HAL open science

Conception et réalisation d'un dispositif tridimensionnel à matrice de microélectrodes pour la mesure électrophysiologique et la détection pH d'une culture neuronale in vitro

Asma Eddarir

▶ **To cite this version:**

Asma Eddarir. Conception et réalisation d'un dispositif tridimensionnel à matrice de microélectrodes pour la mesure électrophysiologique et la détection pH d'une culture neuronale in vitro. Energie électrique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30216 . tel-04031555

HAL Id: tel-04031555

https://theses.hal.science/tel-04031555v1

Submitted on 16 Mar 2023

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Asma EDDARIR

Le 22 Septembre 2022

Conception et réalisation d'un dispositif tridimensionnel à matrice de microélectrodes pour la mesure électrophysiologique et la détection pH d'une culture neuronale *in vitro*

Ecole doctorale : **GEETS - Génie Electrique Electronique Télécommunications et Santé : du système au nanosystème**

Spécialité : **MicroNano Systèmes**

Unité de recherche :

LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par
Christian BERGAUD

Jury
M. Steve ARSCOTT, Rapporteur
M. Serge BERNARD, Rapporteur
Mme Anne HEMERYCK, Examinatrice
Mme Sophie PAUTOT, Invitée
M. Ali MAZIZ, Co-encadrant de thèse
M. Christian BERGAUD, Directeur de thèse

À mes chers parents

« Prenez trois hommes au hasard des rues ; ils auront nécessairement quelque chose à m'enseigner. Les qualités de l'un me serviront de modèle, les défauts de l'autre d'avertissement. »

Confucius

« Le vrai point d'honneur n'est pas d'être toujours dans le vrai. Il est d'oser, de proposer des idées neuves, et ensuite de les vérifier. »

Pierre Gilles-De Gennes, Prix Nobel de physique en 1991

Remerciements

Je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la mise en place et la réalisation de ces travaux de thèse ainsi qu'à mon épanouissement au sein du LAAS-CNRS.

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury, Serge Bernard pour avoir accepté de présider mon jury à la dernière minute, Steve Arscott et Serge Bernard pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi que Anne Hemeryck d'avoir accepté d'examiner mes travaux avec un temps restreint. Je remercie également Pierre Temple-Boyer d'avoir pris le temps de lire mes travaux. Enfin, je remercie Sophie Pautot pour avoir suivi ces travaux avec intérêt et enthousiasme et pour sa participation à ma soutenance.

Mes remerciements se tournent maintenant vers mes encadrants de thèse Christian Bergaud et Ali Maziz. Merci de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet qui s'est construit sur le tas. Je retiendrai également leur temps consacré aux longs échanges scientifiques pendant les réunions pour faire avancer le projet. Pour cela, je les en remercie.

J'exprime mes remerciements au partenaire du projet 3DNeuroChip, la startup Synaxys sans qui le projet n'aurait pas vu le jour. Je tiens à remercier Sophie Pautot la présidente de Synaxys qui m'a offert de son temps et son expertise en neurobiologie. Je souhaiterais également dire merci à la petite équipe de Synaxys qui m'a bien intégré: Mohammed et Fabienne.

J'exprime également ma reconnaissance aux services TEAM et I2C qui m'ont assisté dans la réalisation technique de mes travaux, et plus précisément : Sandrine, Xavier, Julie, Adrian, Laurent, Benjamin, Guillaume, Frank, Samuel, David. C, Éric et Aurélie.

Je tiens à remercier les anciens et les nouveaux membres de l'équipe MEMS : Valentin avec qui j'ai apprécié travailler et partager aussi bien en électrochimie qu'en débat politique, Elise la bienveillance incarnée et son soutien moral, Aarushee ma voisine de bureau, Clément pour les bons moments passés, Lucien pour être à la fois délirant et sérieux, Suresh pour son aide apporté et ses discussions sur le cosmos, Refik le joyeux et enthousiaste chercheur, Daisuke mon collègue de bureau silencieux mais tellement bienveillant, Aleksandra pour son esprit aventurière, Elias pour son humour déplacé, Leïla la dernière stagiaire. Enfin je remercierai le clan des chefs MEMS Bernard, Christian, Ali, Vincent et Liviu.

