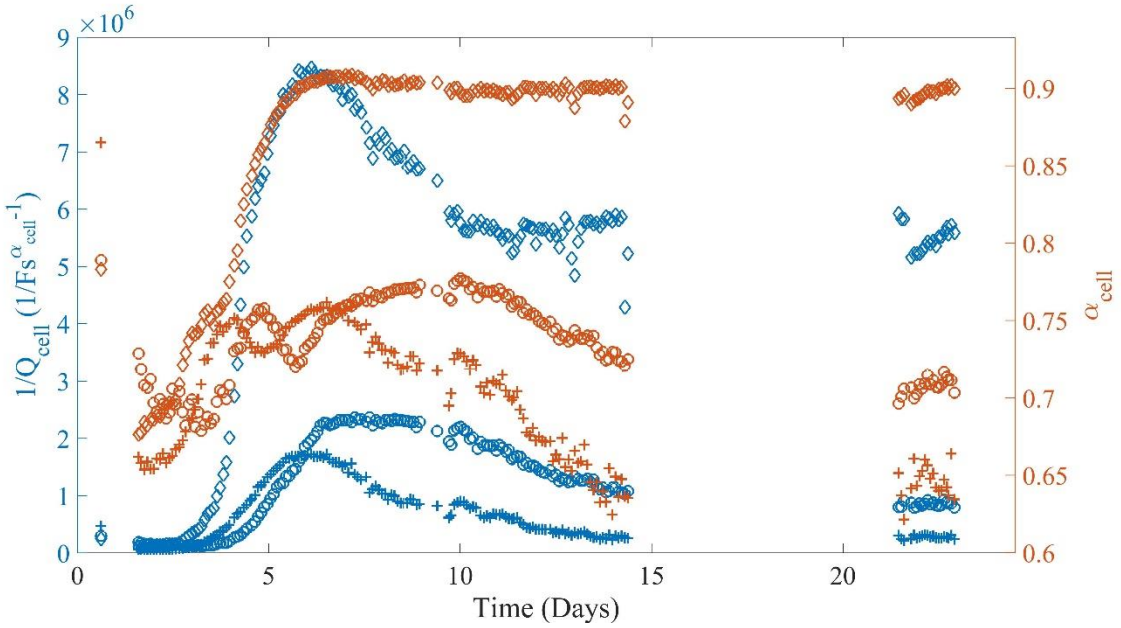

Figure 106 Evolution des paramètres de l'élément à constante de phase des cellules pour les trois électrodes. Losange : disque, Cercle : peigne type 2, Croix : peigne type 1.

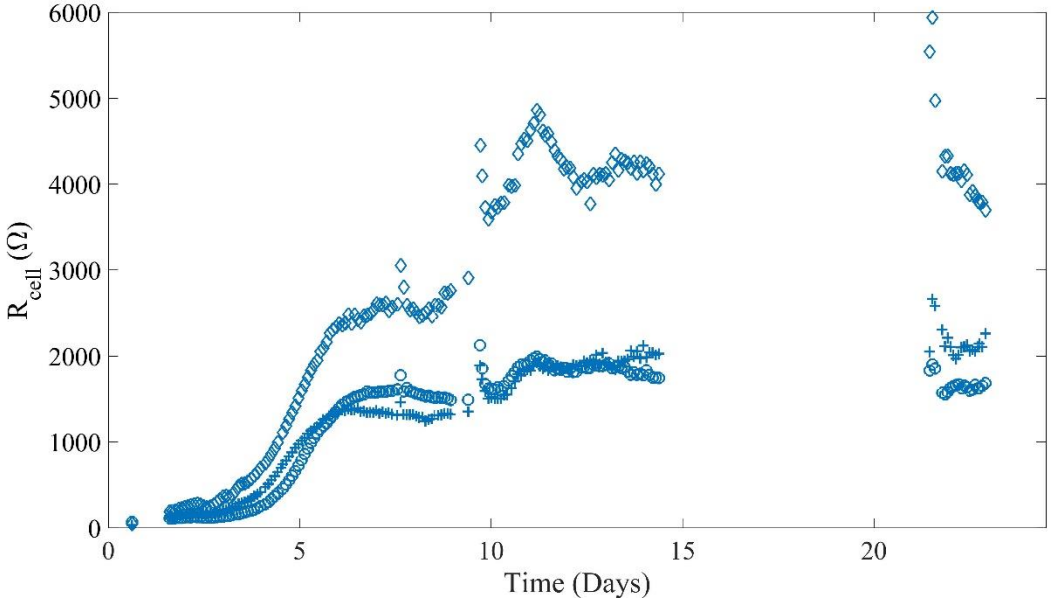

Figure 107 Evolution du paramètre de résistance pour les trois électrodes. Losange : disque, Cercle : peigne type 2, Croix : peigne type 1.

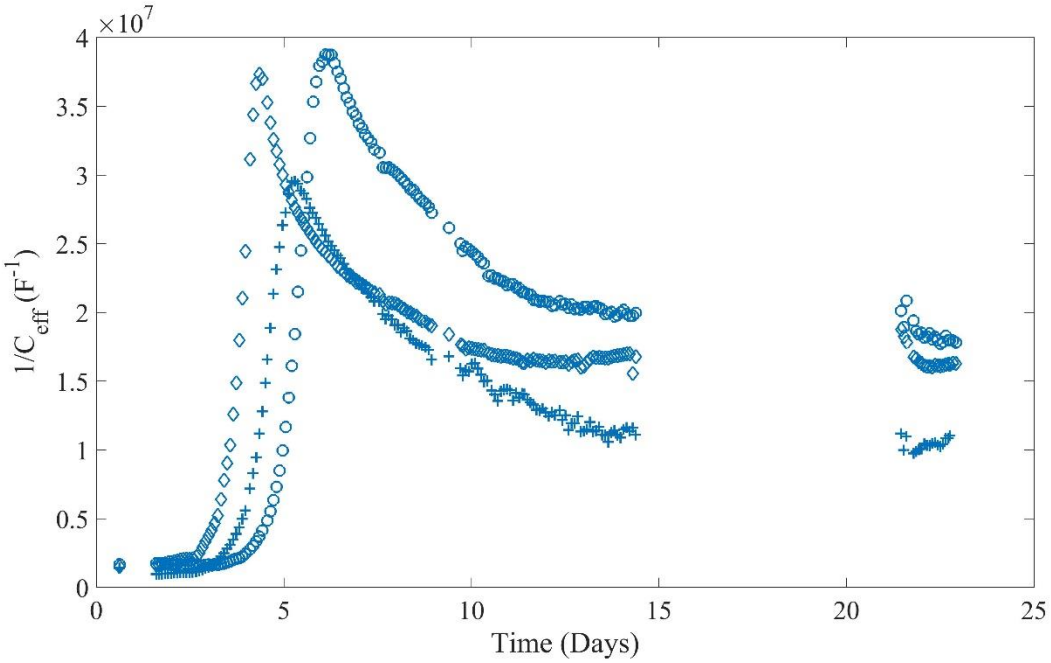

Figure 108 Evolution du paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$ pour les trois électrodes. Losange : disque, Cercle : peigne type 2, Croix : peigne type 1.

On observe un ordre dans la croissance des paramètres. En effet l'évolution de chacun d'eux se fait d'abord pour l'électrode disque, puis pour l'électrode peigne de type 1 puis pour celle de type 2. Cet ordre est cohérent avec la surface d'encombrement occupée sur le dispositif (représentée en couleur dans la Figure 105). On remarque également que pour les électrodes peigne les paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α atteignent des valeurs moins importantes et retrouvent ensuite une valeur proche de leur valeur initiale durant la phase qu'on a qualifiée de maturation dans la sous-partie précédente. La valeur du paramètre R_{cell} des électrodes peigne est inférieure à celle de l'électrode disque mais comparables entre elles.

En observant les paramètres du modèle dans les Figure 106 et Figure 107 on peut distinguer deux groupes. D'une part l'électrode disque (losange) et d'autre part les électrodes peigne (croix et rond). La différence géométrique la plus importante étant dans ce cas le périmètre des électrodes des deux groupes. Si on observe la Figure 108 on peut distinguer deux groupes également. Toutefois, les deux groupes sont différents. On a d'une part l'électrode peigne de type 1 et d'autre part l'électrode disque avec l'électrode peigne de type 2. La différence étant dans ce cas la distance inter-électrodes ainsi que la surface de l'électrode.

Afin de relier ordre de grandeur des paramètres et géométrie des électrodes on va calculer d'une part le rapport entre les paramètres mesurés ainsi que la capacité effective présentée précédemment (au moment de la dernière mesure présentée Figure 106 et Figure 107, quand les cellules se sont développées le plus longtemps) et d'autre part les rapports entre différentes grandeurs géométriques. Ceci est regroupé dans le tableau qui suit. Pour chaque comparaison on ne présente que le rapport supérieur à 1 et l'inverse n'est pas montré. Le rapport entre les valeurs de $^{1}/_{Q_{cell}}$ dans le cas de la comparaison entre peigne de type 2 et électrode disque est proche du rapport entre les surface inter-électrode (ou des périmètres d'électrode ce qui est équivalent dans ce cas). La différence est inférieure à 10 % de la valeur moyenne. Il en va de même si on considère le rapport de l'inverse des capacités reconstruites $^{1}/_{C_{eff}}$ avec le rapport des surfaces des électrodes disque et peigne de type 2

Rapport des paramètres du modèle	$^{1}/_{Q_{cell}}$	α	R_{cell}	$^{1}/_{C_{eff}}$	Rapport des Périmètres	Rapport des Surfaces inter-électrodes	Rapport des Surfaces électrode	Rapport des Distances inter-électrodes
Entre Peigne 1 et Disque	22.57	1.42	1.63	1.47	6.82	3.41	1.10	2
Entre Peigne 2 et Disque	**7.13**	1.28	2.19	**1.09**	**7.87**	**7.87**	**1**	**1**
Entre Peigne 1 et Peigne 2	3.16	1.11	1.34	1.61	1.15	2.31	1.10	2

Toutefois on ne retrouve pas de telles similitudes entre les paramètres du modèle électriques et la géométrie si on compare soit l'électrode disque avec l'électrode peigne de type 1, soit les

électrodes de type peigne entre elles. On ne peut donc pas conclure avec certitude sur un lien entre géométrie et paramètre extraits ou reconstruits. Pour clarifier ceci, on pourrait réaliser de nouvelles électrodes de surface identique à l'électrode disque et au peigne de type 2 et avec une distance inter-électrode de 100 µm mais avec des surfaces inter-électrodes différentes. Cette nouvelle étude n'a pas pu être réalisée faute de temps.

Par ailleurs on peut aussi remettre en question l'ajustement effectué dans le cas des électrodes peignes, particulièrement pour le peigne de type 1 et en fin de culture. En effet le module de l'impédance de l'élément à constante de phase qu'on a associé aux membranes cellulaires décroit au court de la croissance. Ceci court-circuite de plus en plus la résistance cellulaire qui se trouve en parallèle. Celle-ci devient donc de moins en moins mesurable et on peut donc supposer que la précision de l'ajustement de celle-ci s'en trouve affectée. Puisque les variations de R_{cell} ne se font pas de manière démesurées (voir Figure 107) elles ne semblent pas aléatoires et on a donc tout de même présenté ces mesures.

4.3. Croissance du tapis cellulaire en mesure inter-quartier

Dans cette sous-partie on va présenter une alternative aux mesures effectuées jusqu'à présent. Dans les parties précédentes on a en effet uniquement présenté des mesures pour lesquelles électrode et référence se trouvent dans le même quartier. Toutefois dans la partie 2 on présente un modèle électrique dans lequel les lignes de courant sortent du tapis cellulaire alors qu'électrode et référence se situent en dessous de celui-ci. On a justifié cela par le fait que le milieu extracellulaire est plus conducteur que le milieu intracellulaire lui-même bien plus conducteur que les membranes cellulaires. Toutefois si on veut s'assurer que les lignes de courant sortent du tapis cellulaire on peut utiliser une autre configuration de mesure telle que présentée dans la Figure 109 (B).

Dans cette sous-partie on présente des mesures sur l'électrode disque.

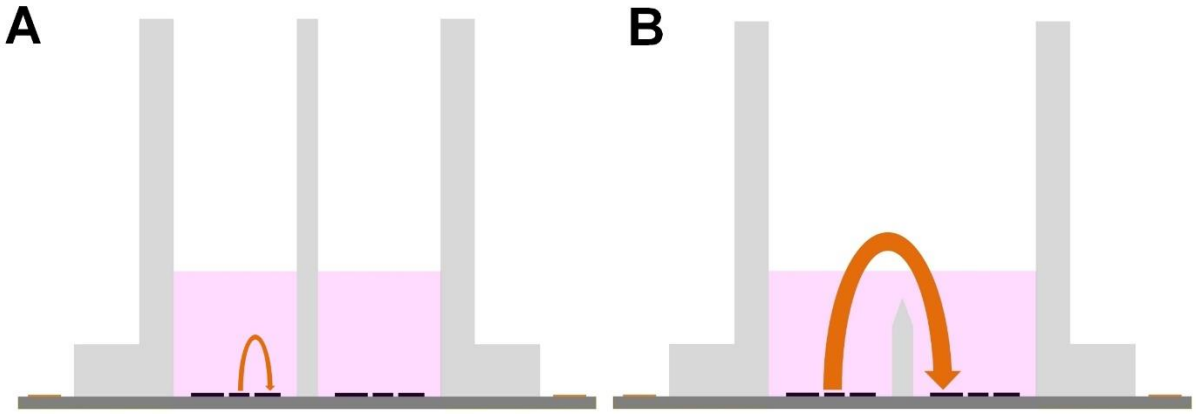

Figure 109 Mesures dans le cas où les quartiers sont isolés les uns des autres (A) et dans le cas où ils sont mis en commun par l'électrolyte dans leur partie supérieure (B). La flèche orange symbolise les lignes de champ.

Pour cela on utilise un puits en PDMS identique aux puits standard hormis que la partie central est plus basse que les murs extérieurs. Ainsi on peut faire déborder chaque quartier afin de les mettre en contact électrique par l'électrolyte.

La mesure se fait alors soit de manière standard avec électrode et référence dans un seul quartier. Soit on utilise comme électrode de référence celle qui se trouve dans le quartier diamétralement opposé à celui dans lequel se trouve l'électrode mesurée tel qu'illustré dans la Figure 110.

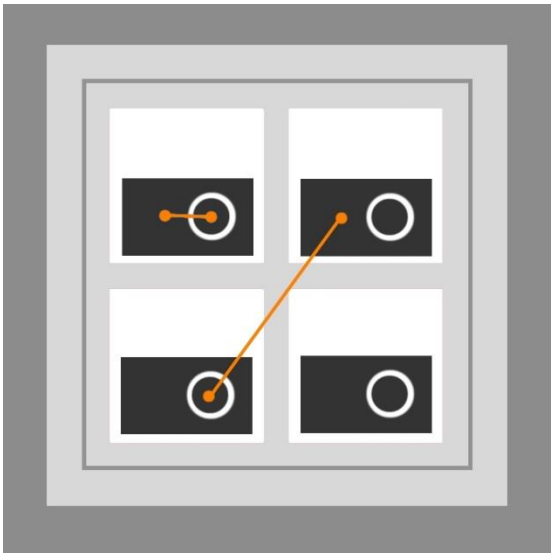

Figure 110 Illustration de la mesure mono-quartier (bleu) et inter-quartier (orange) en vue de dessus

Dans la suite de cette sous-partie on fera référence à la mesure « mono-quartier « pour désigner le premier type de mesure et à la mesure « inter-quartier » pour désigner le second type. On va utiliser la mesure inter-quartier afin de s'assurer que celle-ci est similaire à la mesure mono-quartier dans la variation des paramètres observés, cette dernière étant plus simple à réaliser.

- Comparaison des mesures en configuration mono-quartier et inter-quartiers

Les cellules sont ensemencées dans les 4 quartiers au jour 0. A cette étape chaque quartier contient uniquement 500 µL de milieu de culture de cette façon ils ne débordent pas. On démarre les mesures en configuration mono-quartiers. Le lendemain après que les cellules aient adhéré à la surface du substrat, on change le milieu de culture afin d'enlever les débris. Cette fois on remplit chaque quartier avec 1 mL de milieu de culture ce qui provoque le débordement. Après cette étape on prend des photos de la culture (Figure 111) puis on replace le dispositif dans son support de mesure et on démarre les mesures en configuration inter-quartiers tout en poursuivant celles en configuration mono-quartier. Le sursaut dans les paramètres, notamment dans R_{cell} au niveau du deuxième jour est interprété comme un décollement de cellules. En effet cette culture a été faite avec un ensemencement important puisque les cellules n'avaient pas pu être comptées dans ce cas. Au jour 3 on retrouve une croissance analogue à ce qu'on a déjà observé.

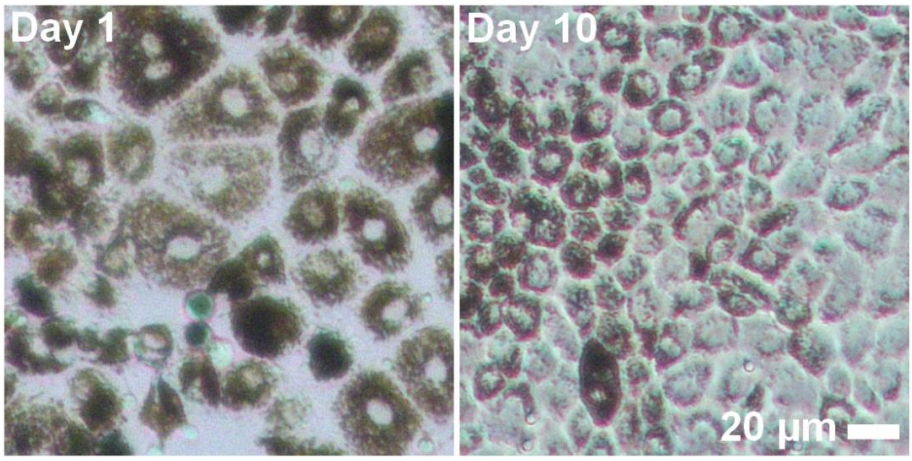

Figure 111 Illustration de l'évolution du tapis cellulaire entre les jours 1 (après changement du milieu) et 10.

En comparant les Figure 112 et Figure 113 on observe peu de différence dans les paramètres relatifs au tapis cellulaire en configuration inter-quartiers par rapport à la configuration standard. Les paramètres R_{cell} et α_{cell} varient peu dans les deux cas (+1.9% et +0.6% respectivement, au jour 5). Toutefois α_{cell} apparait en exposant dans le modèle, sa variation n'est donc pas directement comparables à celle des autres paramètres. Quant au paramètre $^{1}/_{Q_{cell}}$ il est légèrement plus élevé dans la configuration inter-quartiers (+7.9 % au jour 5) mais reste du même ordre de grandeur.

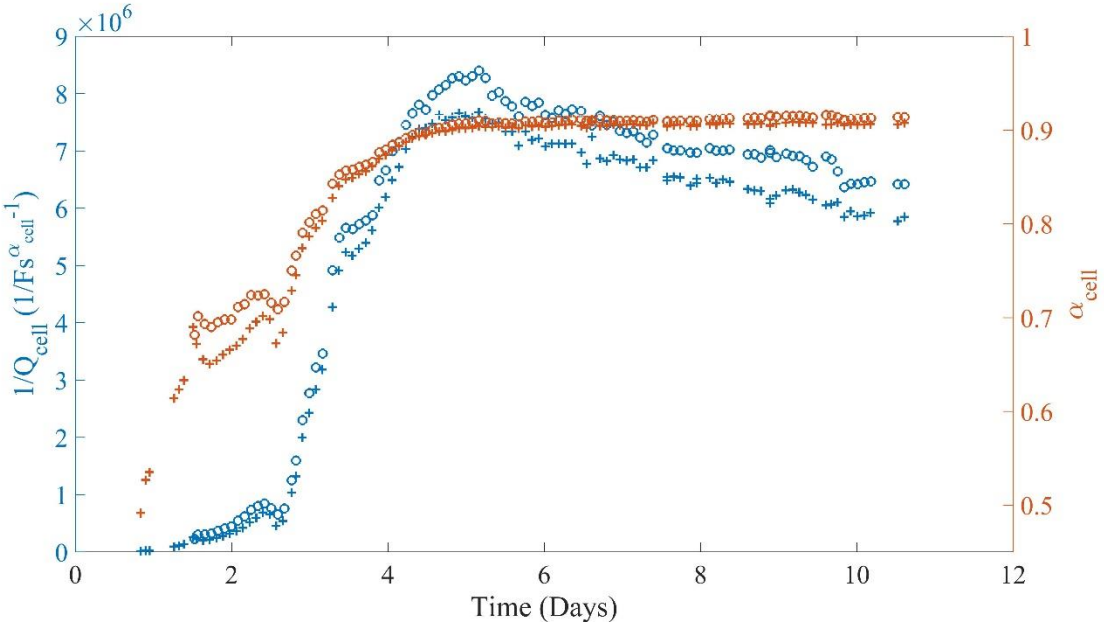

Figure 112 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} pendant la croissance pour une mesure en configuration mono-quartier (+) et inter-quartiers (o)

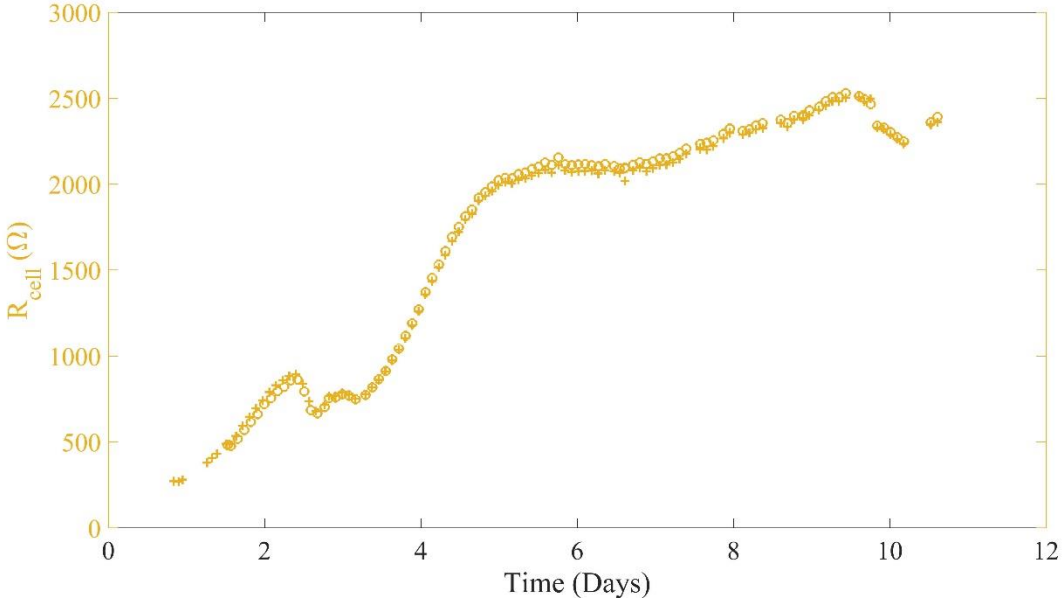

Figure 113 Evolution du paramètre R_{cell} pendant la croissance pour une mesure en configuration mono-quartier (+) et inter-quartiers (o)

Le fait que les valeurs des paramètres soient proches dans les deux cas permet d'affirmer que la mesure est similaire en configuration mono-quartier par rapport à la configuration inter-quartiers. Bien sûr la résistance du milieu de culture vue par les électrodes est significativement plus élevée dans la configuration inter-quartiers (584 Ω en inter-quartiers contre 417 Ω en mono-quartier au jour 5 soit +40 %) mais ceci ne semble pas avoir de répercussions importantes sur la forme de l'évolution des paramètres du tapis cellulaire extraits de l'ajustement.

Toutefois la résistance du milieu intervient dans le calcul du paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$. Celui-ci est montré dans la Figure 114 pour les deux configurations de mesure sur la même électrode disque que montré précédemment. On remarque que les deux paramètres reconstruits tendent vers une valeur commune. Encore une fois il y a ambiguïté sur l'interprétation possible. On peut d'une part affirmer que dans les deux mesures le tapis cellulaire étant identique, la capacité obtenue dans les deux cas ne doit pas varier. Alors dans ce cas le paramètre $^{1}/_{C_{eff}}$ est celui qui représente le plus convenablement le tapis cellulaire, au moins

après la confluence. La différence dans le paramètre $^{1}/_{Q_{cell}}$ provient alors du fait que la distribution des phospholipides observés est différentes dans les deux cas.

Mais d'autre part, on peut proposer que bien que la capacité du tapis cellulaire soit identique, la façon de la mesurer ne l'est pas. Les lignes de champs qui existent dans la configuration inter-quartiers ne sont pas les mêmes que celles dans la configuration mono-quartiers. Or une capacité dépend aussi de la position des électrodes de mesures, en plus des caractéristiques du milieu mesuré, une différence peut donc être envisageable et on ne peut pas affirmer que $^{1}/_{Q_{cell}}$ ne contient pas une information capacitive sans pour autant être une capacité puisque l'unité ne correspond pas. Cette seconde hypothèse ne sera toutefois pas retenue dans la suite et on considérera que $^{1}/_{Q_{cell}}$ est plutôt une image de la distribution des phospholipides comme α_{cell}.

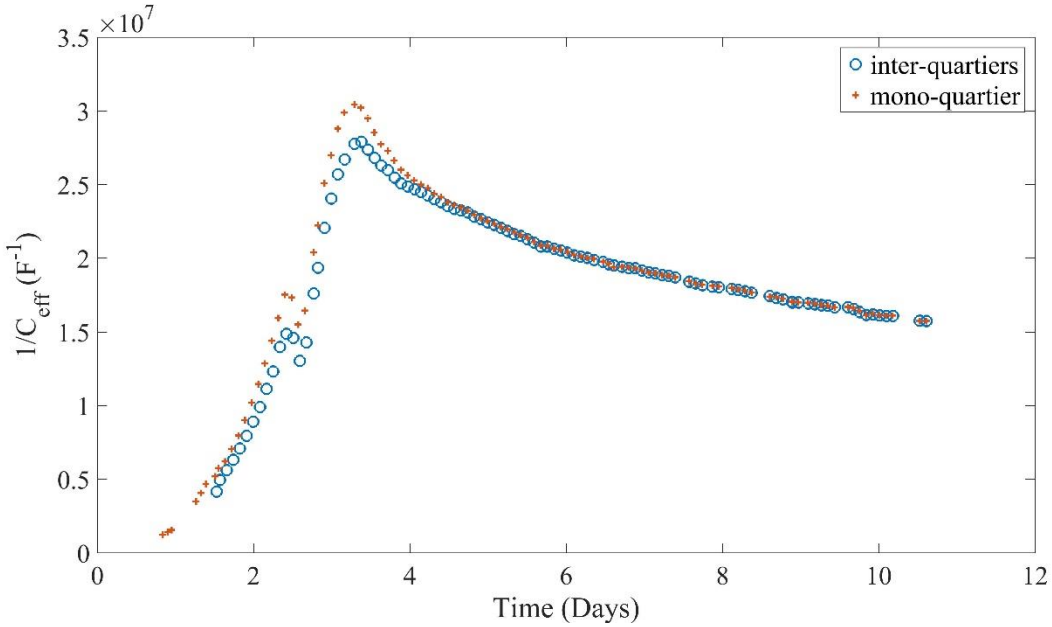

Figure 114 Paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$ pour la mesure inter-quartiers (cercle bleu) et pour la mesure mono-quartier de la même électrode (croix rouge)

- Mesure polarisée du tapis cellulaire

Enfin on utilise aussi ce type de configuration pour effectuer une mesure polarisée du tapis cellulaire. En effet les épithéliums présentent une polarisation entre leur face basale et leur face

apicale. Ceci a lieu via divers mécanismes tel que le transport de protéines que nous ne détaillerons pas. Cependant, on veut s'assurer que la composante capacitive de l'impédance du tapis cellulaire est bien liée à la polarisation apportée par les phospholipides des membranes et non par le fait que le tapis cellulaire possède une polarisation. La configuration inter-quartier permet de réaliser ce type de mesure qui est symbolisée par la Figure 115. Si on polarise l'électrode positivement (ou négativement) et si la polarisation de l'électrode a un effet sur la composante capacitive de la mesure, on devrait observer un changement dans les paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} qui sont associés à la membrane cellulaire. Les Figure 116 et Figure 117 montrent l'évolution des paramètres du tapis cellulaire. L'encadré montre les points mesurés avec une polarisation de 100 mV. On n'observe pas de discontinuité par rapport à la tendance des mesures observées sans polarisation. Ainsi on conclut qu'une polarisation de 100 mV n'a pas d'effet sur les paramètres du tapis cellulaire. On va donc rester sur l'hypothèse que la composante capacitive de la mesure est associée aux membranes cellulaire et non à un déplacement actif de charges produit par le tapis cellulaire.