Il se passe pleins de choses au LAAS et dont de très belles rencontres. Je tiens particulièrement à remercier Camille Bene, une belle personne avec énormément de bonté et de générosité qui a rendu mes dernières années passées au LAAS bien joyeuses, merci Camille ! Marion Valette qui j'ai connu dès les débuts de mon arrivée au LAAS qui a été d'une gentillesse précieuse et dont je garderai à jamais dans mon cœur. Chaymaa Haloui et Dany Hachem de précieux collègues qui sont devenus de très chers amis. Fadhila Sekli une très belle rencontre humaine et professionnel. Sabah une personne ravissante et généreuse. Ali Mosca plein de gentillesse. J'aimerai enfin remercier des personnes qui ont aussi beaucoup compter pour moi et dont leurs rencontres restera à jamais gravé : Dima, Soufian, Mathieu, Zahraa, Hajer, Sai, Lisa Ly, Marianne, Demba, Raphaël, Douglas, Amel, Sabeha, Iman.A, Adem, Ahmet,

Benattou, Yassine, Nour, Elise.B, Iman, Arij, Baptise.A, Baptiste.J, Inès, Olivia, Elias, Alexsandra, Paul, Aymen, Lyne, Bayan, Amani, Yegor, Benjamin, Titouan, Botayna, Jensheer, Willou, Anaïs, David, Felippe, Eugénie, Isabelle, Tao, Kamil, Margot, Ilias, Napoléon, Boris, Anne, Lucas, Moussa et tous ceux dont j'ai oublié de citer faute de mémoire ^^

Je remercie profondément toute ma famille, mes parents, mes sœurs et frère Hajar, Anas, Ikram et Chaymaa, mon petit neveux Souleyman, mes grands-parents, pour leur soutien, leurs encouragements, et leur amour durant ces années de thèse.

Merci **Thank you** 감사합니다 جَزَاكَ اللَّهُ خَيْرًا

Abstract

Design and realization of a three-dimensional microelectrodes matrix device for electrophysiological measurement and pH detection of neuronal culture *in vitro*.

There has been a great deal of interest in developing 3-dimensional *in vitro* brain models or brain organoids that accurately replicate the *in vivo* architecture and functionality of brain tissue, which is limited in traditional two-dimensional (2D) cell-culture models. Although electrophysiological recordings through the planar MicroElectrodes Arrays (MEAs) are a common method of evaluating neuronal function of the 3D structures, the main limitation of this approach is that only surface measurements are possible and 3D data are not accessible, leading to inaccurate measurements. Such capability is critically important in the accurate evaluation of neuronal function in 3D cell structure models.

During this PhD, we first have addressed this issue by developing a new integrated platform for measuring the neuronal activity of 3D *in vitro* cultures, leveraging knowledge from implantable *in vivo* devices developed by our group. The setup device is based on an integrated implant based on Parylene C, a flexible and biocompatible polymer, on a planar MEA glass chip that can capture network-depth electrophysiology in a 3D *in vitro* neural matrix. Standard microelectronic processes such as photolithography and plasma etching, usually involved in microsystems fabrication, have been used for the design of the new 3D platform. The use of the micrometer electrodes with a diameter ranging from 20 to 40 µm, provides more localized recordings at the single cell level. However, as the electrode dimensions decrease, the impedance increases affecting the quality of signal recordings. Here, we used the conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythio-phene):poly(styrene-sulfonate) (PEDOT:PSS) to lower the impedance and obtain a better signal-to-noise ratio for neuron recording. Rat cortical neurons were then seeded onto the 3D device, enabling growth of suspended cells in the matrix and the formation and maturation of a neural network around the 3D parylene probe. The device supported the growth of functional neurons in 3D with action potential (spike) activity recorded over 48 days *in vitro*.

In a second part, our work focused of monitoring the metabolic activity of neural cells by measuring the pH in the extracellular environment. We developed a microelectrode array with recording sites capable of measuring pH from nearby cells. The electrode material consisted of electrochemical deposited iridium oxide (IrO_x), previously shown in the literature to be sensitive to pH. The electrochemical deposition of IrO_x has been performed through three different electrochemical routes on gold electrodes on a glass substrate. These electrodes have been fully characterized both at a macroscopic and microscopic scale. The pH electrodes exhibit good pH sensitivity in the pH range of 2-12, approaching the value of 74 mV/pH. The electrodes typically show potential drift (long-term stability), leading to inaccuracy of pH detection. We discussed the reason caused the potential drift of the IrO_x electrode, the response mechanisms in saline solutions, and finally the electrode/solution interface response of the IrO_x electrode was established.

In conclusion, the technology described here, is an important step in facilitating noninvasive electrophysiological characterization of three-dimensional *in vitro* models.

Résumé

Conception et réalisation d'un dispositif tridimensionnel à matrice de microélectrodes pour la mesure électrophysiologique et la détection pH d'une culture neuronale *in vitro.*

Les modèles cerveaux *in vitro* ou les organoïdes cérébraux présentent un grand intérêt pour répliquer avec précision l'architecture et les fonctionnalités d'un tissu cérébral *in vivo*, ce dont les cultures cellulaires bidimensionnelle (2D) ne peuvent pas reproduire. Bien que les enregistrements électrophysiologiques à travers le réseau planaire des microélectrodes (MEA) soient une méthode courante pour évaluer l'activité neuronale d'une structure cellulaire 3D. La principale limite de cette approche réside sur le fait que seulement des mesures surfaciques sont prises en compte alors que les mesures spatiales (3D) restent inaccessibles, conduisant ainsi à des mesures et à une interprétation des données incomplète. En effet, aucun système ne permet encore un échantillonnage 3D des activités électriques neuronales.

Au cours de cette thèse, nous avons conçu et fabriqué un micro-dispositif qui permet d'enregistrer l'activité électrique en 3D des cultures neuronales. Cette nouvelle stratégie technologique se présente sous la forme d'un couplage de deux micro-dispositifs : une MEA planaire afin de recueillir l'activité électrique sur un plan, et d'un implant flexible à base de Parylene C pour un échantillonnage spatial en profondeur du tissu. Ce choix s'est notamment décidé parce que nous avons acquis au cours de précédentes thèses au LAAS une méthodologie de fabrication de ces deux systèmes. Divers procédés de la microélectronique, comme la photolithographie et la gravure plasma, utilisés communément pour le développement de microsystèmes, ont été utilisés pour la conception du micro-dispositif 3D. Après le procédé de fabrication, nous avons focalisé notre étude sur les performances électriques du dispositif. L'utilisation d'électrodes micrométriques, avec un diamètre de 20 à 40 µm, permet de localiser les zones d'enregistrement à l'échelle du neurone unique. Cependant, la réduction de la taille des électrodes conduit à une augmentation de l'impédance ce qui dégrade la qualité d'enregistrement des signaux neuronaux. Ici, un polymère conducteur, le poly(3,4-ethylenedioxythiophene) poly(styrene-sulfonate) (PEDOT:PSS), a été utilisé pour améliorer les caractéristiques électriques d'enregistrement d'électrodes de petites dimensions et obtenir un meilleur rapport signal sur bruit durant des enregistrements neuronaux. Des cultures de neurones de rongeurs ont été réalisées sur cette plateforme 3D et une activité électrique spontanée (potentiels d'action) a pu être enregistrée pendant 48 jours.

Dans la seconde partie de cette thèse, nos travaux ont porté sur le suivi de l'activité métabolique dans le milieu extracellulaire. Nous avons choisi d'étudier l'intégration d'un capteur de pH dans le dispositif à matrice de microélectrodes. En effet, La possibilité de suivre ce paramètre dès les premiers stades du procédé biologique d'une culture neuronale 3D représente un avantage considérable pour un développement de tissu nerveux *in vitro* plus pertinent. Pour le capteur, nous avons développé une couche sensible au pH à base d'oxyde d'iridium (IrO_x) électrodéposé sur or. L'influence de différents paramètres (méthode d'électrodéposition, épaisseur et nature du substrat) sur la réponse au pH de ces couches a été étudiée. Les capteurs développés présentent une bonne sensibilité au pH dans la plage de pH de 2-12, approchant la valeur de 74 mV/pH. Les tests de stabilité à long terme ont montré une dérive potentielle des micro capteurs, entraînant une imprécision de la détection du pH à long terme.

En conclusion, les systèmes d'enregistrement 3D de l'activité électrique neuronale conçus au cours de cette thèse présentent des caractéristiques prometteuses pour l'échantillonnage 3D des modèles de cultures *in vitro*.