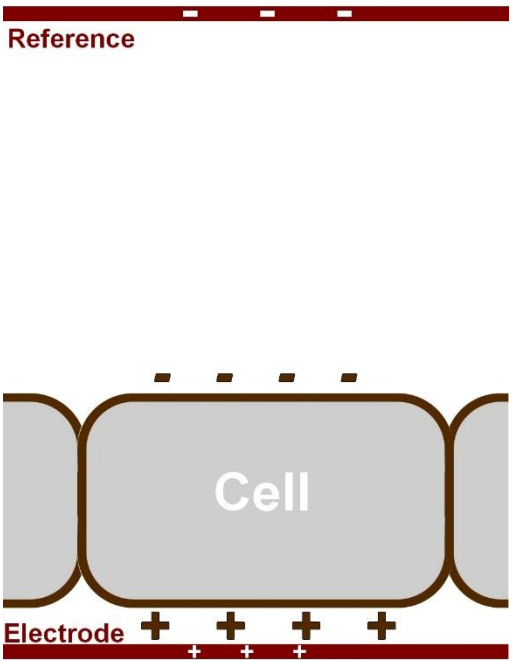

Figure 115 Représentation symbolique et non à l'échelle du tapis cellulaire, de l'électrode et de la référence

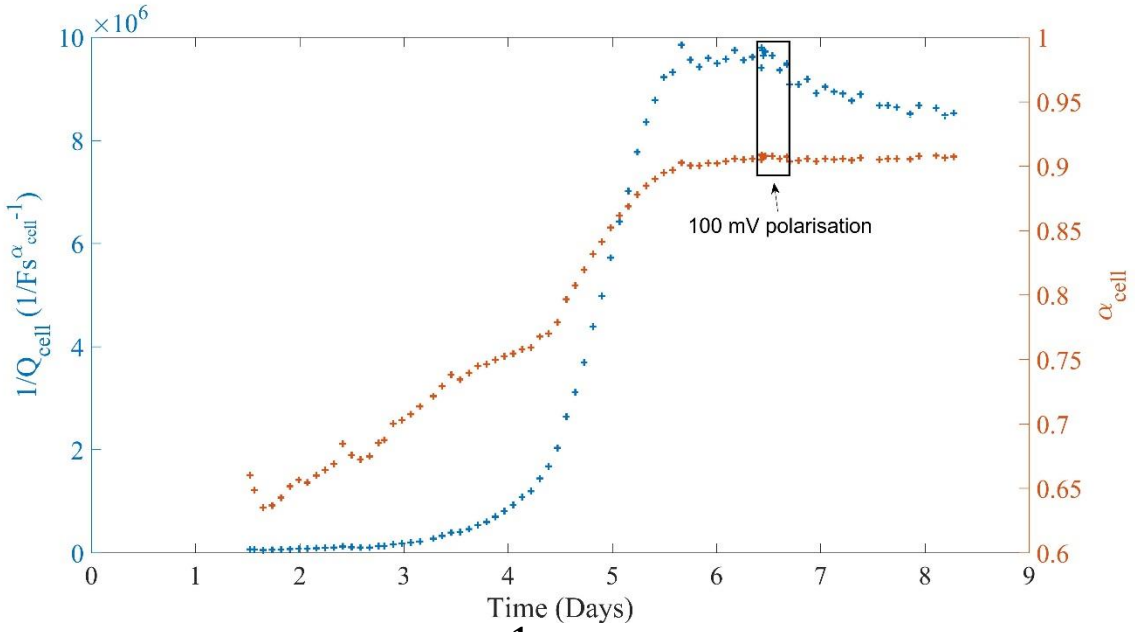

Figure 116 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} pendant la croissance pour une mesure en configuration inter-quartiers. L'encadré indique les points mesurés avec une polarisation de 100 mV.

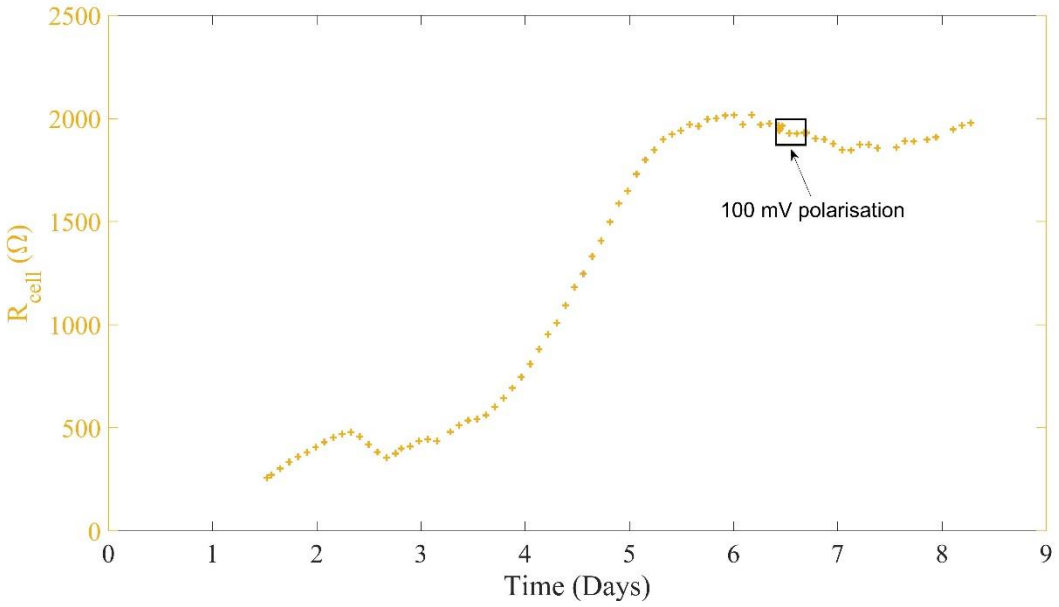

Figure 117 Evolution du paramètre R_{cell} pendant la croissance pour une mesure en configuration inter-quartiers. L'encadré indique les points mesurés avec une polarisation de 100 mV.

En conclusion dans ce chapitre on a pu observer l'évolution des paramètres du modèle relatif au tapis cellulaire au cours de la croissance de celui-ci dans différentes configurations de mesure. Des hypothèses quant aux points de transition dans le développement du tapis cellulaire ont été présentées. On a associé $1/Q_{cell}$ et α_{cell} aux membranes cellulaires sans toutefois pouvoir affirmer que l'un de ces paramètres représente une capacité puisque l'unité ne correspond pas. On a donc introduit le paramètre reconstruit $1/C_{eff}$ comme représentant une telle capacité, de manière moyennée au voisinage de l'électrode. Par ailleurs α_{cell} a été introduit comme relatif à l'inhomogénéité de la distribution des phospholipides des membranes cellulaires, puisque ce sont les éléments les plus petits qui se répètent dans les membranes cellulaires tout en étant responsables du comportement capacitif de celles-ci. Ce paramètre varie avec $1/Q_{cell}$ et nous vérifierons ce lien dans les essais de perturbation du tapis cellulaire dans le dernier chapitre. Toutefois, comme présenté précédemment, pour pouvoir conclure avec certitude sur le lien entre état de croissance du tapis cellulaire et paramètres du modèle, un suivi en temps réel par microscopie de la surface supérieure de l'électrode, en parallèle des mesures, est nécessaire. Ceci n'a pas été réalisé pour deux raisons. D'une part, afin d'éviter de déplacer le dispositif à de multiples reprises (ce qui perturbe les mesures, tout en augmentant le risque de contamination comme vu précédemment) on aurait dû intégrer un système de microscopie au support du dispositif dans l'incubateur ce qui demanderait des développements optiques et mécaniques dont la précision nécessaire rend un tel développement incompatible avec le temps de la thèse. Par ailleurs un tel système est envisageable en vue inversée (objectif en dessous du dispositif) mais ne permettrait pas la visualisation des cellules sur l'électrode. Il faudrait donc envisager un dispositif de culture qui maintient les cellules dans un milieu de culture tout en permettant l'approche par le dessus d'un objectif à une distance faible (quelques mm maximum), et l'utilisation d'un objectif dont le grossissement permet de visualiser les cellules.

Chapitre 4

Perturbation du tapis cellulaire

Dans ce chapitre on présente la démarche d'essais de perturbations sur le tapis cellulaire. On applique ceci afin d'étudier la variation des paramètres de l'élément à constante de phase du tapis cellulaire en lien avec ces perturbations.

La première partie de ce chapitre correspond à des perturbations dites « connues ». C'est-à-dire qu'on utilise un réactif bien déterminé et dont l'effet sera questionné vis-à-vis des mesures effectuées.

Dans les dernières parties on s'intéresse à des perturbation pour lesquelles plusieurs facteurs entrent en jeu dans l'action de la perturbation tel que l'action combinée de la lumière et d'un photosensibilisant, l'A2E, dans la partie 2 ou les perturbation physiques et chimiques possibles dans le cas de l'électroporation pour la partie 3. Ces deux dernières parties sont présentées en tant qu'exemple d'application du suivi du tapis de cellules RPE par spectroscopie d'impédance.

1. Application du modèle à la réaction du tapis cellulaire face à des perturbations connues

1.1. Réaction à la perturbation des jonctions cellulaires par l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)

- Chélation des ions calcium et magnésium

Le premier essai de perturbation du tapis cellulaire consiste ici à remplacer le milieu de culture par un milieu de culture identique dans lequel on a ajouté de l'EDTA. L'EDTA est un acide faible pouvant libérer 6 protons et dont les constantes d'acidité pKa valent 0, 1.5, 2, 2.68, 6.11, 10.17 [102]. Dans sa forme la plus basique, symbolisée Y^{4-}, il complexe les cations métalliques, en particulier le calcium et le magnésium selon la relation.

$$Y^{4-} + Ca^{2+} = CaY^{2-}$$

La constante de formation du complexe (en supposant le pH égal à 7) est donnée dans [102]. Elle vaut $K_{f,pH=7} = \alpha_{Y^{4-},pH=7} K_{f,pH>13}$ où $\alpha_{Y^{4-},pH=7} = 4.8\ 10^{-4}$ est un facteur qui tient compte du fait qu'à pH 7 l'EDTA n'est pas sous forme totalement déprotonée. Ceci modifie la constante de formation $K_{f,pH>13}$ pour laquelle c'est le cas. Pour le calcium $K_{f,Ca2+,pH=7} = 2.6\ 10^{7}$ et pour le magnésium $K_{f,Mg2+,pH=7} = 3.0\ 10^{5}$. Ces deux constantes de formation sont importantes donc l'équilibre a nettement lieu dans le sens de formation des produits. On va estimer l'ordre de grandeur de la concentration de calcium ionique restante dans le milieu extracellulaire. On ne peut qu'estimer un ordre de grandeur car d'une part le sérum ajouté au milieu de culture (à hauteur de 20 %) contient également des ions calcium, dont la concentration précise n'est pas connue, et d'autre part l'EDTA va aussi se lier avec le magnésium. On sait que le milieu de culture DMEM utilisé contient initialement 1.8 mM d'ions calcium et 0.81 mM d'ions magnésium soit une concentration totale de 2.61 mM. On considère que l'EDTA ajouté se lie de manière stœchiométrique avec le calcium et le magnésium. Alors si on ajoute plus de quelques mM d'EDTA on peut considérer que l'ensemble des ions calcium est complexée.

L'EDTA est utilisé pour sa capacité à complexer les ions calcium afin de perturber les jonctions serrées des cellules telles que celles présentes entre les cellules RPE. Séquestrer les ions calcium du milieu extracellulaire perturbe le déséquilibre avec la concentration de calcium intracellulaire (environ 100 nM [103]). Ceci aurait un effet sur les jonctions serrées via la perturbation des filaments d'actine qui existent dans l'espace intercellulaire [104].

- Observations au microscope

La Figure 118 montre un essai réalisé sur un tapis de cellules RPE. Les 3 photos montrent la même zone du tapis cellulaire. La photo (A) est prise avant l'exposition à l'EDTA. Les cellules se trouvent alors à confluence dans un milieu de culture DMEM + 20 % SVF.
On prépare une solution de DMEM + 20 % SVF contenant 2.5 mM d'EDTA à partir d'une poudre (EDTA sel disodique de Sigma-Aldrich) de masse molaire 372.24 g/mol. La poudre est dissoute dans la solution à 37°C puis celle-ci est filtrée afin de la stériliser. La solution est alors laissée dans l'incubateur environ 30 min afin qu'elle s'équilibre à la température et au pH que cet environnement impose. Cette solution vient remplacer le milieu de culture initialement présent et on place le dispositif dans l'incubateur. Une photo 12 minutes après l'exposition à l'EDTA (B) montre l'état des cellules. Celles-ci ont alors une forme plus ronde et moins aplaties. On remarque de nets espaces entres elles dans le tapis cellulaire. Certaines cellules semblent avoir aussi perdu leur adhésion au substrat. Ceci est le résultat d'une exposition prolongée à une concentration importante d'EDTA. Immédiatement après l'image (B) on rince trois fois le milieu de culture contenant de l'EDTA avec un milieu de culture identique à celui présent dans l'image (A). Après 7h45 d'attente dans l'incubateur une photo (C) est prise à nouveau. Le tapis cellulaire a alors retrouvé une forme plus proche de celle qu'il avait dans l'image (A). Les cellules semblent aplaties et on ne visualise pas d'espace entre elles. Toutefois on remarque un trou (indiqué par la flèche) dans le tapis cellulaire qui provient probablement d'une perte de cellules durant l'étape de rinçage.

Dans la Figure 118 on a refait la mise au point du microscope entre chaque images.

La Figure 119 montre une expérience similaire avec cette fois 2.75 mM d'EDTA. Dans cette figure la mise au point n'est refaite qu'entre les photo (a) et (b), (f) et (g) ainsi qu'entre les photos (g) et (h). Les photos b, c, d, e, et f sont donc faites sans changer la mise au point ni déplacer le dispositif sous le microscope. On remarque que les photos deviennent progressivement floues, signe que les cellules s'arrondissent vers le haut et sortent ainsi du plan focal du microscope. Comme dans la Figure 118 on peut remarquer que quelques minutes après l'ajout d'EDTA on voit apparaitre des espaces entre les cellules. 7h après rinçage on retrouve une image similaire à celle avant l'essai.

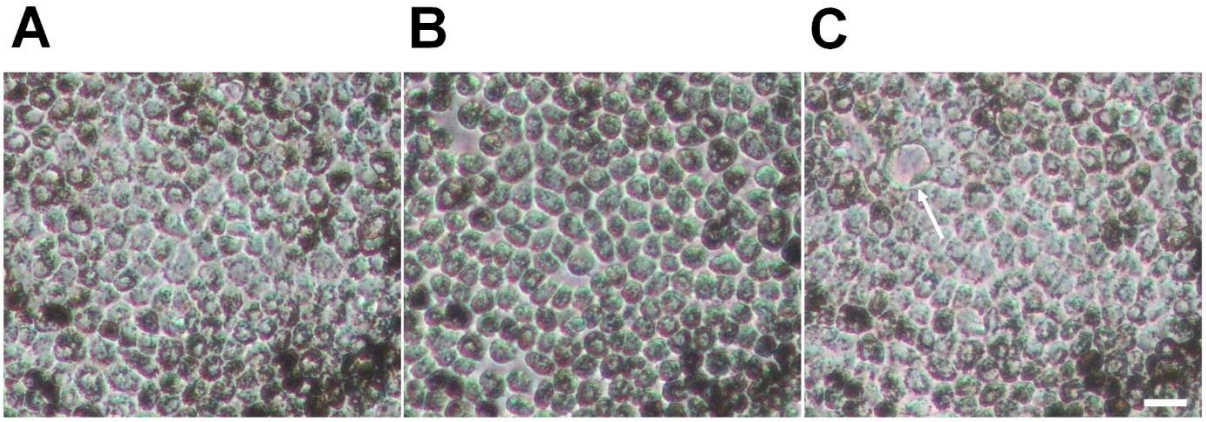

Figure 118 Tapis cellulaire 55 min avant exposition à une concentration de 2.5 mM d'EDTA (A), 12 min après l'exposition (B) et 7h45 après rinçage (C). La flèche indique un trou dans le tapis cellulaire. La barre d'échelle est de 20 µm et toutes les images sont à la même échelle.

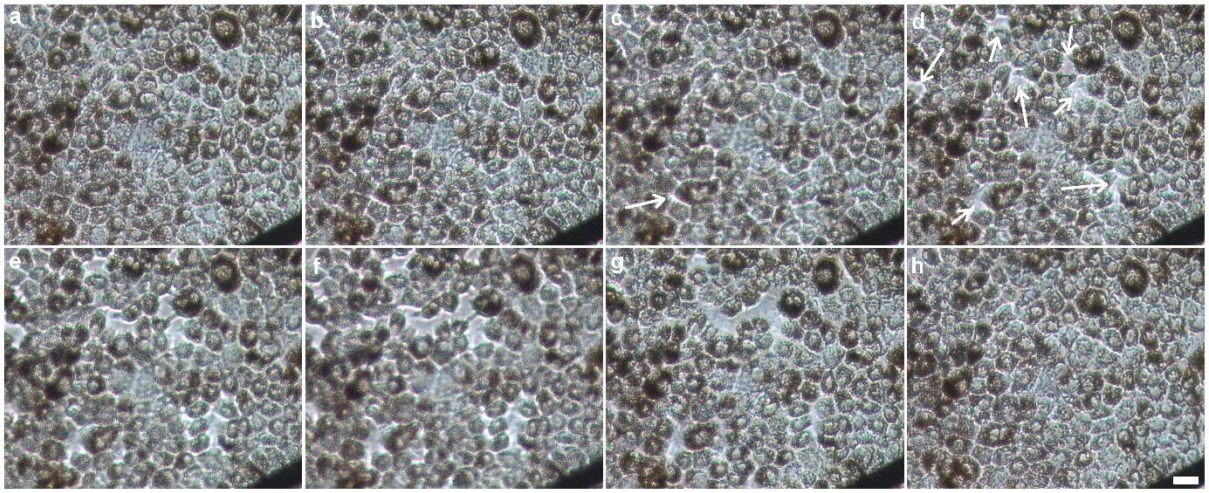

Figure 119 Tapis cellulaire 10 min avant exposition à une concentration de 2.75 mM d'EDTA (a) puis 3min52s (b), 4min32s (c), 6min10s (d), 7min10s (e), et 8min8s (f) après l'exposition. La photo (g) est prise 18 min après rinçage et la photo (h) 7h après. Les flèches indiquent les espaces qui apparaissent entre les cellules sur les photos (c) et (d). Les photos (b), (c), (d), (e) et (f) sont faites sans changer la mise au point. La barre d'échelle dans le coin inférieur droit est de 20 µm et toutes les images sont à la même échelle.

- Mesures d'impédance et interprétations

La Figure 120 montre l'évolution des paramètres de la culture cellulaire présente sur l'électrode disque de la seconde série de dispositifs quand on la soumet à une concentration légèrement plus faible d'EDTA (2.2 mM) puis après rinçage. L'encadré correspond aux premiers points de mesure juste après l'ajout d'EDTA. Au niveau du repère 1 on applique la solution d'EDTA puis immédiatement après on démarre les mesures. Au niveau du repère 3 le rinçage est effectué avec un milieu de culture identique à celui dans lequel se trouvaient les cellules avant l'essai (DMEM + 20% SVF).

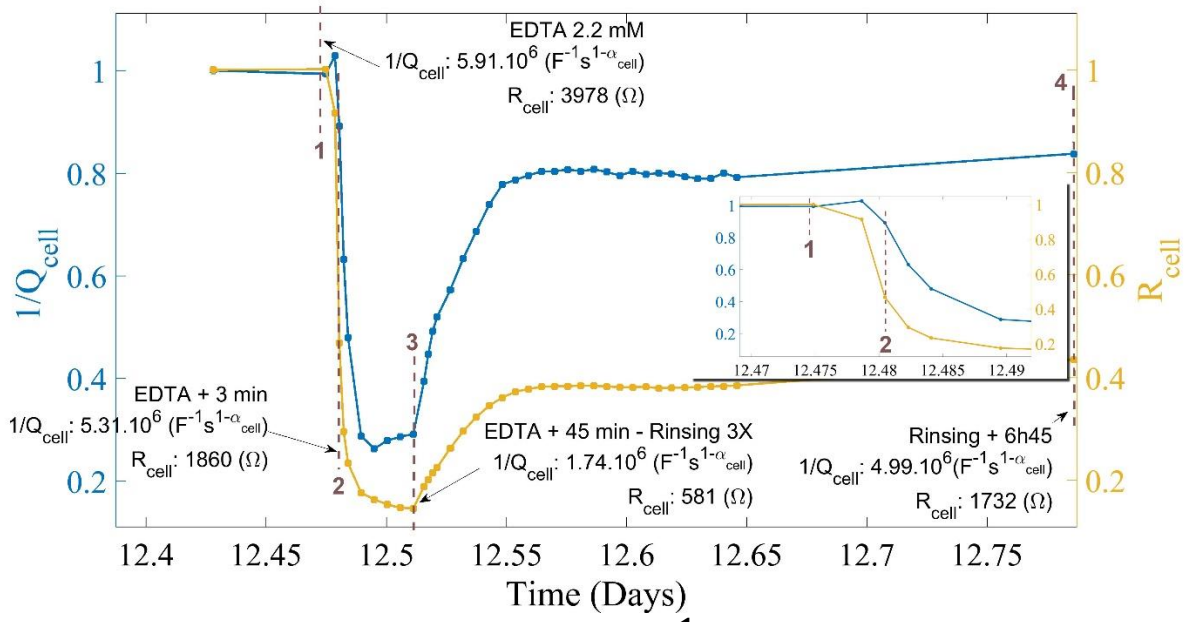

Figure 120 Evolutions des paramètres R_{cell} et $1/Q_{cell}$ après ajout de 2.2 mM d'EDTA dans le milieu de culture. Les valeurs de R_{cell} et $1/Q_{cell}$ sont normalisées par rapport au point qui précède l'ajout de l'EDTA pour pouvoir observer leurs variations relatives des deux paramètres

On remarque que les deux paramètres décroissent après ajout de l'EDTA. Cependant le paramètre $1/Q_{cell}$ décroit avec retard par rapport à R_{cell}. On explique ceci de la façon suivante. Après ajout de l'EDTA les jonctions serrées du tapis cellulaire sont perturbées et commencent à se désolidariser. Ceci correspond à l'intervalle de temps entre les repères 1 et 2 dans la Figure 120 soit 3 minutes. Dans la Figure 118 ceci a lieu avant la photo (B) et dans la Figure 119 au niveau de la photo (b) dans les premières minutes qui suivent l'ajout de l'EDTA pour lesquelles on a pas observé de changement au microscope. En effet si au départ seule la structure des filaments d'actine intercellulaires est perturbée on ne peut pas le visualiser directement au microscope. Dans [88] les auteurs utilisent 2 mM d'EGTA (qui possède une plus grande affinité au calcium que l'EDTA) puis visualisent l'effet sur les filaments d'actine par un marquage fluorescent à la phalloïdine, qui fait apparaitre une perturbation de ceux-ci.

Quand la perturbation des jonctions est prolongée alors les cellules changent finalement de forme pour se rapprocher pour certaines de la forme qu'elles ont juste après l'ensemencement. Le paramètre $1/Q_{cell}$ se met alors à décroitre et le paramètre R_{cell} continu de diminuer. Après

le rinçage le paramètre $^{1}/_{Q_{cell}}$ croit pour se rapprocher de sa valeur initiale. La différence avec sa valeur initiale est interprétée comme de possibles lacunes de cellules comme on a pu le constater dans la Figure 118. Dans un intervalle de temps identique le paramètre R_{cell} se stabilise à un niveau plus faible que le niveau initial. On interprète ceci comme la combinaison des possibles lacunes de cellules dans le tapis avec le fait que bien que les cellules soient à nouveau proches via leur tranche, la reformation des filaments d'actine et de la jonction est un processus plus long.

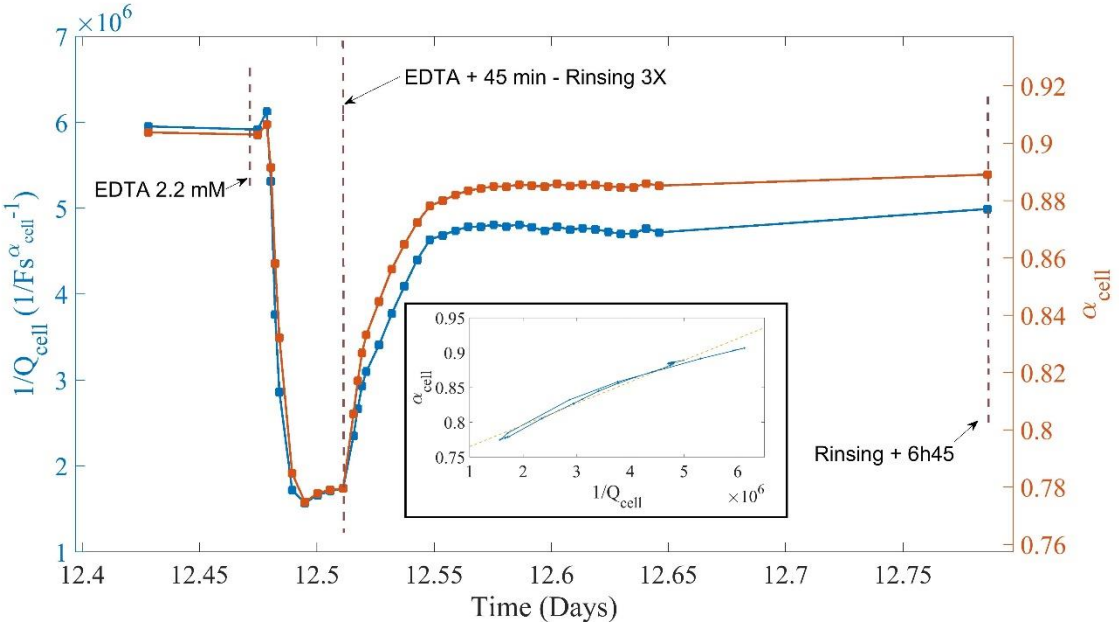

Figure 121 Evolutions des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} après ajout de 2.2 mM d'EDTA dans le milieu de culture

La Figure 121 montre les paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell}. On remarque que ces deux paramètres varient ensemble, et en particulier que le retard présent entre $^{1}/_{Q_{cell}}$ et R_{cell} n'apparait pas ici. On peut rapprocher ceci de ce qui a été présenté dans le chapitre précédent où on exprimait un lien entre ces deux paramètres. On compare tout de même $^{1}/_{Q_{cell}}$ avec R_{cell} car leur influence dans l'équation de l'impédance est similaire (ils apparaissent tous deux en quotient) alors que α_{cell} apparait en exposant dans l'équation de l'impédance du modèle qu'on rappelle ci-après.

$$Z = \frac{1}{Q_{electrode}(j\omega)^{\alpha_{electrode}}} + \frac{R_{cell}}{1 + R_{cell}Q_{cell}(j\omega)^{\alpha_{cell}}} + R_{med}$$

L'encadré Figure 121 montre α_{cell} en fonction de $^{1}/_{Q_{cell}}$. Bien que le lien entre ces paramètres soit logarithmique comme montré dans le Chapitre 3, on retrouve une corrélation presque linéaire dans la plage de variation observée et ainsi on peut considérer les variations de $^{1}/_{Q_{cell}}$ comme représentatives de celles de α_{cell}.

Les Figure 122 et Figure 123 montrent un essai identique au précédent (Figure 120 et Figure 121) mais pour lequel la valeur du paramètre $^{1}/_{Q_{cell}}$ retrouve un niveau plus proche du niveau initial. Dans la Figure 123 on retrouve encore une fois le lien presque linéaire entre $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell}.

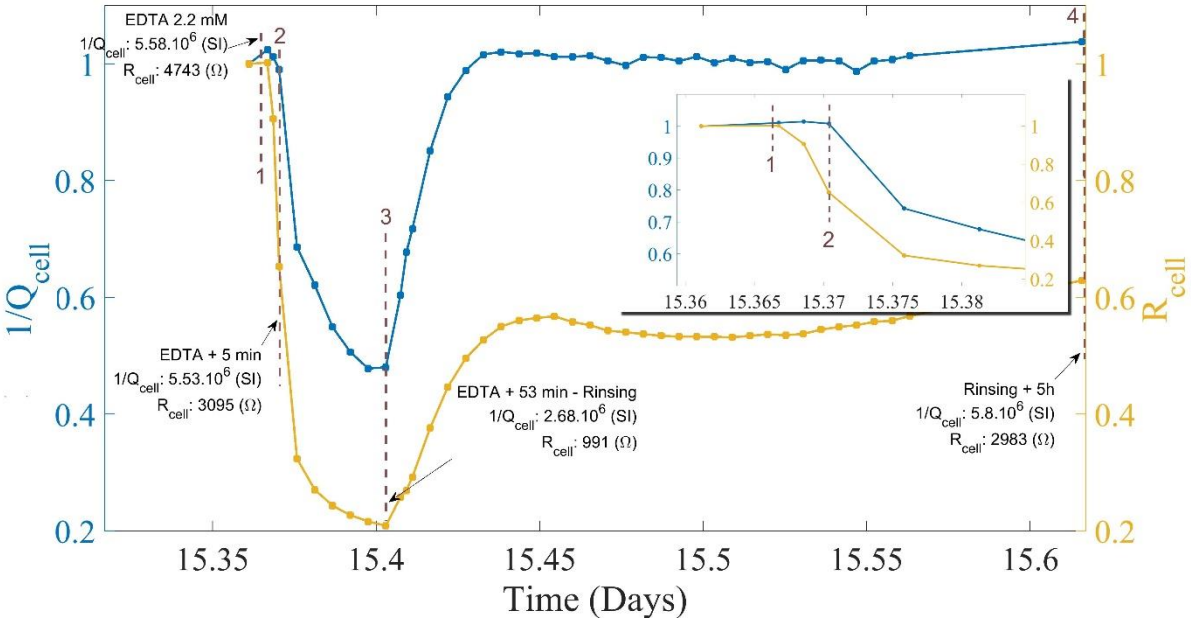

Figure 122 Evolutions des paramètres R_{cell} et $^{1}/_{Q_{cell}}$ après ajout de 2.2 mM d'EDTA dans le milieu de culture. Les valeurs de R_{cell} et $^{1}/_{Q_{cell}}$ sont normalisées par rapport au point qui précède l'ajout de l'EDTA pour pouvoir observer leurs variations relatives

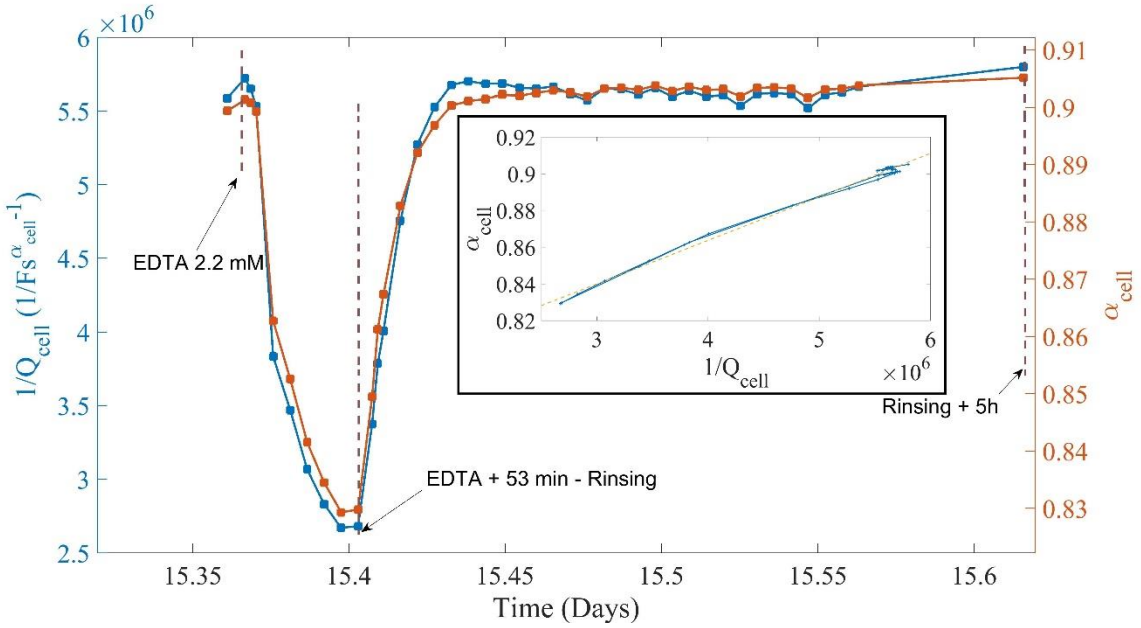

Figure 123 Evolutions des paramètres $^1/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} après ajout de 2.2 mM d'EDTA dans le milieu de culture

- Variations du paramètre reconstruit $^1/_{C_{eff}}$

On va maintenant visualiser les variations du paramètre reconstruit $^1/_{C_{eff}}$ à la place de $^1/_{Q_{cell}}$. Les Figure 124 et Figure 125 correspondent aux Figure 120 et Figure 122 présentées précédemment pour lesquelles on a remplacé $^1/_{Q_{cell}}$ par $^1/_{C_{eff}}$.

La capacité effective varie peu dans cette expérience quand on la compare à la résistance cellulaire. Ceci est cohérent car on s'attend à ce que l'effet capacitif du tapis cellulaire varie peu si les membranes cellulaires ne sont pas détruites. La différence avec le paramètre $^1/_{Q_{cell}}$ provient probablement du fait que $^1/_{Q_{cell}}$ est lié aux autres paramètres notamment α_{cell}. On a associé ce dernier à l'homogénéité de la capacité du tapis cellulaire. En effet dans cette expérience α_{cell} décroit ce qui n'est pas surprenant car on peut s'attendre à ce que la perturbation des jonctions modifie de manière inhomogène la capacité locale du tapis (en particulier si une partie des cellules du tapis commencent à se décoller) sans changer drastiquement la capacité moyenne.

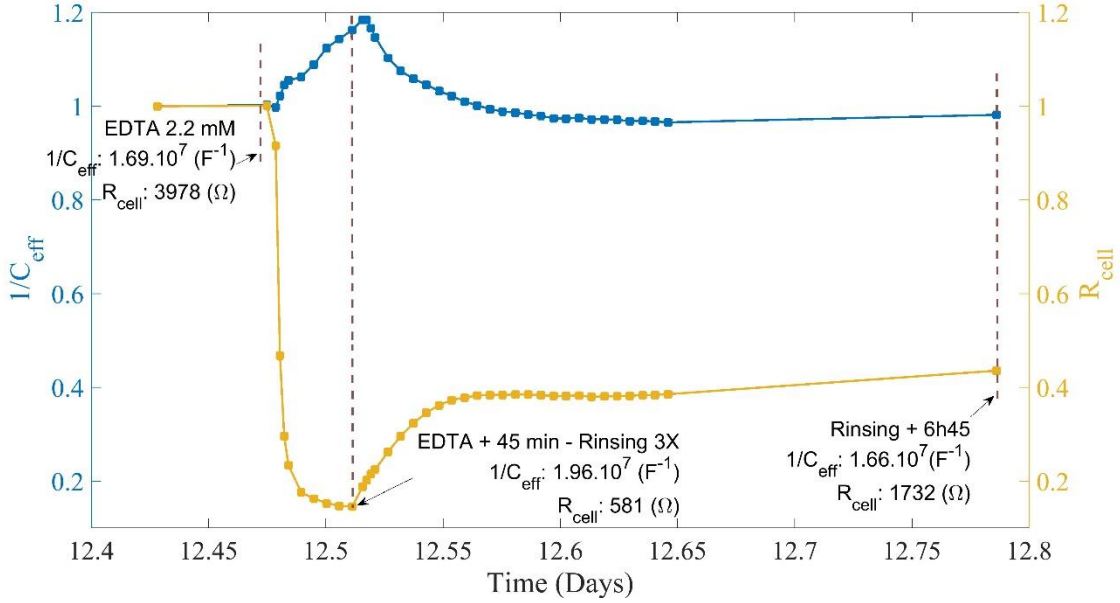

Figure 124 Evolutions des paramètres R_{cell} et $1/C_{eff}$ après ajout de 2.2 mM d'EDTA dans le milieu de culture. Les valeurs de R_{cell} et $1/C_{eff}$ sont normalisées par rapport au point qui précède l'ajout de l'EDTA pour pouvoir observer leurs variations relatives

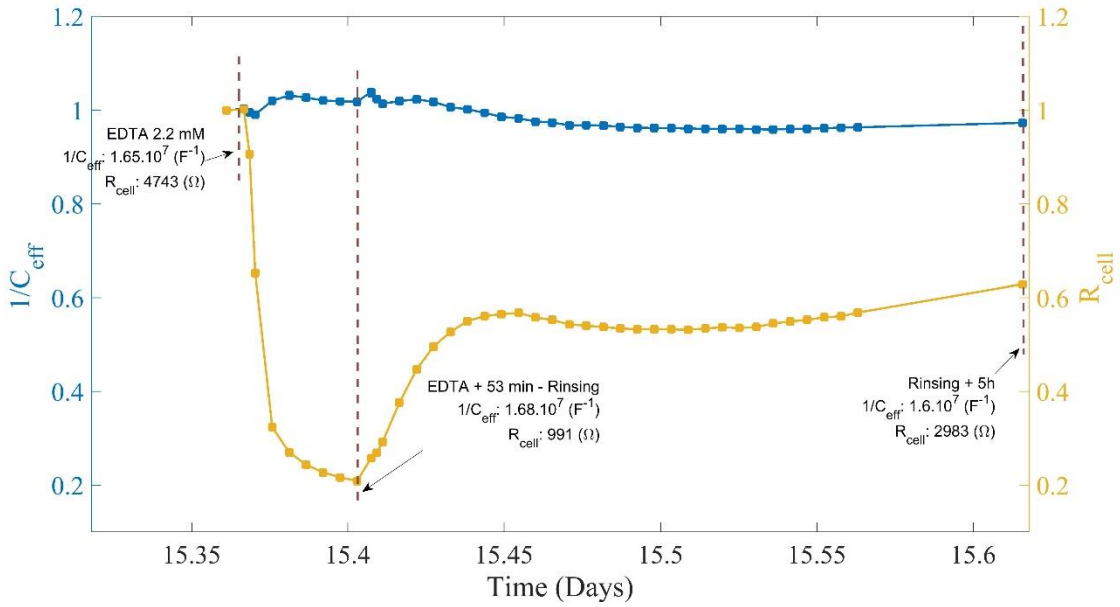

Figure 125 Evolutions des paramètres R_{cell} et $1/C_{eff}$ après ajout de 2.2 mM d'EDTA dans le milieu de culture. Les valeurs de R_{cell} et $1/C_{eff}$ sont normalisées par rapport au point qui précède l'ajout de l'EDTA pour pouvoir observer leurs variations relatives.

En ce qui concerne l'exposition à l'EDTA et en combinaison avec l'analyse bibliographique de [104] et [88] on conclut que les premières minutes d'exposition à l'EDTA perturbent les jonctions intercellulaires par chélation des ions calcium. Ceci se traduit par une variation significative de R_{cell} devant $1/Q_{cell}$. Puis si la perturbation est prolongée les cellules se décollent de l'électrode ce qui provoque la décroissance conjointe de R_{cell} et $1/Q_{cell}$.

Dans la sous-partie suivante on présentera un essai où la situation est inversée (décroissance de $1/Q_{cell}$ alors que R_{cell} reste globalement stable).

1.2. Réaction du tapis cellulaire au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Dans cet essai on expose le tapis cellulaire à une concentration de 100 µM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cependant une enzyme, la catalase, est présente dans de nombreux organismes. Cette enzyme catalyse la transformation d'H_2O_2 en dioxygène et en eau afin de contrer ses effets délétères. La catalase est notamment présente dans le sérum de veau fœtal utilisé durant la croissance cellulaire. Afin que l'action de l'H_2O_2 ne soit pas affectée par la présence d'une telle enzyme, on a rincé la culture avec du DMEM sans sérum plusieurs jours avant l'essai, et l'H_2O_2 est dilué dans une solution de DMEM qui n'en contient pas non plus. Le platine qui constitue les électrodes peut également catalyser la réaction de dismutation d'H_2O_2 toutefois comme les électrodes sont totalement couvertes de cellules au moment de l'expérience on ne prendra pas en compte cet effet. La solution finale à 100 µM est réalisée juste avant l'expérience à partir d'une solution concentrée qui est maintenue à 4°C et à l'abri de la lumière le reste du temps.

- Mesures effectuées

La Figure 126 montre la variation des paramètres R_{cell} et $1/Q_{cell}$ après changement du milieu de culture et après l'exposition du tapis cellulaire à la solution contenant l'H_2O_2. Comme pour la sous partie précédente, on a normalisé les deux paramètres par la valeur qui

précède l'ajout d'H_2O_2 afin de pouvoir visualiser leurs variations respectives. Les valeurs absolues des paramètres sont indiquées ponctuellement. Comme dans l'essai précédent avec l'EDTA, on remarque que les paramètres α_{cell} et $1/Q_{cell}$ varient ensemble (Figure 127). Des images sont prises avant et après l'exposition à l'H_2O_2. Celles-ci sont présentes dans la Figure 128 et on peut visualiser la date de la prise de vue sur la Figure 126. Hormis un léger changement morphologique des cellules (les images Figure 128 sont prises à 4 jours d'écart), il ne semble pas apparaitre de dommage particulier au tapis cellulaire après l'exposition à l'H_2O_2 à une concentration de 100 µM.

Au niveau des paramètres mesurés, Figure 126, on observe une variation significative de la résistance R_{cell} après changement du milieu pour du DMEM sans sérum. Le paramètre $1/Q_{cell}$ subit une faible décroissance mais retrouve rapidement un niveau stable.

Après l'ajout de l'H_2O_2 on observe une nette transition du paramètre $1/Q_{cell}$ qui se stabilise à une valeur inférieure à celle de l'état initial en un intervalle de temps d'environ 33 h. Le paramètre R_{cell} subi également une variation avant de se stabiliser à un niveau similaire à sa valeur juste avant l'exposition à l'H_2O_2. De plus à aucun moment celui-ci ne décroit en deçà de sa valeur avant l'exposition.

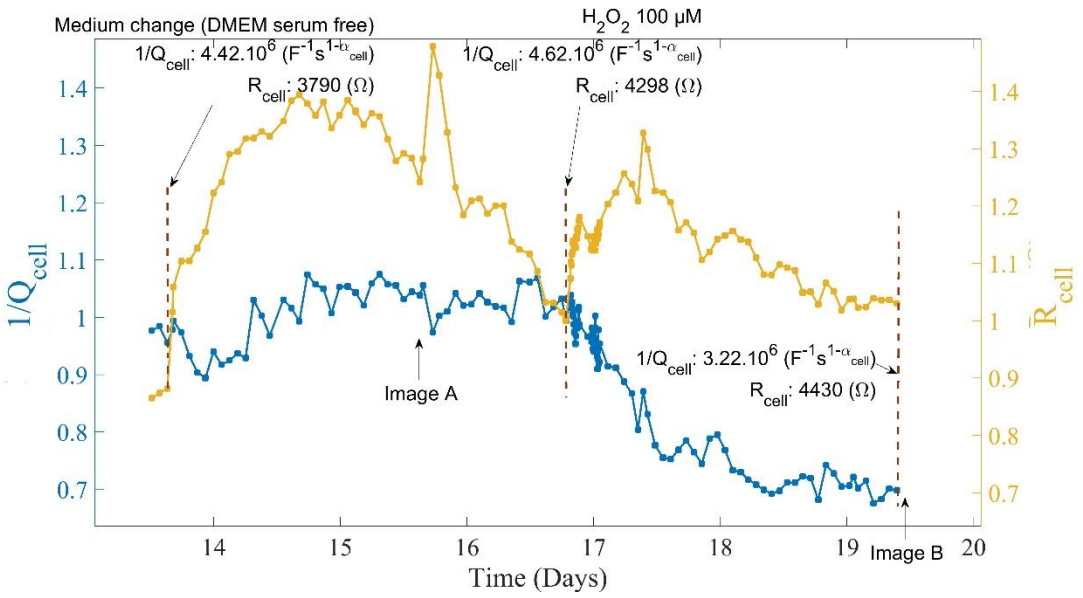

Figure 126 Variation des paramètres R_{cell} et $1/Q_{cell}$ pendant l'essai d'exposition du tapis à l'H_2O_2. Les paramètres sont normalisés par leur valeur pré-exposition. Les photos sont prises aux instants indiqués par les flèches.

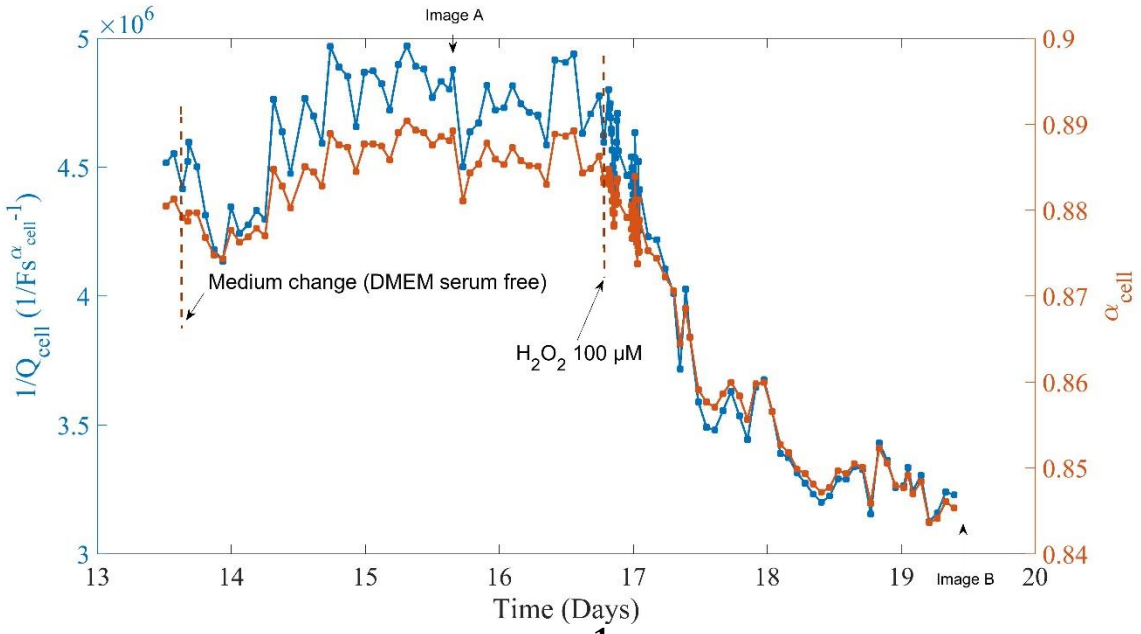

Figure 127 Variation des paramètres α_{cell} et $1/Q_{cell}$ pendant l'essai d'exposition du tapis à l'H_2O_2. Les photos sont prises aux instants indiqués par les flèches.

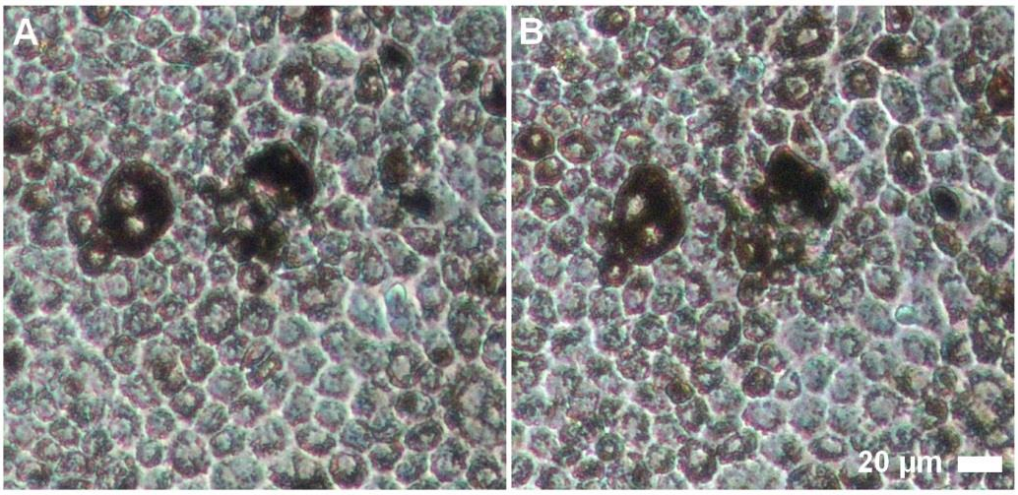

Figure 128 Photos au microscope avant (A) et après (B) l'exposition à H_2O_2

La Figure 129 montre les variations de R_{cell} et $1/C_{eff}$. Contrairement à $1/Q_{cell}$, le paramètre $1/C_{eff}$ reste stable relativement à R_{cell}. On interprète ceci comme le fait que la capacité globale du tapis cellulaire ne change pas ou peu suite à l'ajout de l'H_2O_2 à une concentration de 100 µM. Cependant la variation de $1/Q_{cell}$ présentée précédemment peut être reliée à la variation de α_{cell}. Ainsi la variation de $1/Q_{cell}$ pourrait s'expliquer par le fait que le tapis cellulaire n'est pas détruit (comme on peut le voir sur les images Figure 128) mais que l'action de l'H_2O_2 modifie les membranes de manière inhomogène (par exemple seulement la membrane supérieure en contact avec le milieu de culture).

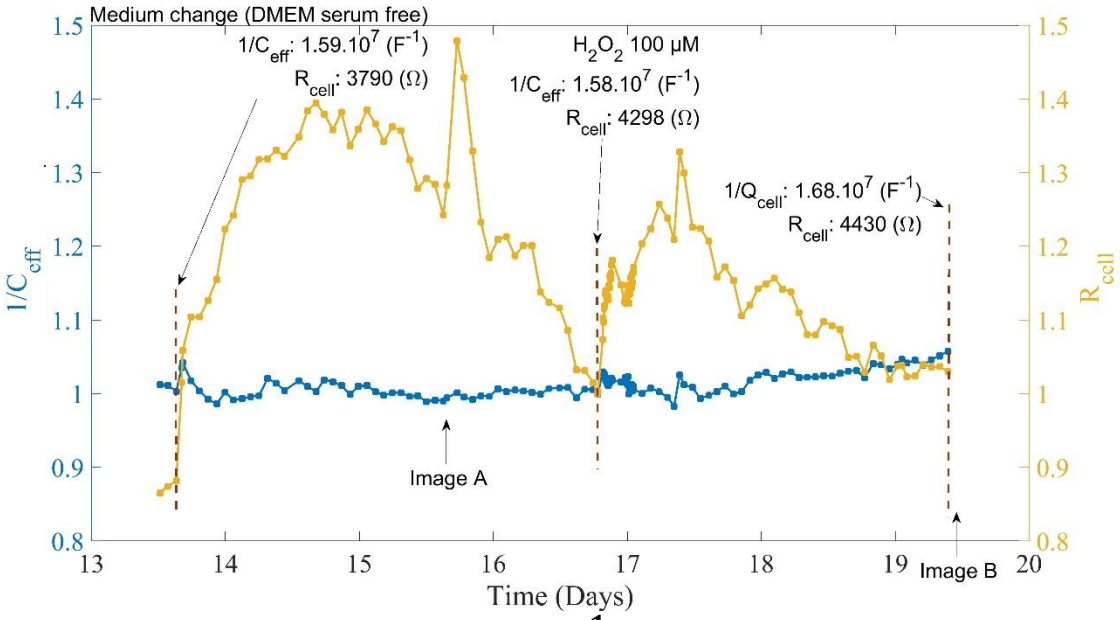

Figure 129 Variation des paramètres R_{cell} et $1/C_{eff}$ pendant l'essai d'exposition du tapis à l'H_2O_2. Les paramètres sont normalisés par leur valeur pré-exposition. Les photos sont prises aux instants indiqués par les flèches.

- Interprétation proposée

L'interprétation de ceci est délicate. Tout d'abord on peut affirmer que le changement dans les paramètres après ajout de l'H_2O_2 n'est pas un effet dû au changement du milieu car ceci est réalisé auparavant et ne donne pas un effet comparable, notamment sur le paramètre $1/Q_{cell}$.

Par ailleurs le peroxyde d'hydrogène peut modifier la nature de certains lipides insaturés des membranes, c'est la peroxydation lipidique. Ceci amène à la formation de lipides peroxydés pour lesquels la structure moléculaire a changé : deux atomes d'oxygène sont ajoutés et les doubles liaisons sont réorganisées (Figure 130). On propose que ceci a un effet sur le moment dipolaire de la molécule, qui à l'échelle de nos mesures a un effet sur le paramètre $1/Q_{cell}$. L'effet observé sur $1/Q_{cell}$ peut provenir d'une dé-homogénéisation des membranes puisque d'une part les lipides insaturés sont les plus sensibles à la peroxydation lipidique et ne constituent pas la totalité de la membrane. D'autre part, l'H_2O_2 ne peut réagir qu'avec la membrane supérieure des cellules dans notre cas.