Table des matières

Introduction **1**

1 Chapitre. 1 Etat de l'art et positionnement de la thèse **7**

1.1 Du modèle *in vivo* au modèle *in vitro* 7

1.1.1 Définition d'un organoïde 8

1.1.1.1 Caractéristiques et fonctionnalités des organoïdes 9

1.1.1.2 Fonctionnalités des organoïdes 13

1.2 Les organoïdes cérébraux 14

1.2.1 Introduction 14

1.2.1.1 Le potentiel d'action 15

1.2.2 Les modèles d'organoïdes cérébraux 18

1.2.3 Echafaudage des organoïdes cérébraux 19

1.2.4 Reproductibilité des organoïdes cérébraux 21

1.2.5 Application des organoïdes cérébraux 22

1.2.6 Moyens de caractérisations des cultures organoïdes cérébraux *in vitro* 23

1.2.6.1 Caractérisations structurelles 23

1.2.6.2 Caractérisations fonctionnelles 25

1.3 Le suivi du développement de l'organoïde cérébral avec les MEAs 29

1.3.1 L'intérêt des MEAs 29

1.3.2 Les nouveaux modèles de MEA pour le suivi des cultures 3D 30

1.4 Les outils adaptés pour le suivi physiologique des cultures d'organoïdes 34

1.4.1 Les capteurs optiques et électrochimiques 35

1.4.1.1 Capteurs optiques 35

1.4.1.2 Capteurs électrochimiques 37

1.5 Plan de thèse 40

1.6 Références 42

2 Chapitre. 2 Fabrication de micro-dispositifs d'enregistrement tridimensionnels **55**

2.1 Concept et modèle du micro-dispositif 55

2.2 Microfabrication du micro-dispositif MEA-Implant 56

2.2.1 Procédés de fabrication d'une Micro Electrode Array (MEA) 56

2.2.1.1 Etapes de fabrication 57

2.2.1.2 Découpe et conditionnement de la MEA 59

2.2.2 Procédés de fabrication de l'Implant 60

2.2.2.1 Choix du matériau 60

2.2.2.2 Etapes de fabrication 61

2.2.2.3 Mise en place de la connectique électrique filaire 64
2.3 Caractérisations électrochimiques des microélectrodes de la MEA et de l'implant 66
2.3.1 Montage électrochimique 66
2.3.2 Voltammétrie Cyclique (CV) 67
2.3.2.1 Principe d'une mesure par CV 67
2.3.2.2 CV des microélectrodes d'or 68
2.3.3 Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (EIS) 68
2.4 Couplage des micro-dispositifs MEA et Implant 70
2.4.1 Fabrication du capot 71
2.4.2 Mise en place de la chambre sur la MEA 72
2.4.3 Fixation et positionnement de l'implant sur la MEA 72
2.5 Conclusion 73
2.6 Références 74
3 Chapitre. 3 Mesures électrophysiologies d'une culture hippocampe 3D sur MEA 79
3.1 Introduction 79
3.2 Méthodes d'enregistrement 82
3.2.1 Mesure du bruit 83
3.2.2 Détection des potentiels d'actions (PA) 83
3.2.3 Caractéristiques des microélectrodes 84
3.2.4 Fonctionnalisation des électrodes avec du PEDOT : PSS 86
3.2.4.1 Protocole de dépôt du PEDOT : PSS 87
3.2.4.2 Caractérisations électrochimiques 89
3.3 Déroulement de l'enregistrement de l'activité électrophysiologique d'une culture neuronale 3D avec le micro-dispositif 3D 90
3.3.1 La croissance d'une culture hippocampe 3D in vitro sur MEA 90
3.3.2 Les neurones d'embryons de rats 91
3.3.3 Mise en place de la culture neuronale dans le micro-dispositif MEA-implant 92
3.3.4 Acquisition des données extracellulaires du micro-dispositif 93
3.4 Analyse des résultats 94
3.4.1 Détection de l'activité spontanée de la culture neuronale 3D avec le micro-dispositif. 95
3.4.1.1 Détection spontanée des PA 96
3.4.1.2 Fréquence des PA détectés 98
3.4.1.3 Analyse des PA détectés 98
3.4.1.4 Conclusion 102
3.4.2 Suivi de la croissance neuronale dans l'espace et dans le temps 102
3.4.2.1 Mesure de l'activité spontanée 103