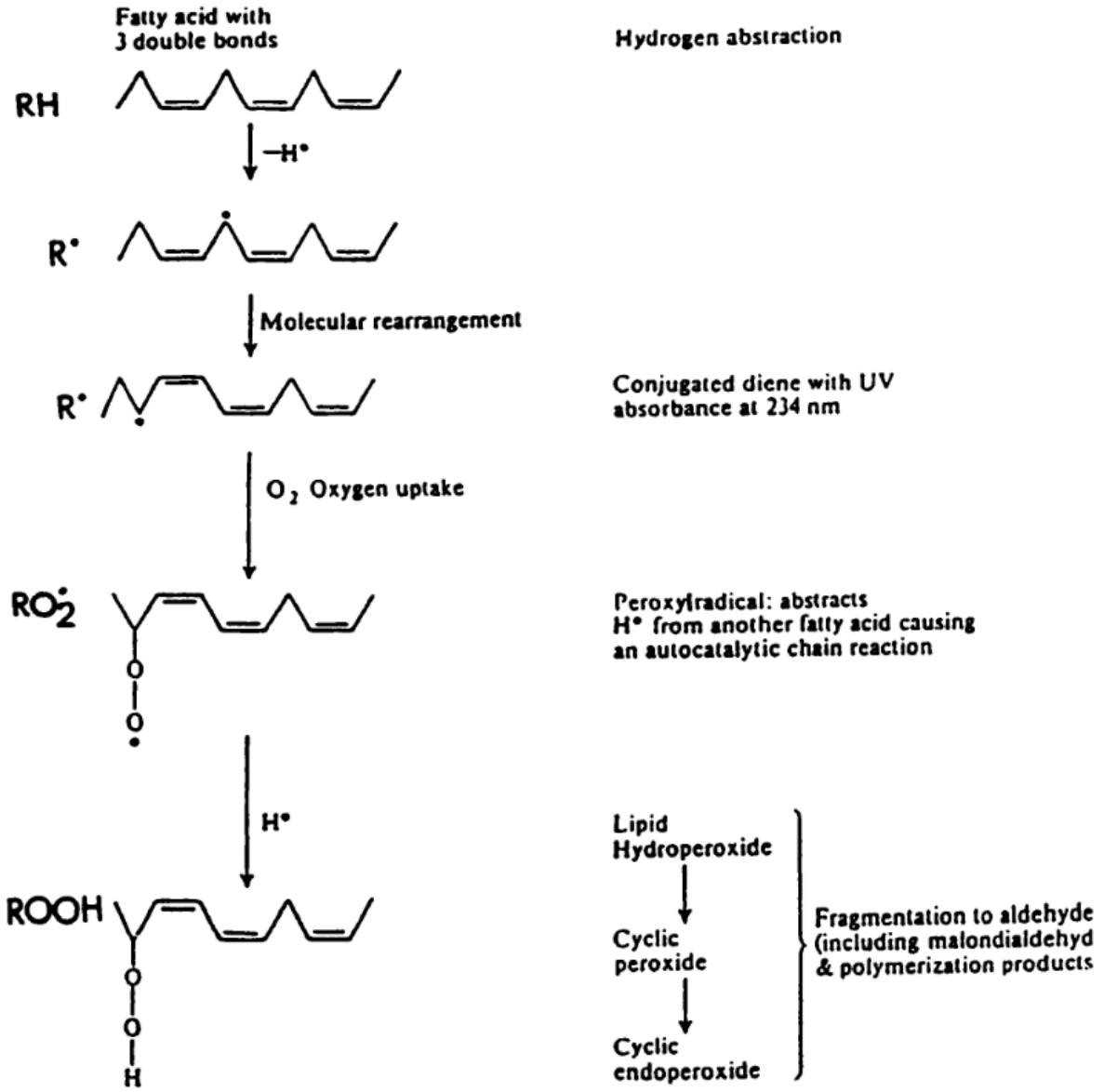

Figure 130 Réaction de peroxydation lipidique. Après sa formation $R0_2^{\blacksquare}$ peut à nouveau réagir avec RH ce qui fait de cette réaction une réaction en chaine. La réaction en chaine s'arrête quand deux radicaux réagissent entre eux. Extrait de [105].

Toutefois la formation de lipides peroxydés via l'H_2O_2 passe par l'intermédiaire du radical hydroxyle $OH^{\blacksquare}$ qui peut être formé par réaction de l'H_2O_2 avec l'ion ferreux (réaction de Fenton) :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + OH^- + OH^{\blacksquare}$$

Toutefois le milieu de culture utilisé ne contient pas d'ions ferreux. Des ions ferriques sont par contre présent dans le milieu de culture par la présence de nitrate de Fer (III). Ceux-ci peuvent être réduits en ion ferreux afin d'être ensuite utilisés durant la réaction de Fenton.

$$Fe^{3+} + H_2O_2 = Fe^{2+} + H^+ + HO_2^{\blacksquare}$$

Cependant cette réaction est environ 5000 fois plus lente que la réaction de Fenton [106] ($k = 0.01\ M^{-1}s^{-1}$ contre $51\ M^{-1}s^{-1}$).

De plus, d'une part la quantité d'ions ferriques potentiellement disponibles est très faible (0.74 µM) et d'autre part à pH physiologique ces ions précipitent presque complétement sous la forme d'hydroxyde de Fer (III) puisque sa constante de formation a une valeur très importante de 10^{38}. Les cellules utilisent donc le fer via sa liaison à différentes protéines de transport ou de stockage mais la capacité de celui-ci à réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former le radical hydroxyle dans ce cas est alors peu probable, et aurait donc de toute façon lieu avec une cinétique lente.

1.3. Destruction du tapis cellulaire par détergent ou par une contamination

Dans cette sous-partie on va observer l'effet d'une destruction totale du tapis cellulaire. Ceci est réalisé par l'ajout de détergent ou est subi quand on rencontre une contamination d'un quartier du dispositif. Le détergent utilisé est le produit qu'on utilise pour nettoyer le dispositif en fin de culture, c'est-à-dire du liquide vaisselle. Bien que sa composition ne soit pas précisément connue, celui-ci a pour conséquence la destruction du tapis cellulaire que l'on cherche à observer. On peut voir l'effet de celui-ci dans la Figure 134 qui montre l'électrode disque mesurée après la série de mesures.

Les Figure 131, Figure 132 et Figure 133 montrent l'évolution des paramètres associés à cette électrode après l'ajout du détergent.

Tous les paramètres décroissent immédiatement pour retrouver des valeurs proches de celles qu'ils avaient au jour 0 de la culture.

La résistance du milieu extracellulaire varie également puisqu'on modifie largement la concentration ionique du milieu de culture mais relativement peu par rapport à sa valeur initiale au jour 0 de la culture (379 Ω pour le milieu contenant du détergent contre 394 Ω au jour 0 de la culture montrée ici).

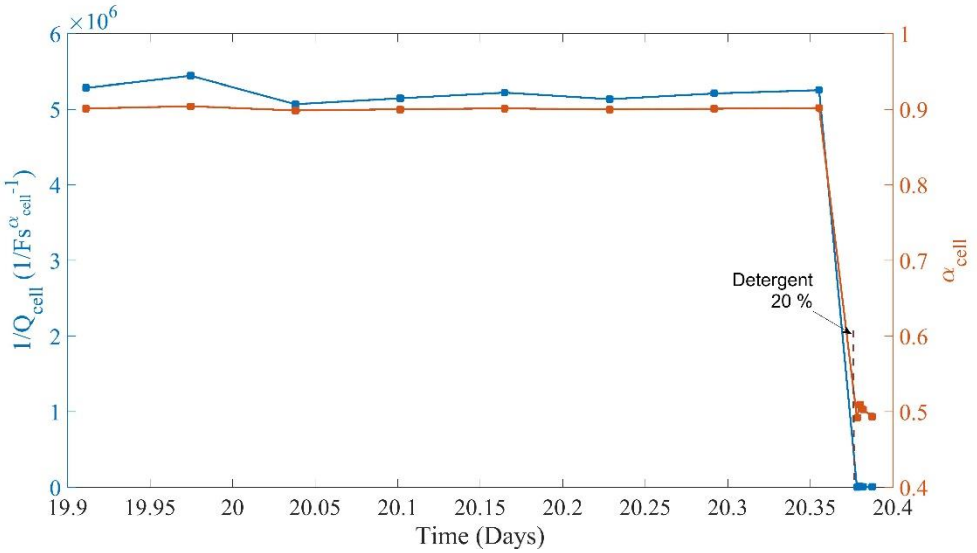

Figure 131 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} après ajout de détergent dans le milieu de culture à hauteur de 20 %

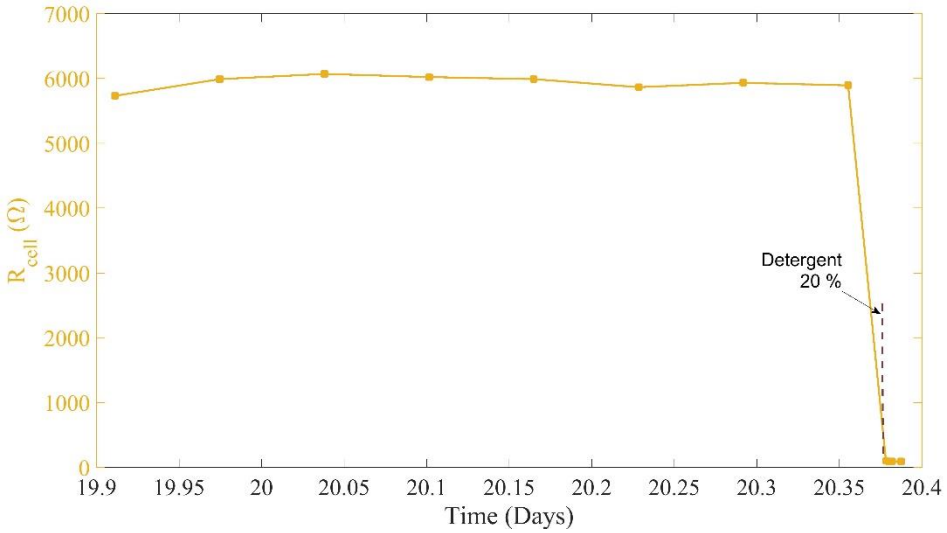

Figure 132 Evolution du paramètre R_{cell} après ajout de détergent dans le milieu de culture à hauteur de 20 %

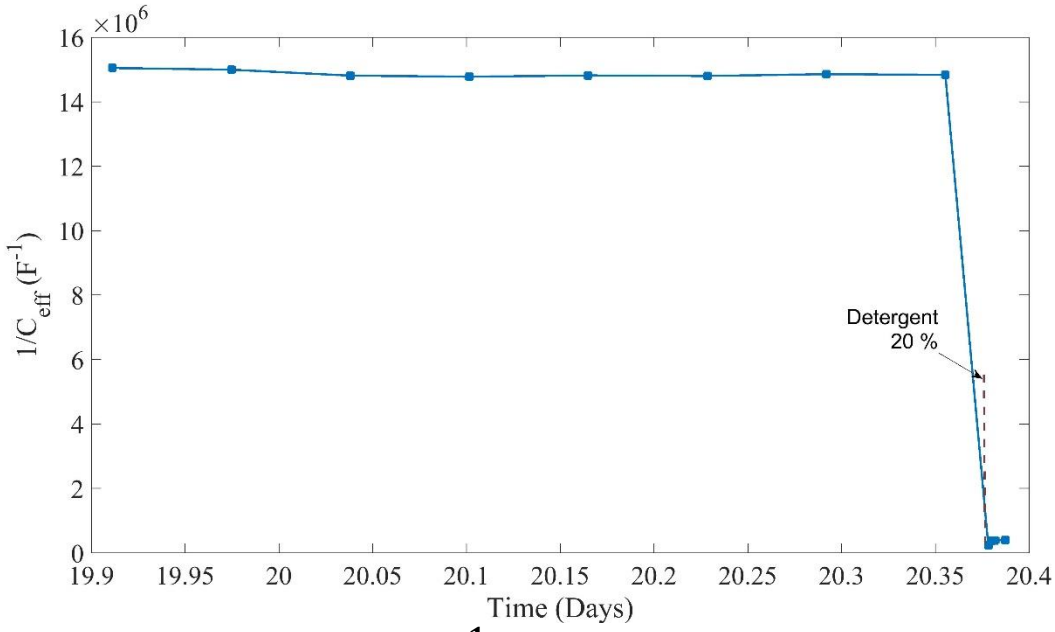

Figure 133 Evolution du paramètre $^{1}/_{C_{eff}}$ après ajout de détergent dans le milieu de culture à hauteur de 20 %

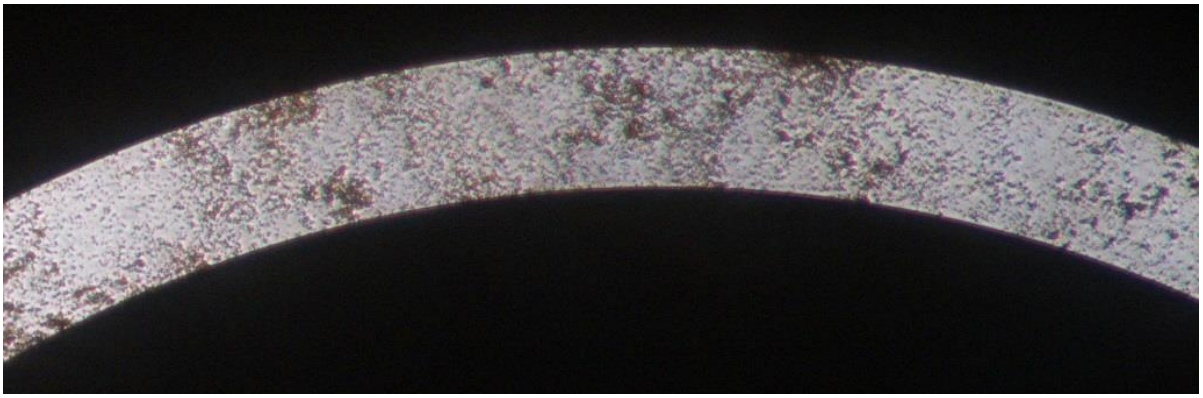

Figure 134 Electrode disque et tapis cellulaire détruit après l'ajout du détergent. On observe principalement les pigments qui étaient contenus dans les cellules, les membranes de ces dernières étant détruites. L'espace inter électrode est de 100 µm.

Un comportement semblable bien que s'étalant sur une durée plus longue (de l'ordre d'une dizaine d'heures à une journée) a lieu quand une contamination telle que montré dans la Figure 135 s'installe dans un quartier de l'électrode et a pour conséquence la destruction du tapis cellulaire.

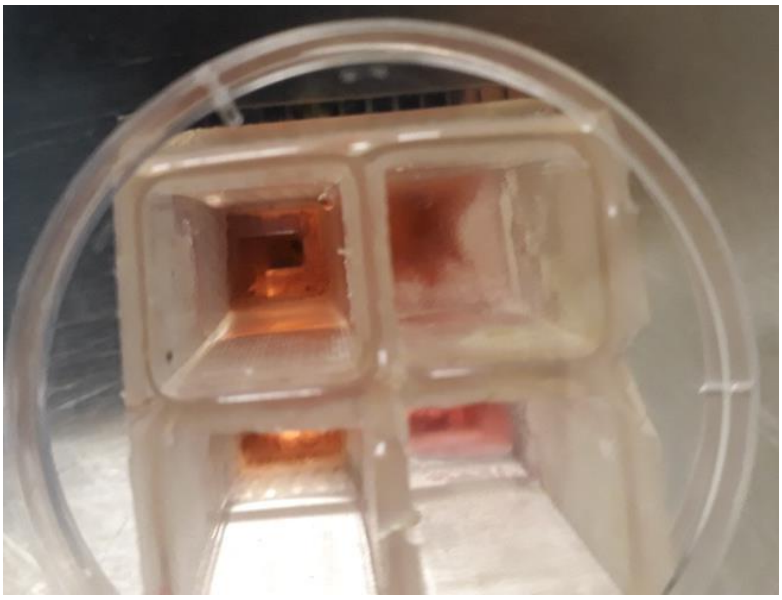

Figure 135 Contamination présente dans le quartier supérieur droit du dispositif. Le coté d'un quartier a une dimension de 10.75 mm.

2. Application du modèle à la réaction du tapis cellulaire durant l'exposition à la lumière bleue en présence de N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E)

- Introduction

La lumière bleu est suspectée d'être un facteur de risque pour le développement de maladies de la rétine telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Un récent (Mai 2019) rapport de l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) réitère une précédente recommandation de limiter l'exposition à celle-ci, particulièrement chez les enfants [107].

La lumière bleue peut avoir des effets multiples qui n'ont pas nécessairement tous la même origine moléculaire et les conditions de notre étude ne sont pas adaptées pour donner des conclusions sur la nature pathologique de la lumière bleue d'une manière générale, notamment puisqu'il s'agit d'une étude in-vitro. On utilise plutôt ceci comme un exemple d'application du modèle présenté précédemment dans un cas concret et moins contrôlé que les essais précédents. Les résultats seront interprétés en regard des expériences précédentes, et de la littérature. Une

étude [108] présente le suivi de l'impédance d'une culture de cellules ganglionnaires de la rétine soumise notamment à de la lumière bleu. Toutefois cette étude est faite à fréquence fixe et aucun modèle n'est employé, par ailleurs on n'étudie pas le même type de cellules ici.
A ce jour (Mai 2019) et sauf erreur, on ne trouve pas d'étude par impédance de l'épithélium pigmenté de la rétine soumis à de la lumière bleue en présence d'A2E, que ce soit à fréquence fixe ou à l'aide de l'extraction de paramètres d'un modèle comme c'est le cas ici. Ainsi l'interprétation des résultats se fera en proposant des hypothèses qui semblent vraisemblables sur la base de l'analyse faite dans la partie 1, et de la littérature concernant la biochimie des processus impliqués lors de l'exposition du tapis cellulaire à la lumière bleu en présence d'A2E.

- Mécanisme d'action de la lumière bleue

La lumière bleue interagit avec le tapis de cellules RPE par absorption via différents pigments, comme vu dans le Chapitre 1. Durant le vieillissement il s'accumule dans les cellules RPE de la lipofuscine, un sous-produit de la digestion intracellulaire par les lysosomes. Cette lipofuscine contient un chromophore, le N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E). Ainsi l'A2E s'accumule avec l'âge dans les cellules RPE. Ce chromophore absorbe la lumière dans une bande de longueur d'onde bleu (et apparait donc jaune orangé en lumière blanche). Quand ceci a lieu dans la cellule, il y a production d'espèces oxydantes qui peuvent mener à la dégradation du tapis cellulaire. La dégradation de l'épithélium pigmenté est associée à des pathologies de la rétine telles que la DMLA. La bande de longueur d'onde considérée est celle de 400 à 470 nm environ, avec un effet toxique maximal à 440 nm [96]. Dans notre cas on utilise une longueur d'onde de 430 nm.

- Déroulement de l'essai

Le déroulement de l'essai se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord au jour 0 on ensemence les cellules RPE dans les quartiers du dispositif. Le milieu de culture utilisé est le DMEM + 20 % SVF. Une fois la confluence atteinte on procède à l'incubation d'A2E. Cette étape a lieu afin

d'augmenter la concentration intracellulaire de sorte à simuler le vieillissement. L'incubation dure 6h et on utilise une concentration de 20 µM. On a représenté cette période sans mesures par une bande orange dans les figures. On conserve un quartier du dispositif comme témoin qui subit la même procédure mais sans A2E. Une fois l'incubation terminée, on remplace le milieu de culture par une version transparente du DMEM, identique à la précédente hormis l'absence de rouge de phénol. On utilise par ailleurs une concentration réduite de SVF, 10% afin de ne pas altérer la transparence du milieu. Avant d'éclairer les cellules on mesure l'impédance tel que réalisé dans les autres essais, et ce afin d'observer l'effet de la présence d'A2E dans l'obscurité. Ensuite on allume la lumière sur tout le dispositif et on poursuit les mesures. La lumière bleu est allumée avec un rapport cyclique de 25% et une période de 1s. On fait ceci pour limiter l'augmentation de température du milieu de culture. Ceci a en effet lieu si le rapport cyclique est fixé à 100 %. On a dans ce cas mesuré une température voisine de 40 °C au niveau du milieu de culture après stabilisation (pour considérer l'état stationnaire on a mesuré la température plus de 12h après avoir allumé la lumière). Dans le cas où le rapport cyclique est de 25% on mesure une température inférieure à 38°C ce qui est considéré convenable. En considérant un rapport cyclique de 25% l'irradiance moyenne est de 0.15 mW/cm² (l'irradiance mesurée est de 0.6 mW/cm² pour un rapport cyclique de 100 %).

- Résultats

La Figure 136 montre l'évolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} durant l'expérience alors que la Figure 137 montre celle de R_{cell}. La Figure 138 montre les paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et R_{cell} ensemble. Pour pouvoir comparer leurs variations relatives par l'effet de la lumière, on a normalisé leur valeur par le point qui précède l'allumage des LED.

Par ailleurs dans les Figure 139 et Figure 140 on s'intéresse au paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$.

Enfin la Figure 141 montre les images prises juste avant l'incubation de l'A2E et après l'exposition à la lumière bleue.

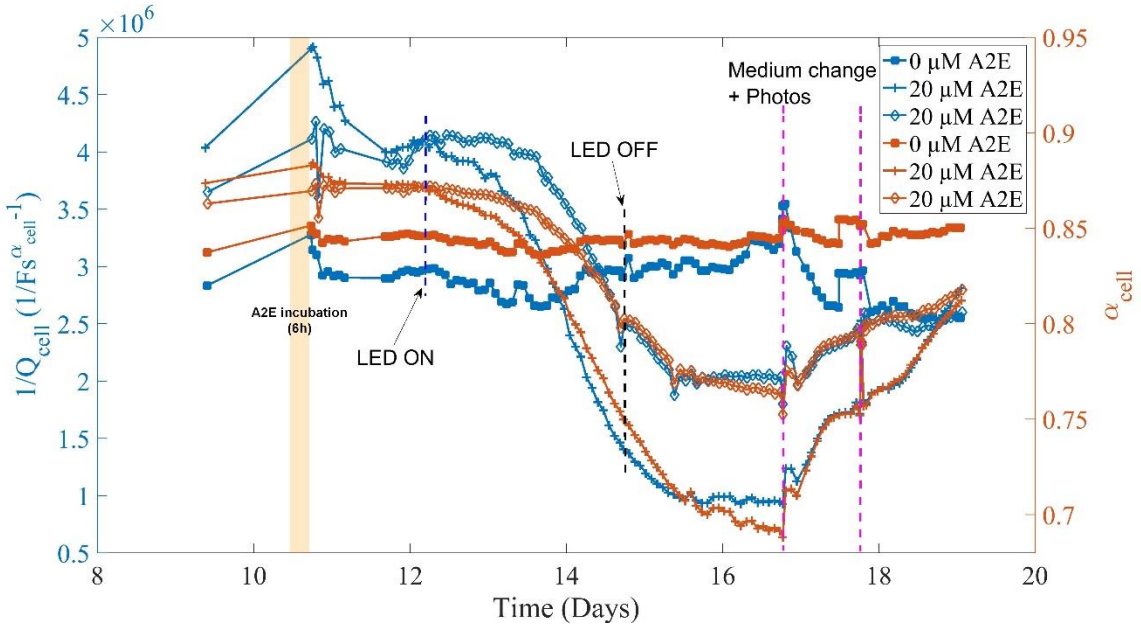

Figure 136 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} après incubation de l'A2E (bande orange) et après allumage de la lumière. Le quartier contenant 0 µM d'A2E est le quartier témoin.

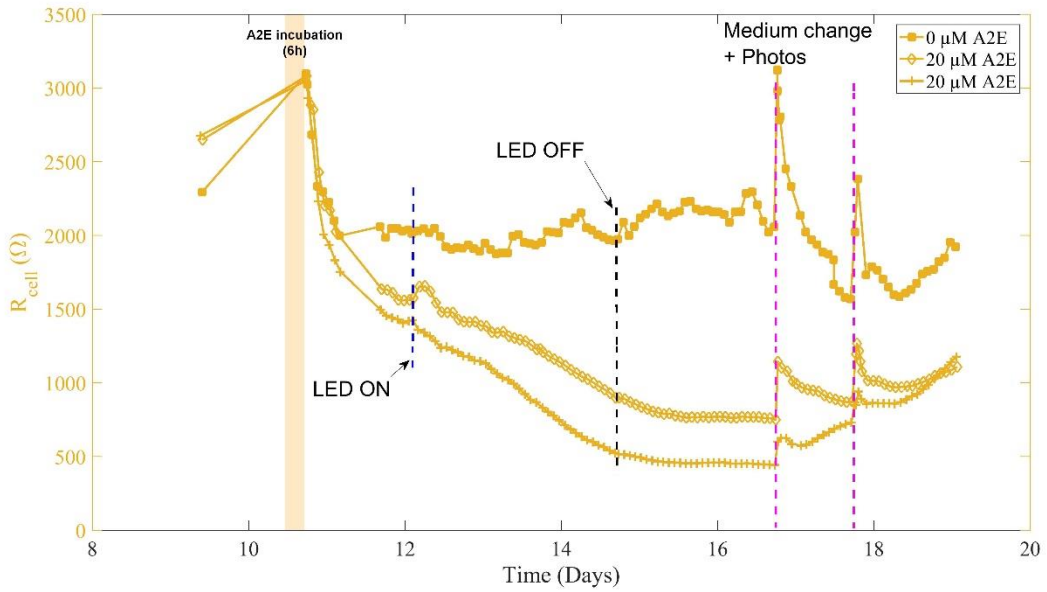

Figure 137 Evolution du paramètre R_{cell} après incubation de l'A2E (bande orange) et après allumage de la lumière. Le quartier contenant 0 µM d'A2E est le quartier témoin.

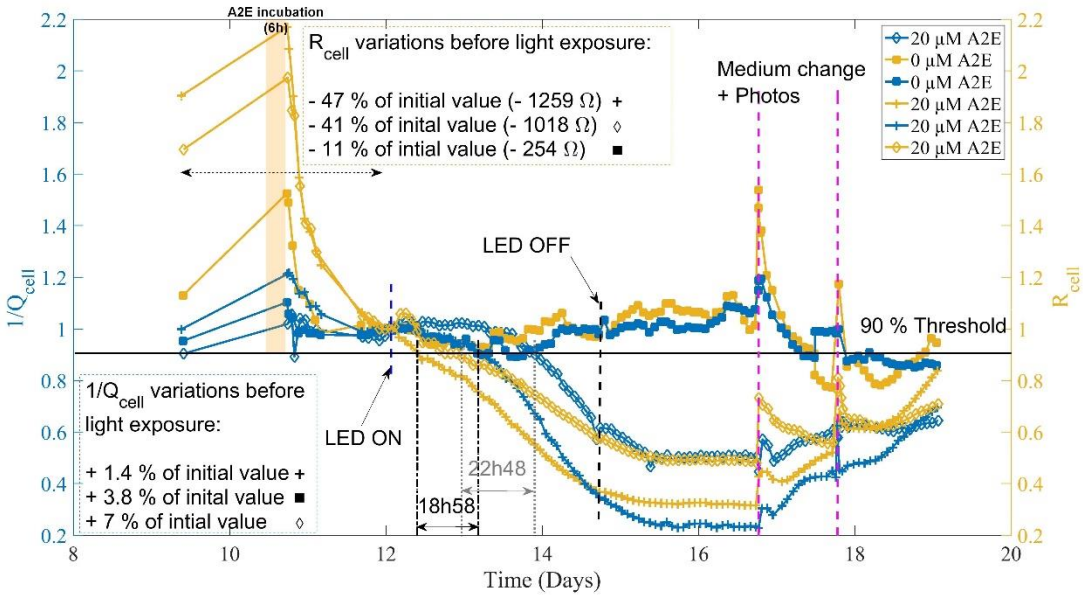

Figure 138 Evolution relative des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et R_{cell} après incubation de l'A2E (bande orange) et après allumage de la lumière. On a normalisé chaque paramètre par sa valeur qui précède l'allumage des LED. Le quartier contenant 0 µM d'A2E est le quartier témoin.

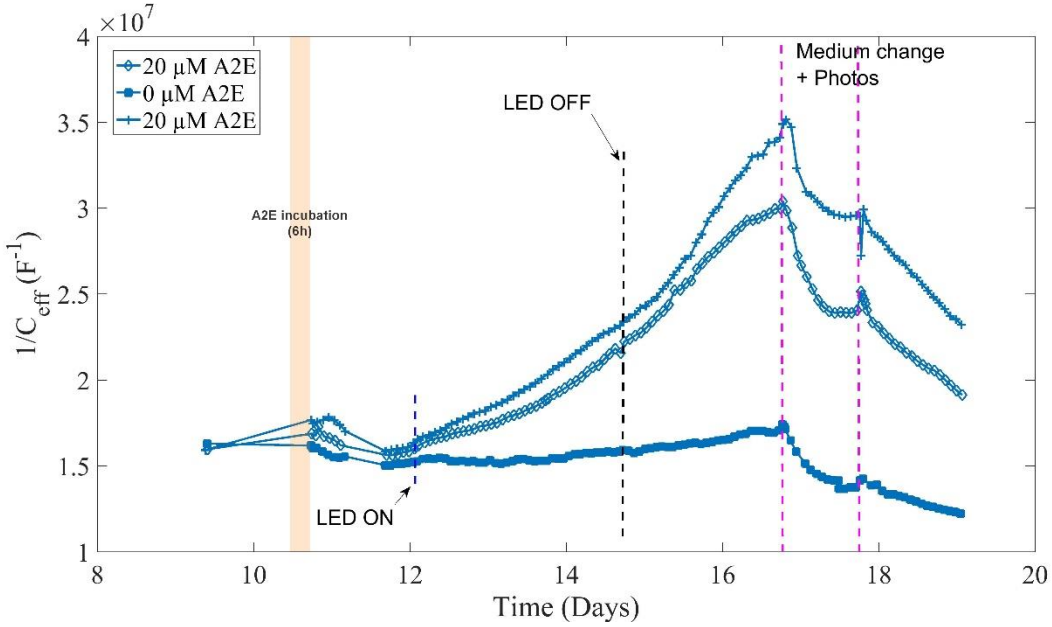

Figure 139 Evolution du paramètre $^{1}/_{C_{eff}}$ après incubation de l'A2E (bande orange) et après allumage de la lumière. Le quartier contenant 0 µM d'A2E est le quartier témoin.

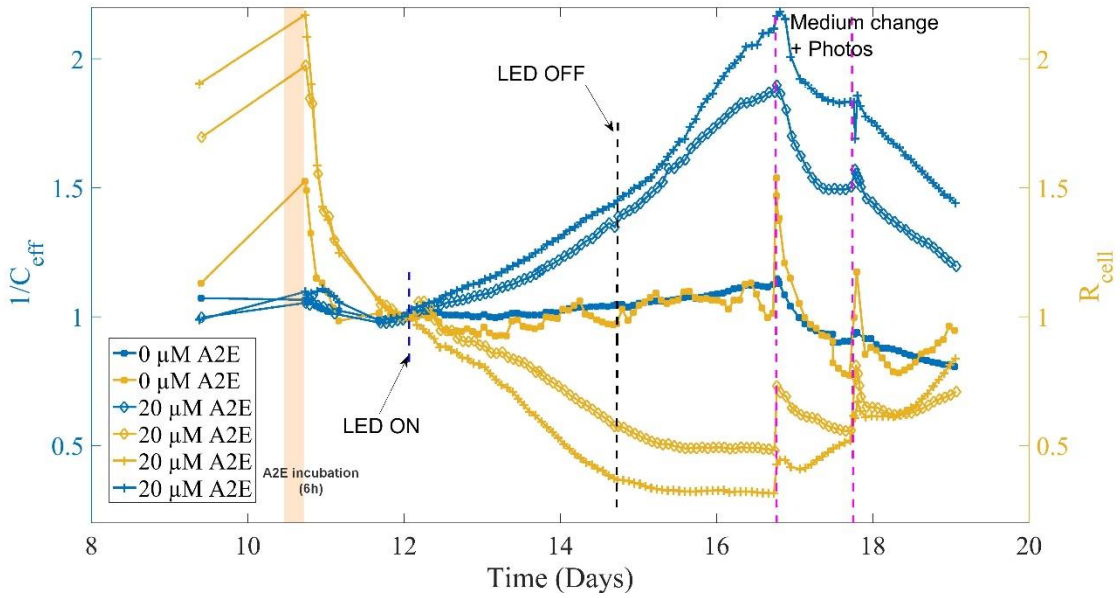

Figure 140 Evolution relative des paramètres $^{1}/_{C_{eff}}$ et R_{cell} après incubation de l'A2E (bande orange) et après allumage de la lumière. On a normalisé chaque paramètre par sa valeur qui précède l'allumage des LED.

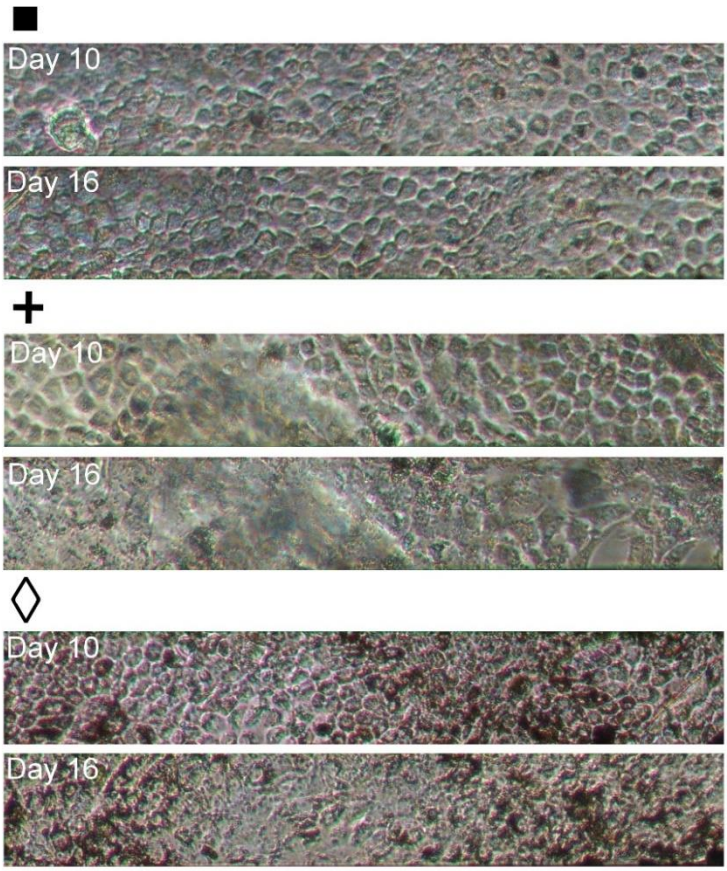

Figure 141 Photos avant l'incubation de l'A2E (J 10) et après exposition à la lumière (J 16) pour le témoin (carré) et les deux quartiers incubés avec 20 µM d'A2E (croix et losange)

- Effet de l'A2E seul

On s'intéresse tout d'abord à l'effet de l'A2E seul, c'est-à-dire avant exposition à la lumière. En observant la Figure 136 on remarque que le paramètre $^{1}/_{Q_{cell}}$ (tout comme α_{cell}) reste globalement stable dans toute la période qui précède l'exposition à l'A2E. C'est aussi le cas du paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$. En ce qui concerne R_{cell} en revanche, si on observe la Figure 137 celui-ci se stabilise dans les trois cas à une valeur inférieure à celle que ce paramètre avait avant l'étape d'incubation. On remarque cependant que cette variation est plus importante dans le cas des quartiers qui ont reçu de l'A2E (-44 % en moyenne contre -11 % pour le témoin). La perturbation du tapis cellulaire lors des différents changements de son environnement joue probablement un rôle dans la variation de ce paramètre, ce qui explique également la variation observée sur le quartier témoin. Toutefois cette variation est plus

importante en présence d'A2E. On en déduit que l'exposition à l'A2E à une concentration de 20 µM semble avoir un effet sur le tapis cellulaire en tant que tel, c'est-à-dire avant que l'A2E n'absorbe de lumière bleue. Cet effet a lieu sur le paramètre R_{cell} uniquement. Si on met ceci en relation avec ce qui a été observé dans la partie 1.1, on peut interpréter cette variation comme un comportement analogue aux premières minutes de l'exposition à l'EDTA. Ainsi l'A2E seul produirait donc une perte de l'intégrité des jonctions cellulaires sans provoquer de pertes de cellules dans le tapis ni de modification des membranes, à ce stade des mesures.

- Effet de l'A2E en présence de lumière bleue

Le début de l'exposition à la lumière bleue est indiqué sur les différentes figures. On observe que les paramètres $1/Q_{cell}$ et R_{cell} décroissent alors tous les deux pour les deux quartiers ayant reçu de l'A2E. Les paramètres du quartier témoin restent stables. Comme les deux paramètres $1/Q_{cell}$ et R_{cell} décroissent on va concentrer l'analyse sur la Figure 138 afin d'observer leurs variations relatives. La barre verticale indique un seuil de 90 % par rapport à la valeur qui précède l'exposition. Ce seuil est franchi à des instants significativement différents pour les deux paramètres et ce dans les deux cas observés. En effet dans les premières heures d'expositions à la lumière bleue en présence d'A2E le paramètre R_{cell} décroit alors que $1/Q_{cell}$ reste stable avant de finalement décroitre. Le seuil de 90 % est choisi de manière arbitraire pour donner une indication du retard dans la variation des deux paramètres. Le retard de $1/Q_{cell}$ sur R_{cell} est en moyenne de 20h53. Ce retard est toutefois rattrapé par la décroissance plus rapide de $1/Q_{cell}$. En ce qui concerne le paramètre reconstruit $1/C_{eff}$, celui-ci augmente sans retard significatif par rapport à R_{cell} (Figure 140). On peut en déduire que rapidement après l'exposition à la lumière les parties du tapis cellulaires qui ont été exposés à l'A2E commencent à se dégrader (de manière homogène puisque $1/Q_{cell}$ reste stable). Ensuite la dégradation continue ce qui amène à un changement morphologique plus important du tapis cellulaire, en particulier pour les cellules qui auraient absorbé plus d'A2E ce qui a pour conséquence la variation retardée de $1/Q_{cell}$.

L'absorption de la lumière bleue par l'A2E a un effet délétère sur les mitochondries [109] et il a été montré que l'A2E peut produire des espèces réactives de l'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène ou l'oxygène singulet, ce dernier peut réagir avec d'autres molécules d'A2E pour produire des molécules qui provoquent des dommages à l'ADN et aux membranes cellulaires qui mènent à la destruction de la cellule [110], [111], [112].

La mesure d'impédance ne nous permet pas de conclure sur ce qui aurait lieu au niveau des mitochondries ou de l'ADN toutefois on observe effectivement une altération plus importante du tapis cellulaire après l'exposition à la lumière bleue pour les quartiers qui ont reçu de l'A2E que pour le témoin (Figure 141) particulièrement sur l'image (+).

Cependant ces images servent d'illustration mais ne sont pas tout à fait représentatives de l'ensemble des cellules mesurées, puisque la surface mesurée est plus grande que la zone photographiée et que le champ d'observation est limité par la taille des cellules qu'on souhaite visualiser. Après deux changements du milieu de culture (DMEM + 10 % SVF puis DMEM + 20 % SVF) les puits qui ont reçu de l'A2E voient leurs paramètres se rapprocher de leurs valeurs initiales. Ceci a lieu lentement et provient probablement de la division de cellules qui avaient survécu. En effet l'absorption intracellulaire de l'A2E se fait de façon inhomogène dans le tapis cellulaire.

3. Application du modèle à la réaction du tapis cellulaire suite à des impulsions électriques

Dans cette dernière application de perturbation du tapis cellulaire, on va appliquer des impulsions électriques sur celui-ci. Un suivi d'impédance similaire a déjà été réalisé dans [84]. Cependant la mesure présentée est à fréquence fixe. Par ailleurs les impulsions utilisées dans [84] ont pour but de détruire le tapis cellulaire afin d'observer ensuite sa reconstruction dans un contexte de cicatrisation. Dans notre cas on va utiliser des impulsions plus courtes en en nombre nettement réduit, afin de tenter de ne pas détruire les cellules. On va par ailleurs appliquer le modèle précédemment décrit et analyser la variation de ses paramètres. Les

mesures sont effectuées sur l'électrode disque pour qu'on puisse les comparer à celle réalisés dans les autres essais.

3.1. Déroulement de l'essai

On utilise des impulsions biphasiques (positives puis négatives) de champ électrique de l'ordre de 500 $\mathrm{Vcm^{-1}}$ sous une tension de ±8V avec une demi-période de 100 µs. Des impulsions biphasiques sont utilisées pour équilibrer les charges injectées dans l'électrode, et ainsi éviter qu'un potentiel élevé ne soit maintenu trop longtemps ce qui peut produire des réactions électrochimiques. On applique 10 de ces impulsions à 1s d'intervalle puis la mesure d'impédance est immédiatement démarrée. Pour cet essai et afin d'obtenir un temps de mesure plus court, on a réduit le nombre de points d'acquisition du spectre à 5 points/décade. Les Figure 142 et Figure 143 montrent la norme du champ électrique dans l'espace inter électrodes simulée avec le logiciel Comsol dans un plan 5 µm au-dessus de la surface de celle-ci. Ces simulations sont utilisées pour avoir une idée de la forme du champ électrique auquel sont soumises les cellules, ainsi que la distribution spatiale de celui-ci. Comme les électrodes sont très proches on obtient un champ électrique important avec une tension relativement faible.

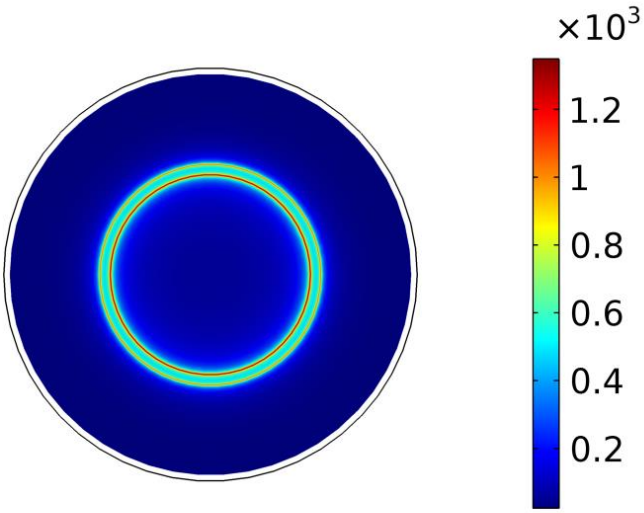

Figure 142 Champ électrique dans un plan 5 µm au-dessus de la surface de l'électrode disque de (diamètre 1880 µm/ espace inter-électrodes 100 µm) pour une tension appliquée de 8V. L'échelle de couleur indique les valeurs en V/cm.

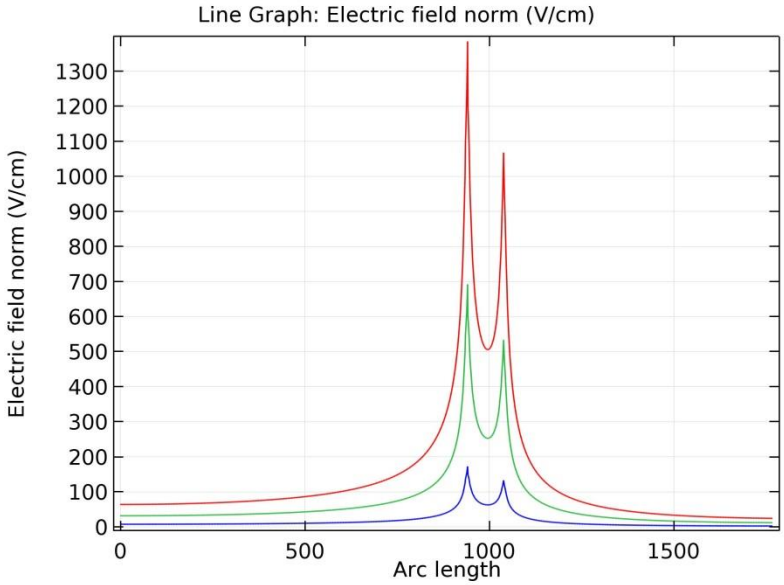

Figure 143 Valeur du champ électrique (V/cm) entre électrode disque et électrode de référence (dans un plan 5 µm au-dessus de la surface de l'électrode) quand on applique 1V (bleu), 4V (vert) et 8V (rouge).

- Mécanisme d'action

Soumettre les membranes lipidiques des cellules à un tel champ peut amener, si l'amplitude est importante, à la réorganisation temporaire des phospholipides qui constituent la membrane [113].

Ceci peut également amener à la formation de pores (électroporation). En fonction de l'amplitude du champ électrique et de sa durée d'application. La Figure 144 montre différentes conséquences possibles sur les cellules en fonction de ces paramètres.

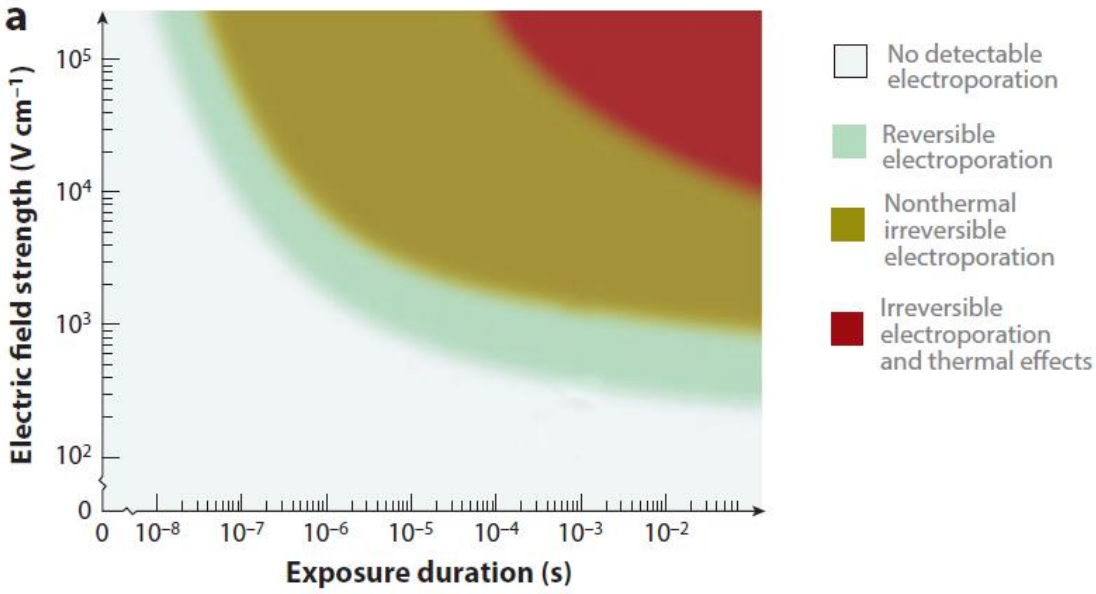

Figure 144 Conséquences possibles de l'application d'un fort champ électrique sur les membranes cellulaire en fonction de l'amplitude et de la durée de celui-ci. Adapté de [113].

On se trouve donc dans une zone ou peut avoir lieu une électroporation réversible. Toutefois la nature de l'électroporation (présente, non présente, réversible, non réversible) ne pourrait être établie avec certitude qu'en utilisant des marquages colorés ou autres tests biochimiques sur le tapis cellulaire.

- Description des perturbations appliquées

On va présenter 3 essais. Dans les deux premiers essais des impulsions biphasiques d'amplitude ± 8V (environ ± 500 $\mathrm{Vcm^{-1}}$) et de demi-période 100 µs sont appliquées entre électrode et référence du même quartier (configuration mono-quartier) et la mesure d'impédance est réalisée soit en configuration inter-quartier (première série de courbes) soit en configuration mono-quartiers (seconde série de courbes).

Le 3ème essai est identique du point de vue des impulsions. Cependant on applique maintenant celles-ci en configuration inter-quartiers tout comme la mesure d'impédance. Les configurations de mesure dans le cas des puits à débordement ont été présentées dans le Chapitre 3, Figure 46. Dans ce chapitre on rappelle ceci en encadré de chaque figure.

Le champ électrique provoqué par de telles impulsions, dans la configuration mono-quartier est simulé avec Comsol (courbe rouge dans la Figure 143). Il est très peu homogène. En configuration inter-quartiers le champ électrique est plus faible puisque les deux électrodes sont plus éloignées. Toutefois la présence de l'électrode de référence de la configuration mono-quartier, même si celle-ci est flottante (non connectée), perturbe la distribution du champ électrique.

3.2. Résultats et interprétations

Dans les deux premiers essais (Figure 145 à Figure 150) pour lesquels les impulsions sont appliquées en configuration mono-quartier, on n'observe pas de différence importante hormis un temps de retour à la valeur pré-impulsion plus court pour les paramètres $\boldsymbol{1/Q_{cell}}$ et $\boldsymbol{\alpha_{cell}}$ du deuxième essai. En particulier ces deux paramètres varient toujours ensemble, même pour le troisième essai, ce qui ne change pas par rapport aux essais précédents.

Dans les deux premiers essais on a également un ordre de variation des paramètres identique. Le paramètre $\boldsymbol{1/Q_{cell}}$ décroit en effet immédiatement après l'impulsion alors que le paramètre $\boldsymbol{R_{cell}}$ décroit avec retard. Ceci est le comportement opposé à ce qu'on a vu dans l'essai d'exposition à l'EDTA partie 1.1, pour lequel le paramètre $\boldsymbol{R_{cell}}$ variait avant $\boldsymbol{1/Q_{cell}}$.

Dans le cas des impulsions appliquées ici on va supposer qu'on a effectivement électroporé une partie du tapis cellulaire. Le retour aux valeur pré-impulsions dans un intervalle de temps de l'ordre de l'heure amène à penser que les dommages au tapis cellulaire ont eu lieu de manière réversible.

Cependant le fait que $\boldsymbol{R_{cell}}$ varie avec retard amène à penser que celui-ci ne représente pas des pores formés mais bien des perturbations des jonctions comme ce qu'on a vu avec l'EDTA.

En effet en principe si des pores sont formés par l'électroporation des membranes on devrait voir une décroissance du paramètre R_{cell} immédiatement après l'impulsion. La durée de vie de tels pores peut varier de quelques secondes voire centaines de milliseconde à plusieurs heures ce qui pourrait être cohérent avec la dynamique de R_{cell} observée [114], [113]. Toutefois on utilise ici des champs électriques relativement faibles ce qui va dans le sens d'une réduction de la durée de vie des pores. Par ailleurs si on visualisait l'ouverture des pores alors on devrait mesurer une variation conjointe de R_{cell} et de $1/Q_{cell}$. Ainsi du fait de l'échantillonnage temporel de notre mesure on considère qu'on ne visualise pas de telles variations. La variation de $1/Q_{cell}$ correspondrait donc au fait que dans les minutes qui suivent l'application des impulsions et bien que les pores soient déjà globalement refermés, les phospholipides des membranes n'ont pas encore retrouvé la configuration qu'ils avaient dans l'état pré-impulsion et ont donc une distribution inhomogène dans le tapis cellulaire, particulièrement autour de l'électrode, là où le champ électrique est le plus fort. Ce serait donc l'inhomogénéité dans la modification des membranes du tapis qu'on visualiserait.

➢ **Premier essai : impulsions mono-quartier/mesures inter-quartiers**

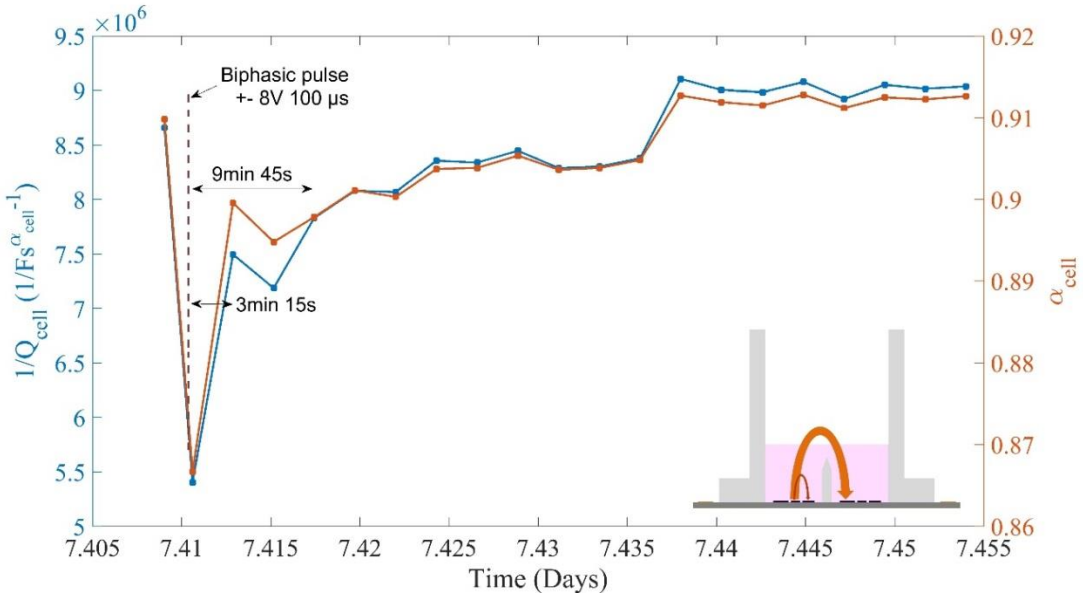

Figure 145 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions sont appliquées en configuration mono-quartier (rouge dans le dessin) et la mesure d'impédance est effectuée en configuration inter-quartier (orange dans le dessin).

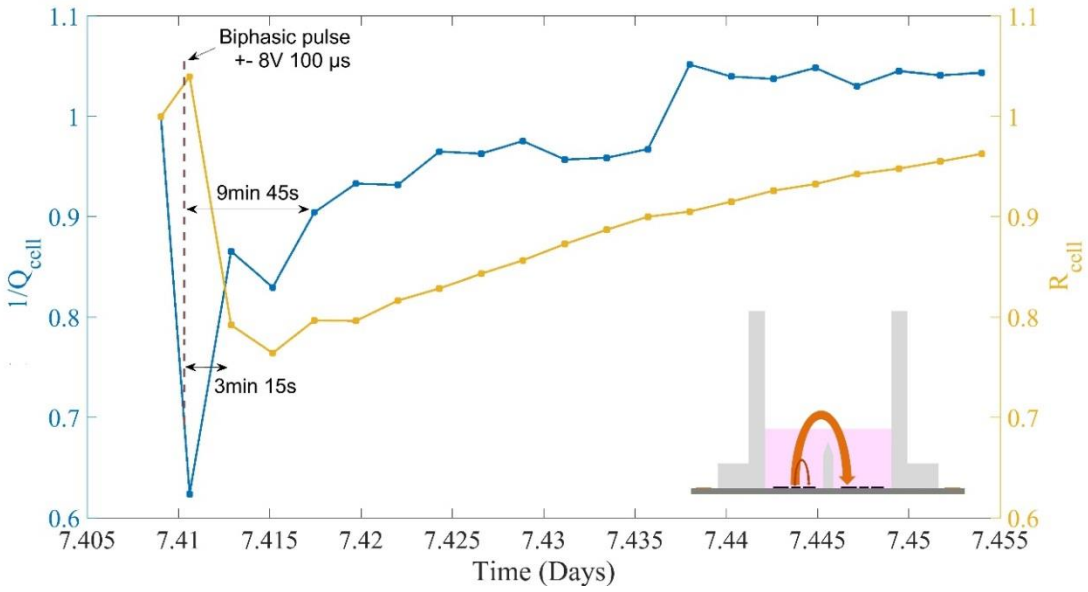

Figure 146 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et R_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions sont appliquées en configuration mono-quartier (rouge dans le dessin) et la mesure d'impédance est effectuée en configuration inter-quartier (orange dans le dessin). Les deux paramètres sont normalisés par leur valeur pré-impulsion.

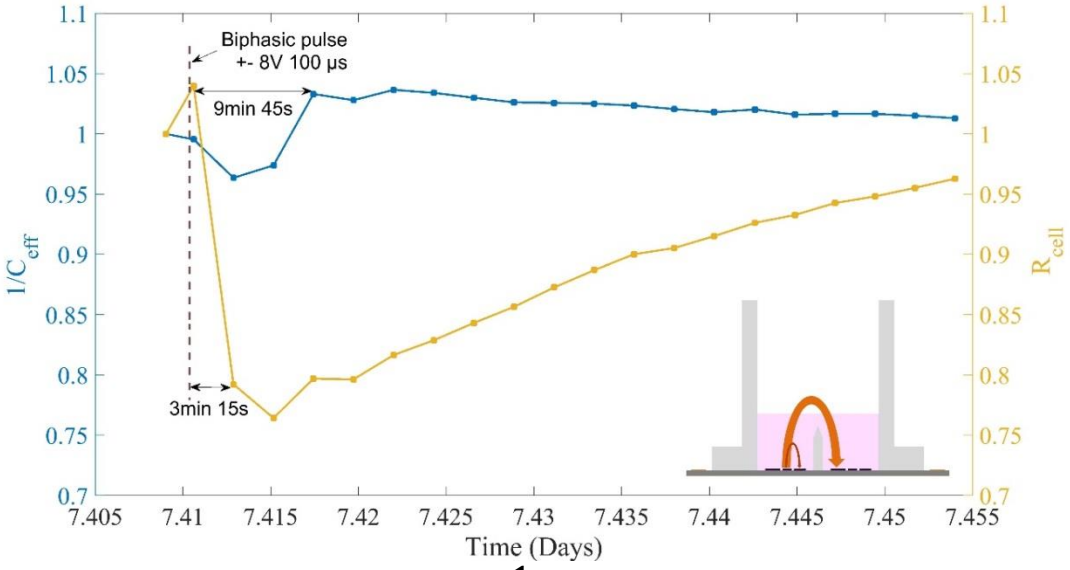

Figure 147 Evolution des paramètres $^{1}/_{C_{eff}}$ et R_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions sont appliquées en configuration mono-quartier (rouge dans le dessin) et la mesure d'impédance est effectuée en configuration inter-quartier (orange dans le dessin). Les deux paramètres sont normalisés par leur valeur pré-impulsion.

- **Deuxième essai : impulsions mono-quartier/mesures mono-quartier**

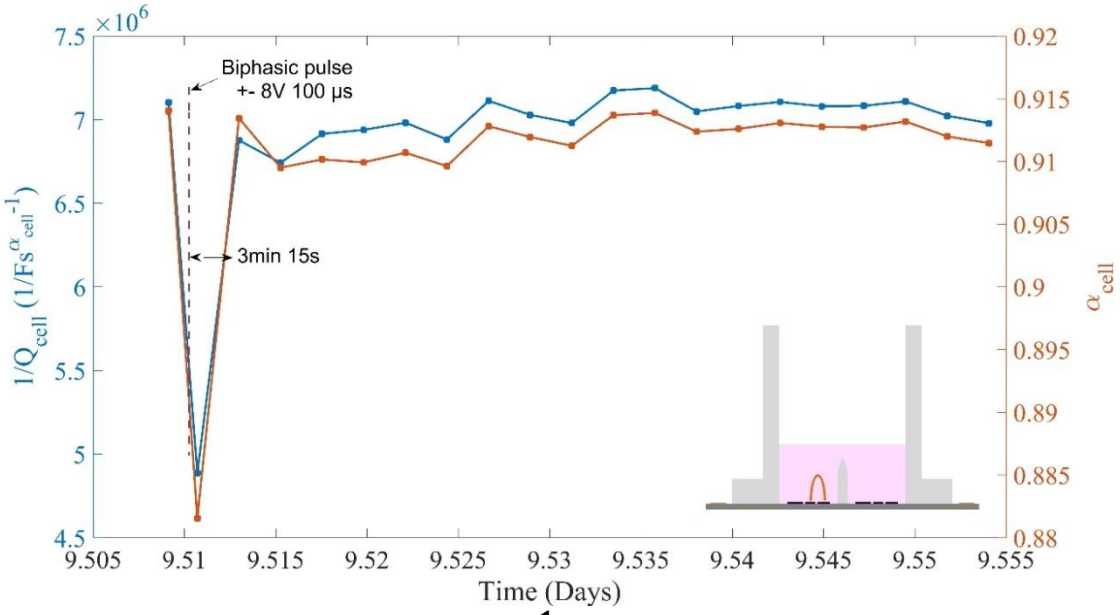

Figure 148 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions tout comme les mesures sont effectuées en configuration mono-quartiers.

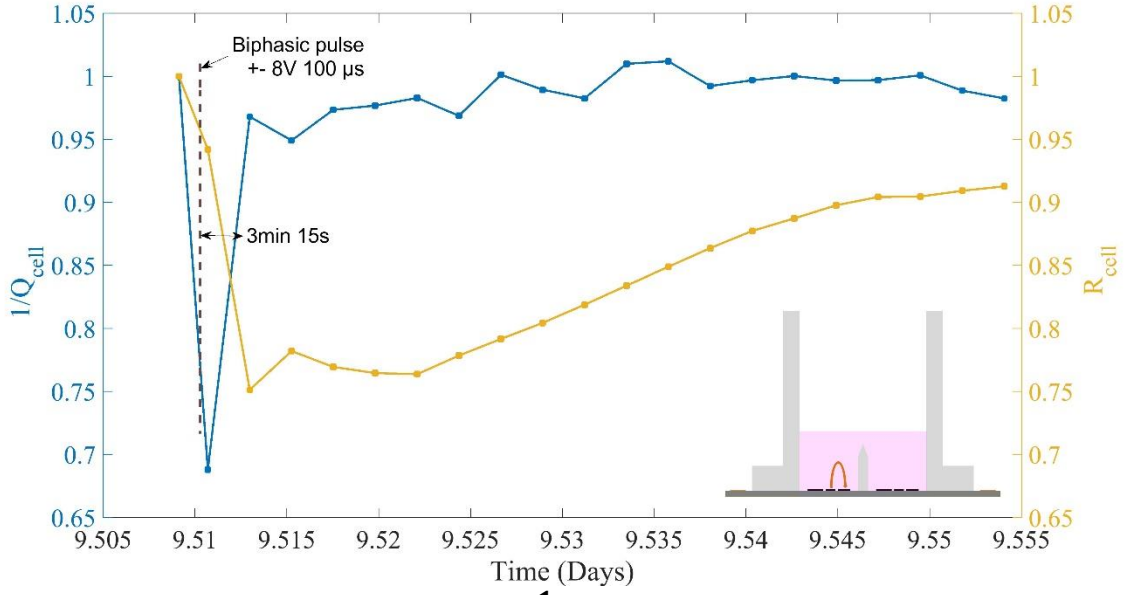

Figure 149 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et R_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions tout comme les mesures sont effectuées en configuration mono-quartiers. Les deux paramètres sont normalisés par leur valeur pré-impulsion.

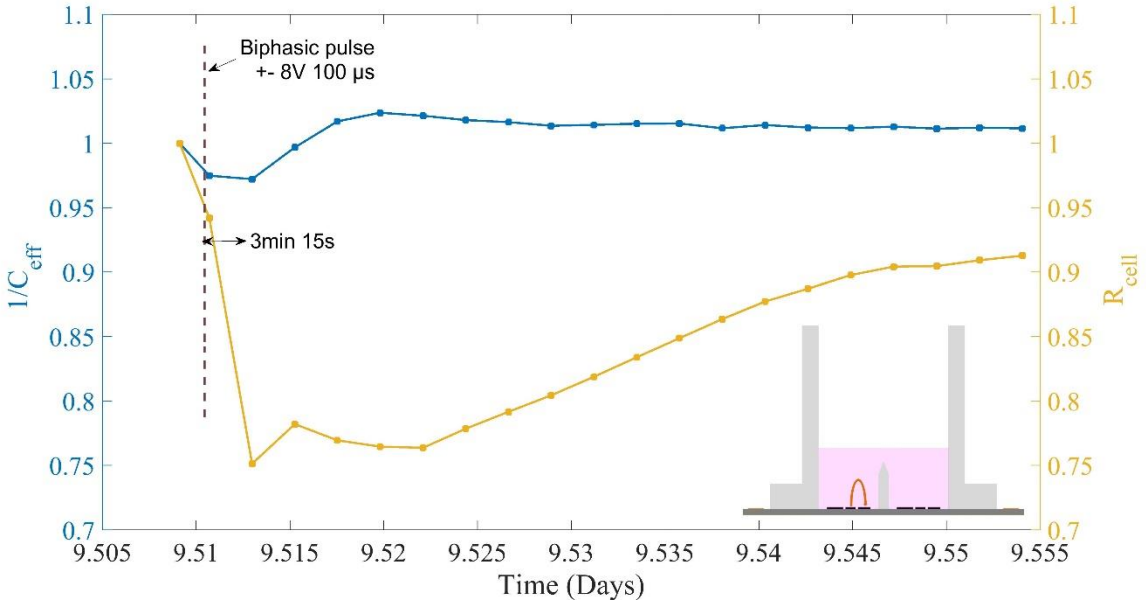

Figure 150 Evolution des paramètres $^{1}/_{C_{eff}}$ et R_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions tout comme les mesures sont effectuées en configuration mono-quartiers. Les deux paramètres sont normalisés par leur valeur pré-impulsion.

Par ailleurs les variations du paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$, qui représenterait la capacité moyenne du tapis évolue peu dans les deux premiers essais (Figure 147 et Figure 150) et surtout de manière comparable avec le troisième essai (Figure 153). On suppose donc que la variation de $^{1}/_{C_{eff}}$ est liée à la variation de l'environnement ionique du tapis cellulaire, notamment de la couche ionique en contact avec le tapis cellulaire mais pas directement à l'électroporation. Vu les amplitudes en tension employées et même si les impulsions sont courtes on a probablement modifié l'environnement ionique au voisinage des électrodes par réaction électrochimique (notamment l'électrolyse de l'eau).

Dans le troisième essai (Figure 151 à Figure 153) on observe une variation de $^{1}/_{C_{eff}}$ alors que le champ électrique était dans ce cas plus faible puisque la configuration d'application des impulsions est différente. Ceci va dans le sens d'associer $^{1}/_{C_{eff}}$ à un effet indépendant du champ électrique. La variation de R_{cell} a également lieu dans les mêmes proportions dans les trois essais. Ainsi la perturbation des jonctions pourrait également ne pas être liée directement à l'amplitude du champ électrique.

➢ **Troisième essai : impulsions inter-quartiers/mesures inter-quartiers**

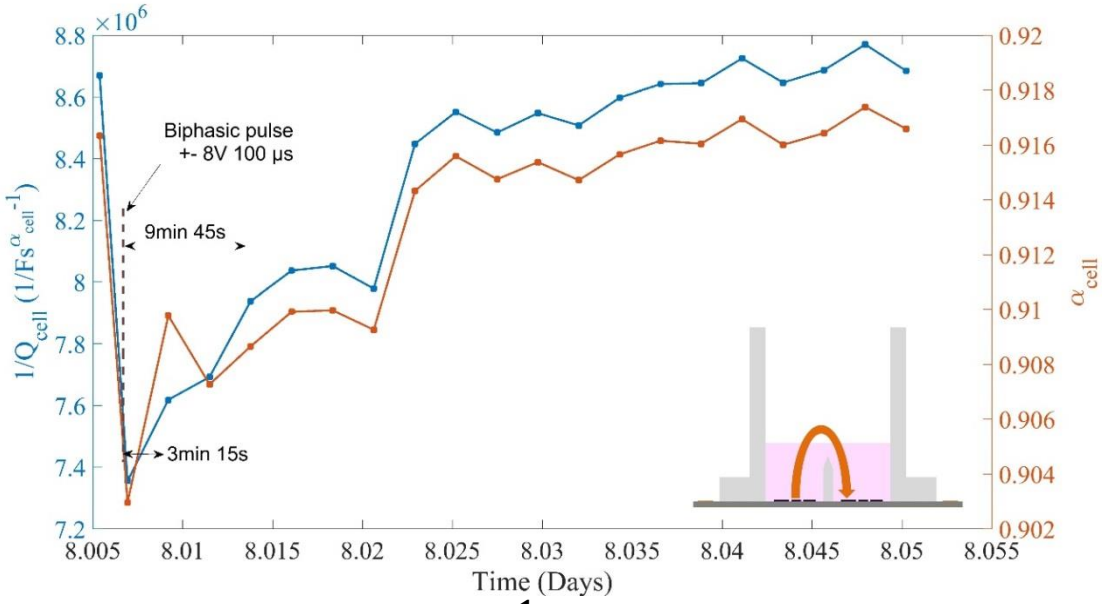

Figure 151 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions tout comme les mesures sont effectuées en configuration inter-quartiers.

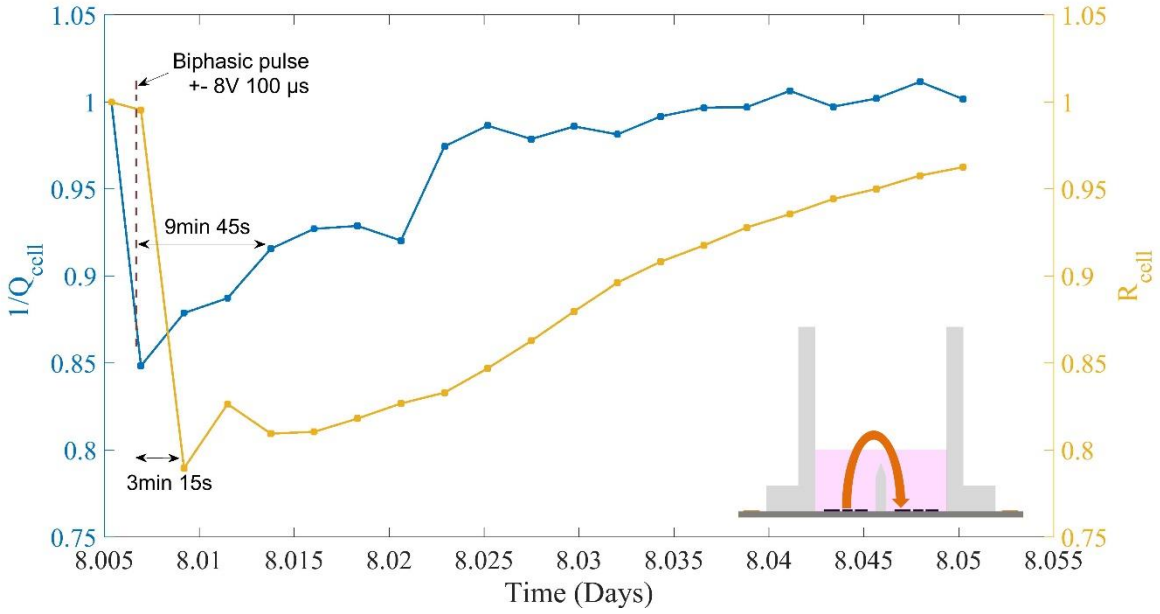

Figure 152 Evolution des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et R_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions tout comme les mesures sont effectuées en configuration inter-quartiers. Les deux paramètres sont normalisés par leur valeur pré-impulsion.

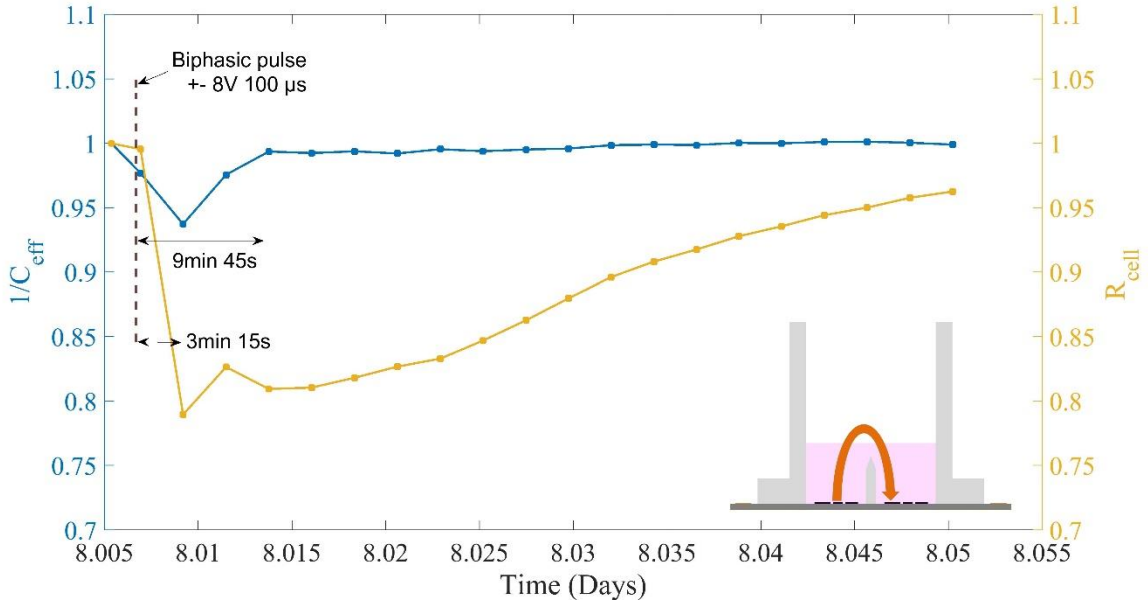

Figure 153 Evolution des paramètres $^{1}/_{C_{eff}}$ et R_{cell} après application de 10 impulsions biphasiques (± 8V, demi période 100 µs) chacun séparés de 1 s. Les impulsions tout comme les mesures sont effectuées en configuration inter-quartiers. Les deux paramètres sont normalisés par leur valeur pré-impulsion.

4. Conclusion sur la variation des paramètres associés au tapis cellulaire

Cette partie a pour but de synthétiser les expériences présentées précédemment afin d'associer à la variation des paramètres une proposition de variation de l'état du tapis cellulaire. On représente ceci sous la forme du tableau suivant, celui-ci présente des propositions de variation du tapis cellulaire quand on observe la variation des paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et R_{cell}.

On associe la variation de R_{cell} à la croissance ou, une fois la confluence atteinte, à la variation des jonctions cellulaires en particulier grâce à l'étude de la perturbation par l'EDTA. Quand à $^{1}/_{Q_{cell}}$ on l'associe à la variation de l'homogénéité des phospholipides des membranes cellulaires, de manière analogue à α_{cell} et ce notamment grâce à l'étude de l'exposition au peroxyde d'hydrogène et de la littérature concernant l'élément à constante de phase. D'une manière générale dans nos expériences de croissance et de perturbations du tapis cellulaire, on

a toujours vu $^{1}/_{Q_{cell}}$ et α_{cell} varier ensemble alors que R_{cell} peut varier de différentes manière par rapport au couple ($^{1}/_{Q_{cell}}, \alpha_{cell}$).

Dans le tableau on a pas représenté le paramètre reconstruit $^{1}/_{C_{eff}}$. En effet on a vu que celui-ci décroit après ajout du détergent (Figure 133) mais aussi que celui-ci augmente dans le cas où le tapis cellulaire se dégrade après exposition à la lumière bleue en présence d'A2E (Figure 139). La variation de ce paramètre est donc moins facilement reliée à des dommages au tapis cellulaire que celle de $^{1}/_{Q_{cell}}$ qu'on a jamais vu augmenter à la suite d'une perturbation du tapis cellulaire. On remarque qu'il peut y avoir ambiguïté sur la variation des paramètres si l'on se trouve dans une étape de croissance ou si l'on se trouve après une perturbation puisque dans les deux cas les paramètres $^{1}/_{Q_{cell}}$ et R_{cell} peuvent varier de manière similaire. En pratique c'est la concomitance des variations suite à l'application de la perturbation et le fait qu'un état stationnaire relativement aux variations observées peut avoir été atteint auparavant qui permet de juger.

Variations de R_{cell} → Variations de $^{1}/_{Q_{cell}}$	Augmente	Diminue	–
Augmente	Début de la croissance jusqu'à homogénéisation du tapis cellulaire	? Peut-être effet EDTA au début si l'échantillonnage temporel était plus important ?	?
Diminue	Maturation après homogénéisation.	*Fin de l'action de l'EDTA (décollement des cellules du tapis)* *Ou* *Destruction du tapis cellulaire.*	*Maturation après confluence et avant consolidation des jonctions* *Ou* *Effet d'H_2O_2 Ou d'une électroporation (début) sur les membranes*
–	Maturation (consolidation des jonctions)	Début de l'action de l'EDTA sur les jonctions	Etat stationnaire

Annexes

Annexe 1 – Détails sur l'anatomie de l'œil et de la rétine

- La rétine

La rétine est l'organe sensible à la lumière du corps. Son épaisseur est d'environ 500 µm [115]. Elle est constituée de différentes couches de cellules excitables connectées entre elles, ainsi que de cellules non excitables qui participent au soutien physiologique des premières ou dans une moindre mesure à la structure de l'œil.

La rétine au sens large regroupe à la fois des cellules excitables et non excitables.

Quand on fait uniquement référence aux couches de la rétine qui propagent l'information visuelle sous forme de potentiel d'action, on parle de neuro-rétine. Celle-ci s'étend depuis la couche des photorécepteurs jusqu'à la couche des cellules ganglionnaires.

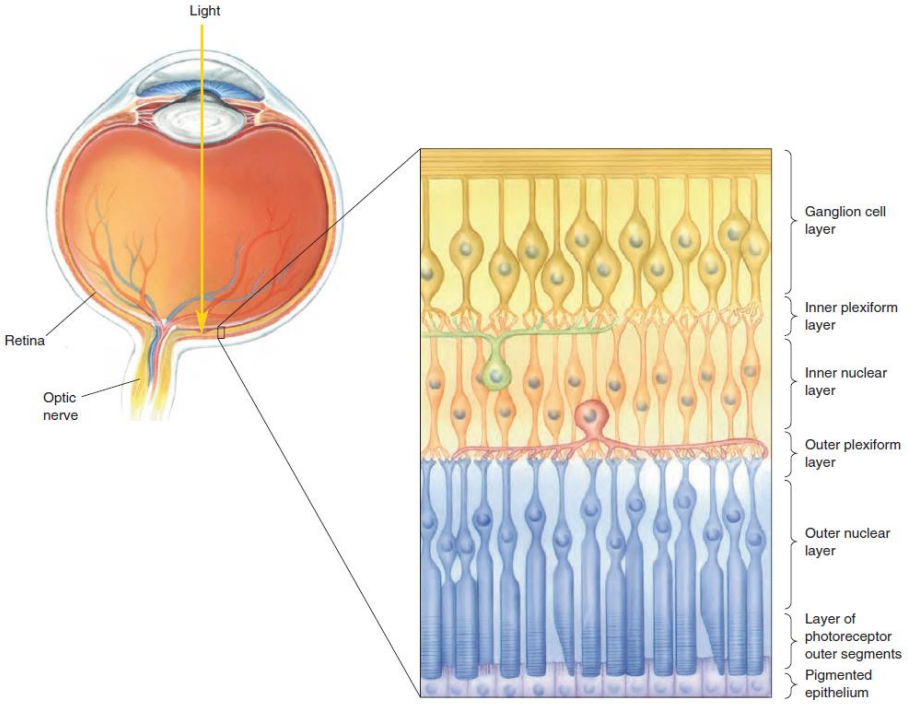

Figure 154 Représentation de l'œil et des couches de la rétine. Extrait de [17]

La neuro-rétine commence (dans l'ordre de la transmission du signal nerveux) avec la couche des photorécepteurs. Les noyaux de ces cellules se trouvent dans la couche nucléaire externe

alors que la zone ou a effectivement lieu la transduction entre la lumière et le potentiel membranaire se situe dans leur partie la plus postérieure (ou externe si l'on reprend la nomenclature qu'on trouve dans la littérature, ce qui est plus adapté vu la forme courbe de la rétine). Les photorécepteurs sont accolés à l'épithélium pigmenté rétinien dans leur partie externe et ils sont en connexion synaptique avec les cellules bipolaires et les cellules horizontales dans leur partie interne. Il existe deux types de photorécepteurs. Les bâtonnets, qui sont très sensibles à l'intensité lumineuse mais qui ne permettent pas la distinction des couleurs. Et les cônes, qui sont de trois types, chacun sensible à des bandes de longueurs d'onde différente avec une dominante rouge, verte et bleue. En revanche ils sont environ 100 fois moins sensibles à l'intensité lumineuse que les bâtonnets. Les cônes sont aussi les photorécepteurs les moins présents sur la rétine puisqu'ils ne représentent que 5 % de la totalité d'entre eux [116]. Les cellules horizontales se trouvent dans la couche plexiforme externe alors que les cellules bipolaires se trouvent dans la couche nucléaire interne. On retrouve les cellules amacrine dans la couche plexiforme interne, au niveau de la connexion entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Le terme plexiforme a pour origine latine « qui a une forme de plexus ». C'est-à-dire une forme d'entrelacement. En effet les cellules horizontales et les cellules amacrine ont des dendrites qui réalisent des connexions de manière latérale avec les autres cellules et ce dans un plan localement parallèle à la rétine. Ainsi il y a une sorte d'entrelacement entre les fibres nerveuses au niveau des couches plexiforme interne et externe, de parts et d'autre des cellules bipolaires. Les cellules horizontales reçoivent des influx nerveux de la part des photorécepteurs et émettent des influx nerveux latéralement vers des cellules bipolaires et des photorécepteurs. Les cellules amacrine reçoivent des influx nerveux des cellules bipolaires et en émettent latéralement vers des cellules bipolaire, ganglionnaire, et vers d'autres cellules amacrine [17].

On a jusqu'à présent sous-entendu que les couches de la rétine étaient invariantes par translation le long de celle-ci. On peut toutefois séparer grossièrement la surface de la rétine en 3 zones. La macula, et au centre de celle-ci, la fovéa. La zone de la papille optique et de son voisinage immédiat. Et enfin le reste de la rétine.

La macula correspond à la partie centrale de la rétine, sur laquelle se forme la partie de l'image qui correspond dans le champ de vision à un cône d'environ 10° de part et d'autre du point de fixation. C'est cette zone qui est en très grande partie responsable de l'acuité visuelle. Dans le centre de la macula se trouve la fovéa (« puit » en latin). Dans cette zone, la rétine devenue plus fine ne contient que des cônes et une absence de vaisseaux sanguins. La papille optique est la zone ou se rejoignent les fibres nerveuses issues des cellules ganglionnaires pour former le nerf optique. C'est une zone dépourvue de photorécepteurs. Par conséquent elle correspond à une zone aveugle dans le champ de vision. Dans le reste de la rétine qui correspond à la vision périphérique on retrouve une plus grande densité de bâtonnets et très peu de cônes.

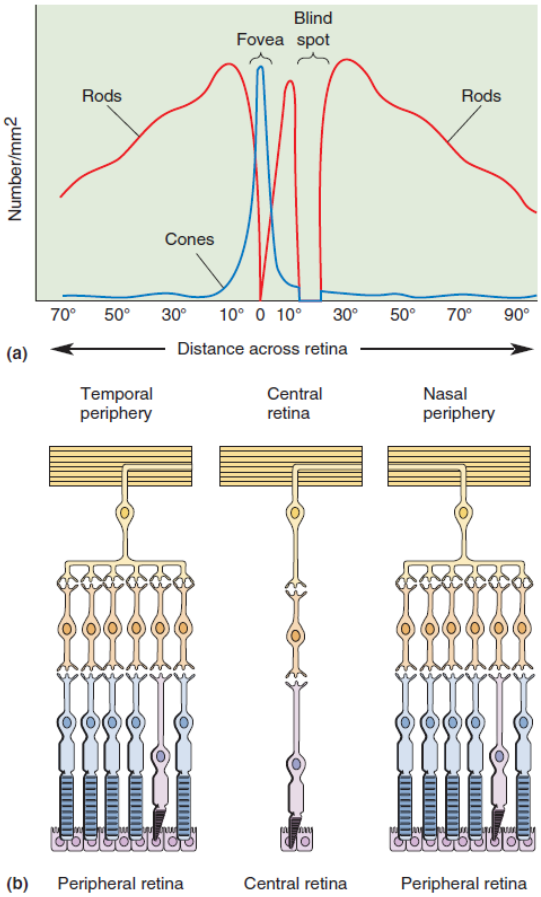

Figure 155 (a) Densité de photorécepteurs de type cônes et de type bâtonnets en fonction de la distance angulaire au centre de la fovéa. (b) Schéma de coupe de rétine en différents lieux de celle-ci. Extrait de [17]

Du fait de l'organisation des couches de la rétine humaine, il existe forcément une zone aveugle. En effet la lumière doit traverser l'ensemble des couches de la neuro-rétine avant

d'atteindre celle des photorécepteurs, sensible à la lumière. Mais pour sortir de l'œil, l'information visuelle doit donc traverser l'ensemble de ces couches également comme représenté dans la Figure 156. Ceci a lieu au niveau de la papille optique (parfois simplement appelée papille ou point aveugle), là où se regroupent les axones issus des cellules ganglionnaires pour former le nerf optique qui sort de l'œil.

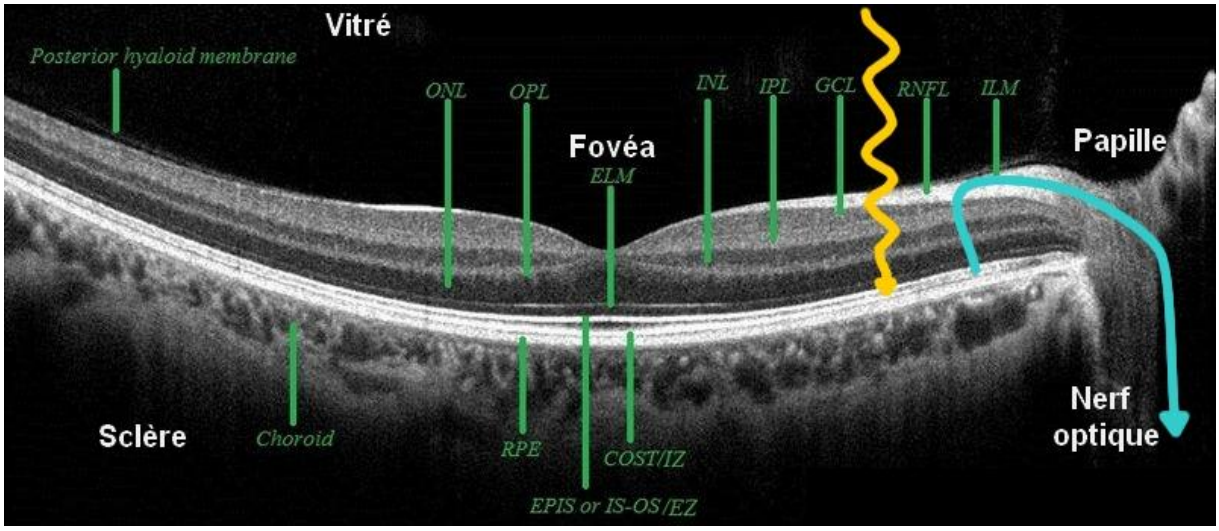

Figure 156 Image en coupe d'une rétine humaine par OCT. Sens de propagation de la lumière (jaune). Sens de propagation de l'information visuelle globale (bleu). L'épaisseur de la rétine humaine est de l'ordre de 500 µm. Adapté d'après [117]. ***ILM- inner limiting membrane; RNFL- retinal nerve fiber layer; GCL- ganglion cell layer; IPL- inner plexiform layer; INL- inner nuclear layer; OPL- outer plexiform layer; ONL- outer nuclear layer; ELM- external limiting membrane; EPIS or EZ or IS/OS junction- ellipsoid portion of the inner segments or ellipsoid zone, previously referred to as inner segment outer segment junction line; COST or IZ- cones outer segment tips line or interdigitation zone; RPE- retinal pigmented epithelium.***

Cette organisation « inversée » de la rétine n'est cependant pas la norme dans le règne animal. Par exemple un grand nombre d'invertébrés notamment les céphalopodes, possèdent une rétine « non inversée ». La lumière ne traverse pas leur rétine mais atteint les photorécepteurs directement et le nerf optique se forme derrière ceux-ci. Ces animaux n'ont donc pas de taches aveugles [118].

Mais l'organisation inversée de l'anatomie de la rétine des vertébrés et en particulier des mammifères implique un contact étroit entre les photorécepteurs et l'épithélium pigmenté adjacent. Nous verrons que cette proximité ainsi que celle des vaisseaux sanguins de la choroïde a une grande importance dans les processus qui mènent à la vision.
L'ensemble de ces couches appliquent un traitement des signaux nerveux et constituent ainsi un prolongement de l'encéphale dans l'œil [119].

- Le segment antérieur

Le segment antérieur contient notamment la cornée, l'iris et la pupille, l'humeur aqueuse ainsi que le cristallin.
Le cristallin est une lentille dont la puissance est modulée par la contraction d'un muscle, le muscle ciliaire. Celui-ci permet de faire converger sur la rétine l'image d'objets qui se situent à l'infini ou à porter de main, c'est l'accommodation.
La cornée est une couche transparente qui constitue la surface la plus antérieure de l'œil. Son épaisseur chez l'Homme varie de 450 à 700 µm environ [120]. En plus de participer à la structure de l'œil, cette membrane joue le rôle d'une puissante lentille dont la valeur est d'environ 44 dioptries (à comparer avec le cristallin dont la puissance vaut environ 22 dioptries). Ce sont des valeurs très importantes puisque qu'une image à l'infini serait formée à 22.5 mm seulement du centre optique de la cornée. On utilise pour cela la relation entre la puissance d'une lentille δ (en dioptries) et la distance focale f (en m) :

$$f = \frac{1}{\delta}$$

Ceci reste cependant une approximation puisque l'on ne se trouve pas dans le cas de lentilles minces, et qu'on ne tient par ailleurs pas compte du cristallin dans ce calcul. Cela correspond cependant en ordre de grandeur à la position de la rétine, sur laquelle l'image se forme. En effet la longueur de l'œil ou longueur axiale, mesurée entre la partie extérieure de la cornée et la membrane de Bruchs est de 16 mm en moyenne chez un nouveau-né et de 24-25 mm en

moyenne chez un adulte [121]. Ceci fait de l'œil l'un des organes dont la croissance est la plus faible au court de la vie. On peut donner une estimation plus précise de la longueur focale d'un tel système optique comme présenté dans [20] mais la longueur focale ne correspond alors plus à la position d'un élément anatomique précis.

L'iris est une structure située postérieurement à la cornée. Sa partie centrale creuse, la pupille, permet à la lumière d'atteindre le cristallin puis rétine. L'iris peut se contracter ou se dilater en fonction de la luminosité ambiante, ce qui module la taille de la pupille et laisse rentrer plus ou moins de lumière dans l'œil. Cette contraction ou dilatation est contrôlée par la luminosité ambiante, bien que certains médicaments ou certaines drogues, en se liant à des récepteurs du système nerveux central ou périphérique, aient également un effet sur la contraction ou la dilatation de l'iris et donc sur le diamètre de la pupille.
Une autre conséquence dans le changement de taille de la pupille est le changement dans la profondeur de champ (la zone nette de l'espace en avant et en arrière du point de fixation). Une pupille plus petite étant associée à une plus grande profondeur de champ.
Entre la cornée et l'iris se trouve un liquide transparent et de faible viscosité, l'humeur aqueuse. La présence de ce liquide ainsi que de celle du vitré participe à la pression intraoculaire dont la valeur normale est inférieure à 22 mmHg [122]. Un défaut d'évacuation ou une surproduction d'humeur aqueuse peut conduire à une hypertension oculaire.

Annexe 2 – Modélisation des réactions électrochimiques

Dans le cas des réactions électrochimique pour lesquelles le système est en contact avec un environnement à température T_0 et pression P_0 constantes, la fonction d'état qui décrit le mieux le système est l'enthalpie libre G. Ainsi la réaction électrochimique a lieu si au court de celle-ci l'enthalpie libre du système diminue. Ceci ne précise en revanche pas la vitesse de réaction.

On applique à l'électrode de travail un potentiel E par rapport au potentiel d'équilibre E^{eq} du processus redox. Celui-ci est considéré réversible et E est mesuré avec la même électrode de référence que celle utilisée pour mesurer E^{eq}. Quand E^{eq} est mesuré dans des conditions standard et avec une électrode standard à hydrogène, $E^{eq} = E^0$ le potentiel standard. On considère cela dans la suite.

Dans ce cas et pour un processus avec transfert d'un électron[3] on fait varier l'enthalpie libre des réactifs de $-F(E - E^0)$.

En fonction du potentiel appliqué on réduit ainsi la barrière de potentiel pour l'une des demi-réactions. Cette barrière est donc plus facilement franchie par les réactifs du fait de leur agitation thermique.

Si le potentiel appliqué est plus petit que le potentiel standard alors l'équilibre se déplace de sorte que la concentration de l'espèce réductrice augmente, c'est une réduction. Sinon c'est une oxydation.

Pour obtenir la vitesse de réaction et donc le courant et enfin la résistance de transfert de charge associée on utilise la loi d'Arrhenius. Celle-ci relie la constante de vitesse de réaction à la barrière de potentiel que les électrons doivent franchir relativement à leur énergie thermique

[3] Si le processus fait intervenir plusieurs électrons alors celui-ci se décompose en plusieurs étapes puisqu'il est peu probable que les électrons réagissent toujours deux par deux. Le processus le plus lent détermine alors la constante de vitesse. [102]

$$j_{red}(E) = A_{red}C_{red}(x=0,t)e^{-(\Delta G_{a,red}+\gamma F(E-E^0))/RT}$$

$$j_{ox}(E) = A_{ox}C_{ox}(x=0,t)e^{-(\Delta G_{a,ox}-(1-\gamma)F(E-E^0))/RT}$$

$$j_{tot}(E) = j_{red}(E) - j_{ox}(E)$$

Avec R : Constante des gaz parfaits (J/K.mol) et RT : l'énergie thermique d'une mole d'électrons

$C_{ox/red}(x=0,t)$ *: Concentrations en oxydant/en réducteur à la surface de l'électrode (mol/m³)*

j : les flux des molécules oxydante/réductrice/le flux total au niveau de l'électrode de travail, ce dernier prit positif pour une réduction (mol/cm².s)

A : Des coefficients homogène à une constante de vitesse (m/s)

$\Delta G_{a,ox/red}$ *: La barrière de potentiel ou enthalpie libre d'activation à l'équilibre pour chaque demi-réaction (J/mol). Ici celle-ci peut dépendre des paramètres extérieurs comme l'électrode de référence utilisée.*

γ *: Le coefficient de transfert (*$0 < \gamma < 1$*)*[4]

Quand aucun flux d'espèce n'existe macroscopiquement on est à l'équilibre et $E = E^0$. En considérant qu'alors les concentrations en espèces oxydante et réductrice sont égales on peut ajouter :

$$A_{red}e^{-\Delta G_{a,red}/RT} = A_{ox}e^{-\Delta G_{a,ox}/RT} = k^0$$

C'est la constante de vitesse standard, qui ne dépend pas du potentiel appliqué.

[4] Ce coefficient représente certaines caractéristiques de la barrière de potentiel que nous n'aborderont pas. On le considère généralement égal à 0.5.
Celui-ci est souvent représenté par la lettre α mais n'a rien à voir avec l'élément à constante de phase. La lettre γ est utilisée ici pour lever l'ambiguïté.

Pour une électrode de surface S on obtient le courant (de signe opposé au courant d'électrons) :

$$i(E) = -nSFk^0(C_{red}(x=0,t)e^{-\gamma F(E-E^0)/RT} - C_{ox}(x=0,t)e^{(1-\gamma)F(E-E^0)/RT})$$

Avec F la constante de Faraday, et n le nombre d'électrons mit en jeu. C'est l'équation de Butler-Volmer, qui décrit le système du point de vue de la cinétique mais sans tenir compte des effets de transport de masse (diffusion des espèces) ni des surtensions ohmiques (on a considéré que le processus était réversible).

On peut en revanche en déduire une expression pour la résistance de transfert de charge. On a en effet :

$$\frac{1}{R_{CT}(E)} = \frac{\partial i}{\partial E}(E)$$
$$= \frac{n^2SF^2k^0}{RT}(\gamma C_{red}(x=0,t)e^{-\gamma F(E-E^0)/RT} + (1-\gamma)C_{ox}(x=0,t)e^{(1-\gamma)F(E-E^0)/RT})$$

Dans le cas où l'électrolyse est de l'eau, au niveau d'une électrode de platine polie et en environnement acide, la constante de vitesse standard est de $2.5.10^{-8}\ m/s$ pour le couple H^+/H_2 et $1.10^{-14}\ m/s$ pour le couple O_2/H_2O [123].

Pour une électrode de 1 mm de diamètre à 37°C le pré-facteur dans l'équation ci-dessus est de l'ordre de $10^{-7}\ \Omega^{-1}$ et $10^{-13}\ \Omega^{-1}$ pour les deux couples précédents. La réduction de l'eau en hydrogène, bien que la plus probable dans ce cas, reste associée à une constante de vitesse faible si le potentiel appliqué n'est pas assez négatif. La résistance de transfert de charge sera donc très importante dans ce cas.

Pour de faibles valeurs de $E - E^0$ on considère que les valeurs des concentrations à la surface de l'électrode ont des valeurs stationnaire proche de celles dans l'électrolyte. Alors la valeur de la résistance de transfert de charges $R_{CT}(E{\sim}E^0)$ fait le lien entre le courant et la surtension

appliquée. Celle-ci correspond donc à la surtension de surface (ou surtension d'activation) présentée dans la partie 2.1. [124], [123], [125], [126], [127], [128]

Pour des surtensions plus importantes $R_{CT}(E, t = 0)$ diminue mais l'effet de la diffusion des espèces n'est plus négligeable. En effet la concentration des espèces à la surface des électrodes devient différente de celle dans l'électrolyte. Ceci est modélisé par l'association à $R_{CT}(E)$ d'un élément qui freine le passage du courant quand ce dernier a été trop important relativement à la vitesse de diffusion des ions. C'est un comportement analogue à celui d'un condensateur.

Les phénomènes de diffusion sont représentés par la loi de Fick à une dimension (on considère l'électrode assez grande pour ne considérer la diffusion que dans la direction normale à celle-ci) :

$$\frac{\partial C_{ox/red}(x,t)}{\partial t} = D_{ox/red} \frac{\partial^2 C_{ox/red}(x,t)}{\partial x^2}$$

Avec $D_{ox/red}$ *: Le coefficient de diffusion de l'espèce oxydante/réductrice*

On applique une tension sinusoïdale de faible amplitude autour d'un point de polarisation égal par exemple au potentiel d'équilibre d'un couple redox. Il s'en suit une perturbation sinusoïdale de la concentration des espèces oxydantes et réductrices à la surface de l'électrode de travail puisque des électrons réagissent avec les molécules en surface. Cette perturbation se propage par diffusion dans l'électrolyte et forme ainsi une « onde de concentration » (*Concentrationswelle*, [129]). En fonction de si l'amplitude de cette onde vaut 0 à une distance infinie ou à une distance finie de l'électrode on parlera de couche de diffusion infinie ou finie.

Le profil de concentration pour les espèces oxydantes et réductrices prend la forme générale suivante :

$$C_{ox/red}(x,t) = C_{ox/red,biais}(x,t) + \Delta C_{ox/red}(x) e^{j\omega t}$$

Si on prend une couche de diffusion finie dont la variation de concentration au sein de la couche est linéaire entre la valeur à la surface de l'électrode et la valeur dans l'électrolyte (couche de Nernst d'épaisseur δ_N), et si on considère que la couche de diffusion est établie (donc que δ_N et $C_{ox/red,biais}$ ne dépendent plus du temps) alors :

$$C_{ox/red,biais}(x) = C_{ox/red,biais}(0) + (C_{ox/red,el} - C_{ox/red,biais}(0))\frac{x}{\delta_N}$$
$$pour\ x < \delta_N\ ;\ C_{ox/red,el}\ pour\ x \geq \delta_N\ (dans\ l'électrolyte)$$

Et quand on applique la perturbation sinusoïdale l'onde de concentration se forme (à partir d'ici on omet les $e^{j\omega t}$ pour simplifier) :

$$\Delta C_{ox/red}(x) = -2N_{ox/red}e^{-\delta_N\sqrt{\frac{j\omega}{D_{ox/red}}}}\sinh((x-\delta_N)\sqrt{\frac{j\omega}{D_{ox/red}}})$$
$$pour\ x < \delta_N\ ;\ 0\ pour\ x \geq \delta_N$$

C'est une solution de l'équation de Fick avec $\Delta C_{ox/red}(x = \delta_N) = 0$. N est un coefficient d'intégration.

Pour une couche de diffusion infinie, c'est-à-dire si l'on se place à une échelle petite devant δ_N et qu'on considère donc $\Delta C_{ox/red}(x = \infty) = 0$, les équations ci-dessus deviennent :

$$C_{ox/red,biais}(x) = C_{ox/red,biais}(0)$$
$$\Delta C_{ox/red}(x) = N_{ox/red}e^{-x\sqrt{\frac{j\omega}{D_{ox/red}}}} = \Delta C_{ox/red}(0)e^{-x\sqrt{\frac{j\omega}{D_{ox/red}}}}$$

Le courant de diffusion s'exprime en fonction du gradient de concentration à la surface de l'électrode (en omettant les $e^{j\omega t}$) :

$$i_{D_{ox/red}} = -nFSD_{ox/red}\frac{\partial C_{ox/red}(x,t)}{\partial x}(x = 0) = nFSD_{ox/red}\sqrt{\frac{j\omega}{D_{ox/red}}}\Delta C_{ox/red}(0)$$

Comme le courant de diffusion est la conséquence du courant d'électrons qui produit, à la surface de l'électrode, les espèces qui vont diffuser, alors ces deux courants sont égaux.

$$i_{D_{ox/red}} = i$$

En différenciant i on fait apparaitre séparément les paramètres responsables de sa variation.

$$\delta i = \frac{\partial i}{\partial E}\delta E + \frac{\partial i}{\partial C}\delta C = \delta i = \frac{\partial i}{\partial E}\delta E + \frac{\partial i}{\partial C_{red}}\delta C_{red} - \frac{\partial i}{\partial C_{ox}}\delta C_{ox}$$

$$\delta i = \frac{1}{R_{CT}}\delta E - nSFk^0(e^{-\gamma F(E-E^0)/RT} + e^{(1-\gamma)F(E-E^0)/RT})\delta C$$

Si on prend $\delta C = \Delta C_{ox/red}(0)$ (petite variation de concentration autour du point d'équilibre à la surface de l'électrode) alors avec l'équation du courant de diffusion on peut écrire, en considérant les coefficients de diffusion des espèces oxydante et réductrices égaux :

$$\delta i = \frac{1}{R_{CT}}\delta E - k^0(e^{-\gamma F(E-E^0)/RT} + e^{(1-\gamma)F(E-E^0)/RT})\frac{\delta i}{\sqrt{j\omega D}}$$

Finalement quand on observe l'inverse de la petite variation de courant produite par rapport à la petite variation de tension appliquée $\frac{\delta E}{\delta i}$ on voit apparaitre l'impédance due aux réactions électrochimiques en tenant compte de la diffusion :

$$Z_{CT} = R_{CT}\left(1 + \frac{k^0\left(e^{-\gamma F(E-E^0)/RT} + e^{(1-\gamma)F(E-E^0)/RT}\right)}{\sqrt{j\omega D}}\right) = R_{CT} + W$$

W représente l'impédance de Warburg [129] pour une couche de diffusion infinie, la dépendance en fréquence est en $1/\sqrt{j\omega} = (j\omega)^{-1/2}$

Pour une couche de diffusion finie la forme de l'impédance de Warburg change, notamment en basse fréquence, où la longueur de diffusion devient comparable à la longueur caractéristique du système. [123], [125], [127].

Conclusion et Perspectives

Dans cette conclusion on va rappeler les travaux réalisés et regrouper les résultats obtenus.
Un banc d'expérimentation permettant la mesure d'impédance à distance et de manière automatisée a été développé. Ce banc a été employé à la mesure de spectres d'impédance d'un tapis de cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine (RPE). Après une phase de validation du montage sur des microélectrodes commerciales, des dispositifs ont été réalisées en salle blanche et des mesures sur des électrodes de taille millimétriques ont été effectuées.

Le tapis de cellules RPE remplit notamment, dans l'œil, une fonction particulière d'isolation entre la neuro-rétine et la circulation sanguine, et cette couche de cellules fait ainsi partie de la barrière sang-rétine (BRB). La dégradation d'une telle barrière est souvent associée à des pathologiques comme la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA).

On a associé un modèle constitué de dipôles électriques aux électrodes ainsi qu'au tapis cellulaire qui se développe à leur surface. Les cellules RPE se développent jusqu'à la confluence où elles forment une monocouche. Dans la direction parallèle au plan de culture les cellules se lient entre elles via des jonctions serrées.

On s'est alors demandé dans quelle mesure les paramètres extraits du modèle électrique peuvent être appliqués au suivi de certaines caractéristiques du tapis cellulaire. On s'intéresse en particulier à la distinction entre une détérioration des membranes cellulaires et une détérioration des jonctions serrées entre les cellules qui peut se traduire par une augmentation du transport paracellulaire (entre les cellules) de molécules.

Ce dernier cas est représenté par le paramètre R_{cell} qu'on peut notamment mettre en relation avec la résistance électrique trans-épitheliale (TEER) citée dans la littérature.
Par contre dans notre cas, on a choisi de représenter le comportement déphaseur des membranes par un élément à constante de phase. La nature physique d'un tel élément est sujet à débat, que ce soit quand il représente un tapis cellulaire ou l'interface électrode-électrolyte. On a donc réalisé des essais afin d'observer différentes variations relatives des paramètres du modèle.

Le premier essai consiste à suivre la croissance du tapis cellulaire, de l'ensemencement à la confluence. Ensuite des essais de perturbation du tapis cellulaire ont été réalisés. L'exposition à l'EDTA est connue pour perturber les jonctions serrées entre les cellules. En présence d'une exposition au peroxyde d'hydrogène on a proposé une explication se basant sur la peroxydation des phospholipides. On a également détruit le tapis cellulaire avec un détergent (ou subi cette destruction après une contamination). Enfin on a évalué la réponse du tapis cellulaire à des impulsions électriques et celle de l'exposition à un photosensibilisant, l'A2E, sans lumière puis en présence de lumière bleue.
Avant de considérer la justesse des interprétations proposée pour ces essais, on peut tout d'abord dire que dans tous les cas observés, les paramètres $1/Q_{cell}$ et α_{cell} de l'élément à constante de phase du tapis cellulaire varient ensemble, c'est-à-dire dans le même sens et de façon non retardée. On considère donc que la variation de ces paramètres est issue de la même cause à savoir l'homogénéité ou l'hétérogénéité de la distribution spatiale des phospholipides associés aux membranes cellulaires. Le paramètre reconstruit $1/C_{eff}$ étant associé à la capacité moyenne du tapis qui a pour origine les membranes cellulaires et fait intervenir les autres éléments du modèle. Par ailleurs on a aussi observé des variations du paramètre R_{cell}. Cependant celui-ci nous semble pouvoir varier de manière indépendante du couple ($1/Q_{cell}$, α_{cell}). En effet dans l'essai d'exposition à l'EDTA celui-ci varie avant le couple ($1/Q_{cell}$, α_{cell}) alors que dans l'essai d'application d'impulsions électriques il varie après. Par ailleurs dans l'essai d'exposition au peroxyde d'hydrogène R_{cell} ne décroit jamais en deçà de sa

valeur pré-exposition alors que c'est le cas dans les autres essais. On considère donc que la variation de ce paramètre peut être considéré de manière indépendante du couple $^{1}/_{Q_{cell}}$, α_{cell}. On est donc en mesure de proposer des interprétations sur les modifications du tapis cellulaire en observant R_{cell}, le couple ($^{1}/_{Q_{cell}}$, α_{cell}) ou encore $^{1}/_{C_{eff}}$ bien que l'association de ce dernier paramètre à la dégradation du tapis cellulaire soit ambigüe dans nos mesures. On a par exemple pu observer qu'en présence d'A2E mais avant exposition à la lumière bleue, le paramètre R_{cell} décroit seul ce qui suggère une perturbation des jonctions et peut être de l'efficacité de la barrière sang-rétine.

La démarche et les mesures présentées ici pourraient s'appliquer à d'autres types de cellules épithéliales sans grand changements dans les modèles. Les tissus épithéliaux sont omniprésents dans le corps, où ils remplissent toujours une fonction de barrière. C'est le cas par exemple de l'épiderme, de l'épithélium intestinal ou encore pulmonaire. Ainsi le champs d'application reste large.

On pourrait également tenter d'appliquer cette procédure sur d'autre type de culture cellulaire, notamment en présence de tissus conjonctif. Bien que l'absence de jonctions serrées nous amènerait très probablement à devoir modifier les modèles électriques, la démarche d'étude reste fortement similaire.

Enfin le suivi in-vivo de dispositifs artificiels tels que des implants est envisageable dans la mesure où les électrodes sont suffisamment grosses et/ou la fréquence de mesure suffisamment importante pour pouvoir mesurer les différents éléments du modèle proposé et dans la mesure où l'on tient également compte des déplacements aléatoires qui peuvent avoir lieu entre l'implant et les tissus, et qui n'existent pas in-vitro.

Bibliographie

[1] R. M. Hochmuth, C. A. Evans, H. C. Wiles, and J. T. McCown, "Mechanical measurement of red cell membrane thickness," Science, vol. 220, pp. 101-102, 1983. [Online]. http://science.sciencemag.org/content/220/4592/101

[2] Geoffrey M. Cooper and Robert E. Hausman,.: Sinauer Associates Inc., 2007, ch. The Composition of Cells.

[3] Emma Petiot, Sven Ansorge, Manuel Rosa-Calatrava, and Amine Kamen, "Critical phases of viral production processes monitored by capacitance," Journal of Biotechnology, vol. 242, pp. 19-29, 2017. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616316108

[4] Shinpei Ohki and Catherine B. Ohki, "Monolayers at the oil/water interface as a proper model for bilayer membranes," Journal of Theoretical Biology, vol. 62, pp. 389-407, 1976. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022519376901260

[5] Anthony Weil,.: McGraw Hill Education, 2018, ch. Harper's Illustrated Biochemistry, 31st edition, p. 1123.

[6] J. F. Ashmore and R. W. Meech, "Ionic basis of membrane potential in outer hair cells of guinea pig cochlea," Nature, vol. 322, p. 368, July 1986. [Online]. http://dx.doi.org/10.1038/322368a0

[7] David S. Campion, "Resting Membrane Potential and Ionic Distribution in Fast- and Slow-Twitch Mammalian Muscle," Journal of Clinical Investigation, vol. 54, pp. 514-518, Sep. 1974. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC301583/

[8] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve," The Journal of Physiology, vol. 117, pp. 500-544. [Online]. https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/jphysiol.1952.sp004764

[9] Mark F. Bear, Barry W. Conners, and Michael A. Paradiso.,.: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, ch. The Action Potential.

[10] Hiromu Monai et al., "An Analytic Solution of the Cable Equation Predicts Frequency Preference of a Passive Shunt-End Cylindrical Cable in Response to Extracellular Oscillating Electric Fields," Biophysical Journal, vol. 98, pp. 524-533, 2010. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000634950901683X

[11] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo," The Journal of Physiology, vol. 116, pp. 473-496, Apr. 1952. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1392209/

[12] J. L. Salzer and B. Zalc, "Myelination," Current Biology, vol. 26, pp. R971 - R975, 2016. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982216308685

[13] R. L. Friede, T. Meier, and M. Diem, "How is the exact length of an internode determined?," Journal of the Neurological Sciences, vol. 50, pp. 217-228, 1981. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022510X81901684

[14] Henry Gray, Anatomy of the Human Body.: Lea & Febiger, 1918.

[15] R. S. Ramrattan et al., "Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging.," Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol. 35, p. 2857, 1994. [Online]. + http://dx.doi.org/

[16] Dale Purves et al., Eds.,.: Sinauer Associates, Inc., 2004, ch. Vision: The Eye, p. 229.

[17] Mark F. Bear, Barry W. Conners, and Michael A. Paradiso.,.: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, ch. The Eye.

[18] J. Carroll and D. M. Tait, , Joseph Besharse and Dean Bok, Eds.: Elsevier, 2011, ch. Color Blindness: Inherited, p. 140.

[19] Christine A. Curcio, Kenneth R. Sloan, Robert E. Kalina, and Anita E. Hendrickson, "Human photoreceptor topography," Journal of Comparative Neurology, vol. 292, pp. 497-523, 1990. [Online]. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cne.902920402

[20] Milton Katz,.: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2002, ch. THE GULLSTRAND SCHEMATIC EYE, p. 161.

[21] M. D. Crossland, , Joseph Besharse and Dean Bok, Eds.: Elsevier, 2011, ch. Acuity, p. 2.

[22] Lea Hyvärinen and Namita Jacob, What And How Does This Child See? Assessment Of Visual Functioning For Development And Learning.: VISTEST Ltd, Helsinki, Finland, 2011.

[23] S. M. Anstis, "A chart demonstrating variations in acuity with retinal position," Vision Research, vol. 14, pp. 589-592, 1974. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0042698974900492

[24] José Cunha-Vaz, Rui Bernardes, and Conceição Lobo, "Blood-Retinal Barrier," European Journal of Ophthalmology, vol. 21, pp. 3-9, 2011. [Online]. https://doi.org/10.5301/EJO.2010.6049

[25] Olaf Strauss, "The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function," Physiological Reviews, vol. 85, pp. 845-881, 2005, PMID: 15987797. [Online]. https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004

[26] Barry S. Winkler, Michael E. Boulton, John D. Gottsch, and Paul Sternberg, "Oxidative damage and age-related macular degeneration," Molecular vision, vol. 5, pp. 32-32, Nov. 1999. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1773059/

[27] Fong-Qi Liang and Bernard F. Godley, "Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration," Experimental Eye Research, vol. 76, pp. 397-403, 2003. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448350300023X

[28] S. A. Vinores, , Joseph Besharse and Dean Bok, Eds.: Elsevier, 2011, ch. Breakdown of the Blood–Retinal Barrier, p. 51.

[29] Albert Alm and Anders Bill, "Blood Flow and Oxygen Extraction in the Cat Uvea at Normal and High Intraocular Pressures," Acta Physiologica Scandinavica, vol. 80, pp. 19-28. [Online]. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-1716.1970.tb04765.x

[30] Albert Alm and Anders Bill, "The Oxygen Supply to the Retina, II. Effects of High Intraocular Pressure and of Increased Arterial Carbon Dioxide Tension on Uveal and Retinal Blood Flow in Cats," Acta Physiologica Scandinavica, vol. 84, pp. 306-319. [Online]. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-1716.1972.tb05182.x

[31] Leonard M. Parver, "Temperature modulating action of choroidal blood flow," Eye, vol. 5, p. 181, Mar. 1991. [Online]. http://dx.doi.org/10.1038/eye.1991.32

[32] Leonard M. Parver, Charles Auker, and David O. Carpenter, "Choroidal Blood Flow As a Heat Dissipating Mechanism in the Macula," American Journal of Ophthalmology, vol. 89, pp. 641-646, May 1980. [Online]. https://doi.org/10.1016/0002-9394(80)90280-9

[33] N. C. Steinle and J. Ambati, , Joseph Besharse and Dean Bok, Eds.: Elsevier, 2011, ch. Retinal Vasculopathies: Diabetic Retinopathy, p. 781.

[34] Dyonne T. Hartong, Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja, "Retinitis pigmentosa," The Lancet, vol. 368, pp. 1795-1809, 2006. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673606697407

[35] Eberhart Zrenner, "Will Retinal Implants Restore Vision?," Science, vol. 295, p. 1022, Feb. 2002. [Online]. http://science.sciencemag.org/content/295/5557/1022.abstract

[36] G. S. Brindley and W. S. Lewin, "The sensations produced by electrical stimulation of the visual cortex," The Journal of Physiology, vol. 196, pp. 479-493, May 1968. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1351724/

[37] Alice T. Chuang, Curtis E. Margo, and Paul B. Greenberg, "Retinal implants: a systematic review," British Journal of Ophthalmology, vol. 98, pp. 852-856, 2014. [Online]. https://bjo.bmj.com/content/98/7/852

[38] Lyndon Cruz et al., "Five-year safety and performance results from the Argus II Retinal Prosthesis System clinical trial," Ophthalmology, vol. 123, pp. 2248-2254, July 2016. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5035591/

[39] Allen C. Ho et al., "Long-term results from an epiretinal prosthesis to restore sight to the blind," Ophthalmology, vol. 122, pp. 1547-1554, July 2015. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4516690/

[40] Henri Lorach et al., "Photovoltaic restoration of sight with high visual acuity," Nature Medicine, vol. 21, p. 476, Apr. 2015. [Online]. http://dx.doi.org/10.1038/nm.3851

[41] A. Y. Chow et al., "The artificial silicon retina microchip for the treatment of visionloss from retinitis

pigmentosa," Archives of Ophthalmology, vol. 122, pp. 460-469, 2004. [Online]. + http://dx.doi.org/10.1001/archopht.122.4.460

[42] Renate Daschner, Albrecht Rothermel, Ralf Rudorf, Sandra Rudorf, and Alfred Stett, "Functionality and Performance of the Subretinal Implant Chip Alpha AMS," vol. 30, p. 179, Jan. 2018.

[43] haute autorité de santé, "Procès verbal, séance du collège délibératif," p. 7, 3 Mai 2017.

[44] haute autorité de santé, "Avis 2017.0055/ac du 3 mai 2017 du collège de la haute autorité de santé relatif à la prise en charge dérogatoire prévue à l'article L. 165-1-1 du code de la sécurité sociale de l'implant épi-rétinien iris II," 3 Mai 2017.

[45] second sight medical products, "Argus® II Retinal Stimulation System Feasibility Protocol," unpublished.

[46] pixium vision sa, "Compensation for Blindness With the Intelligent Retinal Implant System (IRIS V2) in Patients With Retinal Dystrophy (IRIS 2)," unpublished.

[47] pixium vision sa, "Restoring Vision With the Intelligent Retinal Implant System (IRIS V1) in Patients With Retinal Dystrophy (IRIS-1)," unpublished.

[48] "Déficience de l'acuité visuelle," Code de l'action sociale et des familles, Annexe 1-1, Chapitre V, Section 1, 2018.

[49] "Meaning Of Terms: Aged, Blind, Or Disabled Individual," united states social security administration, 2018.

[50] Katarina Stingl et al., "Artificial vision with wirelessly powered subretinal electronic implant alpha-IMS," Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, vol. 280, 2013. [Online]. http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/280/1757/20130077

[51] G. A. Gates, K. Daly, W. J. Dichtel, and et al, "Cochlear implants in adults and children," JAMA, vol. 274, pp. 1955-1961, 1995. [Online]. + http://dx.doi.org/10.1001/jama.1995.03530240065043

[52] John Newman and Karen E. Thomas-Alyea,.: John Wiley & Sons, Inc., 2004, ch. Introduction, p. 1.

[53] Dictionnaire Littré.

[54] John Newman and Karen E. Thomas-Alyea,.: John Wiley & Sons, Inc., 2004, ch. Reference Electrodes, p. 131.

[55] Łukasz Tymecki, Stanisław Glab, and Robert Koncki, "Miniaturized, Planar Ionselective Electrodes Fabricated by Means of Thick-film Technology," vol. 6, pp. 390-396, Apr. 2006.

[56] Petr Vanýsek., "Electrochemical Series".

[57] Daniel J. Graham, Standard Operating Procedures for Cyclic Voltammetry, Daniel J. Graham, Ed.

[58] Uwe Tröltzsch, Olfa Kanoun, and Hans-Rolf Tränkler, "Characterizing aging effects of lithium ion batteries by impedance spectroscopy," vol. 51, pp. 1664-1672, Jan. 2006.

[59] Mirna Urquidi-Macdonald, Silvia Real, and Digby D. Macdonald, "Applications of Kramers—Kronig transforms in the analysis of electrochemical impedance data—III. Stability and linearity," Electrochimica Acta, vol. 35, pp. 1559-1566, 1990. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001346869080010L

[60] John Newman, "Resistance for flow of current to a disk," 1965.

[61] Aljaž Velikonja, Veronika Kralj-Iglič, and Aleš Iglič, "On asymmetric shape of electric double layer capacitance curve," International Journal of Electrochemical Science, vol. 1, pp. 1–7, 2015. [Online]. http://www.electrochemsci.org/papers/vol10/100100001.pdf

[62] Nir Gavish and Keith Promislow, "Dependence of the dielectric constant of electrolyte solutions on ionic concentration: A microfield approach," Phys. Rev. E, vol. 94, no. 1, p. 012611, July 2016. [Online]. https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.94.012611

[63] Jacob N. Israelachvili, , Jacob N. Israelachvili, Ed.: Elsevier, 2011, ch. The Debye Length, p. 312.

[64] Bryan Hirschorn et al., "Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters," Electrochimica Acta, vol. 55, no. 21, pp. 6218-6227, 2010, IMPEDANCE SPECTROSCOPY AND TRANSFER FUNCTIONS. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468609013413

[65] Tal M. Nahir and Edmond F. Bowden, "The distribution of standard rate constants for electron transfer between thiol-modified gold electrodes and adsorbed cytochrome c," Journal of Electroanalytical Chemistry,

vol. 410, pp. 9-13, 1996. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022072896045512

[66] J. Ross Macdonald, "Relaxation in systems with exponential or Gaussian distributions of activation energies," Journal of Applied Physics, vol. 61, pp. 700-713, 1987. [Online]. https://doi.org/10.1063/1.338222

[67] James Ross Macdonald, "Analysis of ac conduction in disordered solids," Journal of Applied Physics, vol. 65, pp. 4845-4853, 1989. [Online]. https://doi.org/10.1063/1.343196

[68] Walter Scheider, "Theory of the frequency dispersion of electrode polarization. Topology of networks with fractional power frequency dependence," The Journal of Physical Chemistry, vol. 79, pp. 127-136, 1975. [Online]. https://doi.org/10.1021/j100569a008

[69] A. Le Mehaute and G. Crepy, "Introduction to transfer and motion in fractal media: The geometry of kinetics," Solid State Ionics, vol. 9-10, pp. 17-30, 1983. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167273883902072

[70] J. B. Bates, Y. T. Chu, and W. T. Stribling, "Surface topography and impedance of metal-electrolyte interfaces," Phys. Rev. Lett., vol. 60, no. 7, pp. 627-630, Feb. 1988. [Online]. https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.60.627

[71] M. L. Tremblay, Manuel Martin, C. Lebouin, Andrzej Lasia, and Daniel Guay, "Determination of the real surface area of powdered materials in cavity microelectrodes by electrochemical impedance spectroscopy," Electrochimica Acta, vol. 55, pp. 6283-6291, Aug. 2010.

[72] Mark E. Orazem, Pavan Shukla, and Michael A. Membrino, "Extension of the measurement model approach for deconvolution of underlying distributions for impedance measurements," Electrochimica Acta, vol. 47, pp. 2027-2034, 2002. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468602000658

[73] Kenneth S. Cole and Robert H. Cole, "Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics," The Journal of Chemical Physics, vol. 9, pp. 341-351, 1941. [Online]. https://doi.org/10.1063/1.1750906

[74] Raymond M. Fuoss and John G. Kirkwood, "Electrical Properties of Solids. VIII. Dipole Moments in Polyvinyl Chloride-Diphenyl Systems*," Journal of the American Chemical Society, vol. 63, pp. 385-394, 1941. [Online]. https://doi.org/10.1021/ja01847a013

[75] David Lesmes, John Sturrock, and Kevin Frye, "A Physiochemical Interpretation of the Cole-Cole Dielectric Model," in Symposium on the Application of Geophysics to Engineering and Environmental Problems 2000., 2008, pp. 533-543. [Online]. https://library.seg.org/doi/abs/10.4133/1.2922785

[76] G. J. Brug, A. L. G. Eeden, M. Sluyters-Rehbach, and J. H. Sluyters, "The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element," Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, vol. 176, pp. 275-295, 1984. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072884803241

[77] Pedro Córdoba-Torres, Thiago J. Mesquita, and Ricardo P. Nogueira, "Relationship between the Origin of Constant-Phase Element Behavior in Electrochemical Impedance Spectroscopy and Electrode Surface Structure," J. Phys. Chem. C, vol. 119, pp. 4136-4147, 2015. [Online]. https://doi.org/10.1021/jp512063f

[78] Z. Kerner and T. Pajkossy, "On the origin of capacitance dispersion of rough electrodes," Electrochimica Acta, vol. 46, pp. 207-211, 2000, cited By 181. [Online]. https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034318537&doi=10.1016%2fS0013-4686%2800%2900574-0&partnerID=40&md5=a50a6efff96b02edf172b1c8900548fe

[79] Hugo Fricke, "A Mathematical Treatment of the Electric Conductivity and Capacity of Disperse Systems ii. The Capacity of a Suspension of Conducting Spheroids Surrounded by a Non-Conducting Membrane for a Current of Low Frequency," Phys. Rev., vol. 26, no. 5, pp. 678-681, Nov. 1925. [Online]. https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.26.678

[80] H. Fricke and S. Morse, "THE ELECTRIC RESISTANCE AND CAPACITY OF BLOOD FOR FREQUENCIES BETWEEN 800 AND 4(1/2) MILLION CYCLES," The Journal of general physiology, vol. 9, pp. 153-167, Nov. 1925. [Online]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2140800/

[81] A. Soley et al., "On-line monitoring of yeast cell growth by impedance spectroscopy," Journal of Biotechnology, vol. 118, pp. 398-405, 2005. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165605002907

[82] Mojca Pavlin et al., "Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension," Biophysical journal, vol. 88, pp. 4378-4390, June 2005. [Online]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1305665/

[83] David Holmes et al., "Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry," Lab Chip, vol. 9, no. 20, pp. 2881-2889, 2009. [Online]. http://dx.doi.org/10.1039/B910053A

[84] W. Gamal et al., "Real-time quantitative monitoring of hiPSC-based model of macular degeneration on Electric Cell-substrate Impedance Sensing microelectrodes," Biosensors and Bioelectronics, vol. 71, pp. 445-455, 2015. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566315300804

[85] I. Giaever and C. R. Keese, "Micromotion of mammalian cells measured electrically," Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 88, no. 17, pp. 7896-7900, 1991. [Online]. https://www.pnas.org/content/88/17/7896

[86] Joachim Wegener, Charles R. Keese, and Ivar Giaever, "Electric Cell–Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces," Experimental Cell Research, vol. 259, no. 1, pp. 158-166, 2000. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448270094919X

[87] Joachim Wegener, Manfred Sieber, and Hans-Joachim Galla, "Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces," Journal of Biochemical and Biophysical Methods, vol. 32, no. 3, pp. 151-170, 1996. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165022X9600005X

[88] V. Savolainen et al., "Impedance Spectroscopy in Monitoring the Maturation of Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium," Annals of Biomedical Engineering, vol. 39, p. 3055, Sep. 2011. [Online]. https://doi.org/10.1007/s10439-011-0387-1

[89] Yasumasa Ando, Koichi Mizutani, and Naoto Wakatsuki, "Electrical impedance analysis of potato tissues during drying," Journal of Food Engineering, vol. 121, pp. 24-31, 2014. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877413004123

[90] Olivier Y. F. Henry et al., "Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function," Lab on a chip, vol. 17, pp. 2264-2271, June 2017. [Online]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526048/

[91] G. Kottra and E. Frömter, "Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy," Pflügers Archiv, vol. 402, pp. 421-432, Dec. 1984. [Online]. https://doi.org/10.1007/BF00583943

[92] Herman P. Schwan, "Biological effects of non-ionizing radiations: cellular properties and interactions," Annals of biomedical engineering, vol. 16, pp. 245-263, 1988.

[93] D. A. Dean, T. Ramanathan, D. Machado, and R. Sundararajan, "Electrical Impedance Spectroscopy Study of Biological Tissues," Journal of electrostatics, vol. 66, pp. 165-177, Mar. 2008. [Online]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2597841/

[94] Ulf Wihlmark, Anders Wrigstad, Karin Roberg, Sven Erik G. Nilsson, and Ulf T. Brunk, "Lipofuscin Accumulation in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells Causes Enhanced Sensitivity to Blue Light Irradiation," Free Radical Biology and Medicine, vol. 22, no. 7, pp. 1229-1234, 1997. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584996005552

[95] Sven Erik G. Nilsson, Staffan P. Sundelin, Ulf Wihlmark, and Ulf T. Brunk, "Aging of cultured retinal pigment epithelial cells: oxidative reactions, lipofuscin formation and blue light damage," Documenta Ophthalmologica, vol. 106, no. 1, pp. 13-16, Jan 2003. [Online]. https://doi.org/10.1023/A:1022419606629

[96] Emilie Arnault et al., "Phototoxic Action Spectrum on a Retinal Pigment Epithelium Model of Age-Related Macular Degeneration Exposed to Sunlight Normalized Conditions," PLOS ONE, vol. 8, pp. 1-12, Aug. 2013. [Online]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071398

[97] Krishnamurthy V. Nemani, Karen L. Moodie, Jeoffry B. Brennick, Alison Su, and Barjor Gimi, "In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility," Materials Science and Engineering: C, vol. 33, no. 7, pp. 4453-4459, 2013. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493113004049

[98] G. Fuhr et al., "Radio-frequency microtools for particle and live cell manipulation," Naturwissenschaften, vol.

81, no. 12, pp. 528-535, Dec 1994. [Online]. https://doi.org/10.1007/BF01139998

[99] Marie-Claire Bélanger and Yves Marois, "Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: A review," J. Biomed. Mater. Res., vol. 58, no. 5, pp. 467-477, #apr# 2019. [Online]. https://doi.org/10.1002/jbm.1043

[100] Wenfeng Liang et al., "Determination of Cell Membrane Capacitance and Conductance via Optically Induced Electrokinetics," Biophysical Journal, vol. 113, no. 7, pp. 1531-1539, Oct. 2017. [Online]. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.006

[101] P. Córdoba-Torres et al., "On the intrinsic coupling between constant-phase element parameters α and Q in electrochemical impedance spectroscopy," Electrochimica Acta, vol. 72, pp. 172-178, 2012. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001346861200552X

[102] David T. Harvey, Titrimetric Methods of Analysis dans Modern Analytical Chemistry, 2000.

[103] J. Leipziger, R. Nitschke, and R. Greger, Regulation of the Intracellular Calcium Concentration in Epithelial Cells, 1996.

[104] Jose Yeste et al., "A compartmentalized microfluidic chip with crisscross microgrooves and electrophysiological electrodes for modeling the blood-retinal barrier.," Lab on a chip, vol. 18, no. 1, pp. 95-105, Dec. 2017.

[105] J. M. Gutteridge, "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage.," Clinical Chemistry, vol. 41, pp. 1819-1828, 1995. [Online]. http://clinchem.aaccjnls.org/content/41/12/1819

[106] Elisabetta Petrucci, Anna Da Pozzo, and Luca Di Palma, "On the ability to electrogenerate hydrogen peroxide and to regenerate ferrous ions of three selected carbon-based cathodes for electro-Fenton processes," Chemical Engineering Journal, vol. 283, pp. 750-758, 2016. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894715011006

[107] de l'environnement et du travail Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, "https://www.anses.fr/fr/content/led-les-recommandations-de-l%E2%80%99anses-pour-limiter-l%E2%80%99exposition-%C3%A0-la-lumi%C3%A8re-bleue," unpublished May 2019.

[108] Devasier Bennet, Min-Gon Kim, and Sanghyo Kim, "Light-induced anatomical alterations in retinal cells," Analytical Biochemistry, vol. 436, pp. 84-92, 2013. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269713000456

[109] Mélanie Marie et al., "Light action spectrum on oxidative stress and mitochondrial damage in A2E-loaded retinal pigment epithelium cells," Cell Death & Disease, vol. 9, p. 287, 2018. [Online]. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0331-5

[110] Albert H. Soloway, Robert W. Curley, and Scott M. Soloway, "Macular degeneration: A possible biochemical mechanism," Medical Hypotheses, vol. 76, pp. 729-732, 2011. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987711000600

[111] Janet R. Sparrow et al., "A2E-epoxides Damage DNA in Retinal Pigment Epithelial Cells: VITAMIN E AND OTHER ANTIOXIDANTS INHIBIT A2E-EPOXIDE FORMATION," Journal of Biological Chemistry, vol. 278, pp. 18207-18213, 2003. [Online]. http://www.jbc.org/content/278/20/18207.abstract

[112] A. E. Dontsov, N. L. Sakina, and M. A. Ostrovsky, "Comparative study of the dark and light-induced toxicity of lipofuscin granules from human retinal pigment epithelium and their chromophore A2E on the cardiolipin liposome model," Russian Chemical Bulletin, vol. 61, pp. 442-448, Feb. 2012. [Online]. https://doi.org/10.1007/s11172-012-0061-2

[113] Martin L. Yarmush, Alexander Golberg, Gregor Serša, Tadej Kotnik, and Damijan Miklavčič, "Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges," Annual Review of Biomedical Engineering, vol. 16, pp. 295-320, 2014, PMID: 24905876. [Online]. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-104622

[114] G. Saulis, M. S. Venslauskas, and J. Naktinis, "Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation," Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, vol. 321, pp. 1-13, 1991. [Online]. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022072891855646

[115] M. R. Hee, J. A. Izatt, E. A. Swanson, and et al, "Optical coherence tomography of the human retina,"

Archives of Ophthalmology, vol. 113, pp. 325-332, 1995. [Online]. + http://dx.doi.org/10.1001/archopht.1995.01100030081025

[116] G H Travis, , Joseph Besharse and Dean Bok, Eds.: Elsevier, 2011, ch. Alternative Visual Cycle in Müller Cells, p. 17.

[117] "www.octscans.com," unpublished.

[118] R. Williamson, "A Sensory Basis for Orientation in Cephalopods," Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, vol. 75, pp. 83–92, 1995.

[119] Tim Gollisch and Markus Meister, "Eye smarter than scientists believed: Neural computations in circuits of the retina," Neuron, vol. 65, pp. 150-164, Jan. 2010. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3717333/

[120] Michael J. Doughty and Mohammed L. Zaman, "Human Corneal Thickness and Its Impact on Intraocular Pressure Measures," Survey of Ophthalmology, vol. 44, pp. 367-408, #mar# 2000. [Online]. https://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00110-7

[121] Veena Bhardwaj and Gandhi Parth Rajeshbhai, "Axial Length, Anterior Chamber Depth-A Study in Different Age Groups and Refractive Errors," Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR, vol. 7, pp. 2211-2212, Sep. 2013. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3843406/

[122] Michael J. Doughty and Mohammed L. Zaman, "Human Corneal Thickness and Its Impact on Intraocular Pressure Measures," Survey of Ophthalmology, vol. 44, pp. 367-408, Mar. 2000. [Online]. https://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00110-7

[123] Fabien Miomandre, Saïd Sadki, Pierre Audebert, and Rachel Méallet-Renault,.: Dunod, 2014, ch. Aspects cinétiques de la réaction électrochimique, p. 59.

[124] Philip H. Rieger, , Philip H. Rieger, Ed.: Chapman & Hall, 1993, ch. Electron-transfert kinetics, p. 318.

[125] Claude GABRIELLI, "Méthodes électrochimiques Mesures d'impédances," Techniques de l'ingénieur Essais et expertise en corrosion et vieillissement, vol. base documentaire : TIB499DUO., 1994, fre. [Online]. https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/essais-et-expertise-en-corrosion-et-vieillissement-42499210/methodes-electrochimiques-p2210/

[126] Christine Lefrou, Pierre Fabry, and Jean-Claude Poignet,.: EDP Science, 2013, ch. Passage d'un courant : processus hors équilibre, p. 173.

[127] J. E. B. Randles, "Kinetics of rapid electrode reactions," Discuss. Faraday Soc., vol. 1, no. 0, pp. 11-19, 1947. [Online]. http://dx.doi.org/10.1039/DF9470100011

[128] Craig E. Banks Dale A. Brownson, , Craig E. Banks Dale A. Brownson, Ed.: Springer, 2014, ch. Interpreting Electrochemistry, p. 23.

[129] E. Warburg, "Ueber das Verhalten sogenannter unpolarisirbarer Elektroden gegen Wechselstrom," Annalen der Physik, vol. 303, pp. 493-499. [Online]. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/andp.18993030302

Cette thèse se place dans le contexte de l'étude de l'interface électrode-tissus et porte sur l'étude par spectroscopie d'impédance de l'interface entre électrodes et cellules épithéliales de la rétine : l'épithélium pigmenté. Les cellules RPE (Retinal Pigment Epithelium) qui constituent cet épithélium forment une monocouche qui à confluence est composée de cellules de forme polygonale. Elles sont juxtaposées et en contact intime les unes avec les autres par la présence de jonctions serrées. Un épithélium pigmenté endommagé est souvent associé à des pathologies de la vision.
La spectroscopie d'impédance est une méthode de mesure qui permet d'étudier de manière non destructive un milieu composé d'éléments diélectriques et conducteurs. Cette mesure s'applique particulièrement bien aux cellules épithéliales. On applique ce principe à l'étude du tapis cellulaires. Les membranes cellulaires remplissent le rôle de milieu diélectrique (isolant) alors que les milieux ioniques intra et extracellulaires se comportent comme un électrolyte (conducteur). On peut en première approche analyser le module de l'impédance mesurée à une fréquence donnée afin de suivre le développement des tissus. Par exemple dans le domaine des implants à électrodes les fréquences autour de 1 KHz sont couramment utilisées. On peut par la suite mesurer l'impédance dans une gamme de fréquence plus importante et appliquer un modèle équivalent composé de dipôles électriques aux mesures qui reflète les différents éléments du tissu. L'analyse des paramètres extraits peut donner une interprétation plus fine du tapis cellulaire et de son état physiologique. Deux études seront principalement abordées dans cette thèse : tout d'abord l'étude de l'utilisation de l'élément à constante de phase (CPE) dans la représentation du tapis cellulaire et ensuite dans le cadre de ce modèle et afin de préciser son interprétation, on va étudier l'état du tapis cellulaire face à différentes perturbations en regard des paramètres extraits du modèle. Ce travail s'inscrit dans le suivi de tissus épithéliaux mais pourrait également s'adapter à d'autres types de tissus, par exemple dans le contexte des implants neuronaux.

This manuscript belongs in the field of electrode-tissue interface and focuses on studying the interface between an electrode and epithelial cells of the retina: the Retinal Pigment Epithelium (RPE). The cells that are part of this epithelium develop until they form a monolayer of cells with close lateral contact involving the presence of tight junctions. A damaged epithelium is often associated with sight alterations.
Impedance spectroscopy is a measurement method that allows studying materials containing both conducting and dielectric elements in a non–destructive way. We apply this technique to the RPE cells layer. Cells membranes are the dielectric part while the intra and extracellular mediums are the conductive parts of this material. In a first stage one can measure the impedance at a fixed frequency as a way to follow tissues development. As an example, the 1 KHz frequency is often considered in characterizing electrodes from implanted devices. One can also measure the impedance over a wider bandwidth and apply an electric model circuit to the data. The extracted parameters can give a better interpretation of the state of the cell layer. In this work, two parts will be mainly investigated. First we will evaluate the use of a constant phase element in part of the electrical model describing the cell layer. Second, and considering the same model, we will observe the reaction of the model when the cells are subject to various perturbations. This work is in the framework of epithelial tissues but could apply to other kind of tissues for instance in the field of neural implants.