3.4.2.2 Mesure de l'activité après stimulation électrique 104
3.5 Etude du vieillissement des électrodes MEA commerciales 107
3.5.1 Protocole expérimentale 108
3.5.2 Etude du signal enregistré avec les électrodes traitées et non traitées avec du PEDOT:PSS 109
3.5.3 Etude du signal enregistré avec ou non traitement des électrodes commerciales sur le long terme 112
3.5.4 Conclusion 115
3.6 Conclusion 115
3.7 Références 117
4 Chapitre. 4 Intégration d'un micro capteur sur MEA pour la détection de pH dans une culture neuronale *in vitro* 125
4.1 Vers une standardisation des cultures 3D 125
4.2 Les oxydes métalliques 126
4.2.1 Introduction 126
4.2.1.1 L'oxyde d'Iridium (IrOx) 126
4.2.2 L'Oxyde d'Iridium amorphe 129
4.2.2.1 Méthodes de fabrication par voie électrochimique 129
4.3 Etude du capteur pH EIROF ou IrOx 133
4.3.1 Méthodes de dépôts électrochimiques des IrOx 134
4.3.1.1 La Chronopotentiométrie (CP) 134
4.3.1.2 La Chronoampérométrie (CA) 135
4.3.1.3 La Voltammétrie Cyclique (CV) 135
4.3.1.4 Chronoampérométrie à trains d'impulsions répétitives (CA à régime pulsé) 135
4.3.2 Dépôt électrochimique de l'IrOx 137
4.3.2.1 Protocole expérimental 137
4.3.2.2 Caractérisation des dépôts 139
4.3.2.3 Mesure de sensibilité pH du dépôt IrOx 143
4.3.2.4 Facteurs d'instabilité du capteur pH 146
4.3.3 Optimisation de la fabrication du capteur pH pour des suivis long terme 148
4.3.3.1 Etude avec une membrane protectrice 148
4.3.3.2 Etude sur l'épaisseur d'IrOx déposée 154
4.3.3.3 Conclusion sur l'optimisation de la stabilité du capteur pH IrOx 160
4.4 Transfert du capteur pH IrOx sur MEA 160
4.4.1 Electrodéposition et caractérisation du capteur pH sur MEA 160
4.4.2 Calibration du capteur pH sur MEA 163

4.5 Conclusion et perspectives 165
4.6 Références 169
Conclusions générales et perspectives de recherche.....177
Annexes 183

Glossaire

iPSC : Cellule souche pluripotente induite

ECS : Cellule souche embryonnaire

PA : Potentiel d'action

MEA : MicroElectrode Array

WE : Electrode de travail

CE : Contre Electrode

CA : Chronoampérométrie

CP : Chronopotentiométrie

CV : Voltammétrie Cyclique

EIS : Spectroscopie d'impédance électrochimique

OCV : Potentiel Circuit Ouvert

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

CSC : Capacité de Stockage de Charge

IrOx : Oxyde d'Iridium

EIROF: Electrodeposited Iridium Oxide Film

AIROF : Anodically formed Iridium Oxide Film

TIROF: Thermally formed Iridium Oxide Film

PEDOT : PSS : Poly (3,4-éthylènedioxythiophène) : poly(styrène sulfonate) de sodium

INTRODUCTION

Ce projet doctoral s'inscrit dans la conception et la fabrication d'un micro-dispositif électrophysiologique pour le suivi de l'activité neuronale d'un organoïde cérébral. L'organoïde est un système biologique auto-organisé en trois dimensions (3D) récapitulant la structure et les types cellulaires des organes qu'ils visent à mimer ainsi que certaines de leurs fonctions. Les organoïdes sont destinés à modéliser le vivant avec différentes finalités, et l'organoïde cérébral est notamment un modèle de développement « *in vitro* » représentant une ou plusieurs régions du cerveau dans sa version normale ou pathologique.

Le cerveau est l'organe nerveux le moins exploré du système nerveux central du fait de la difficulté d'analyser les connexions neuronales entre les différentes régions du cerveau humain lorsque celui-ci est encore vivant. Il est difficile d'imaginer que la complexité du cosmos est plus explorée que le cerveau, du fait du manque d'outils adaptés à son exploration. Les organoïdes cérébraux permettent donc de recréer un système très pertinent sur le plan physiologique qui permet aux chercheurs d'étudier des questions complexes et multidimensionnelles liées au cerveau, telles que l'apparition de maladies neurodégénératives, la régénération des tissus et les interactions entre les organes. Ils peuvent pallier les insuffisances des modèles cérébraux post-mortem et des modèles animaux classiques pour générer des résultats pertinents d'un point de vue clinique. Les organoïdes cérébraux vont donc apporter une aide considérable pour la compréhension du développement cérébral depuis le moment embryonnaire jusqu'à sa dégénérescence (vieillesse). Les organoïdes cérébraux permettent à cet effet d'étudier les premiers stades du développement cérébral et l'apparition de maladies neurodégénératives comme : Alzheimer, Autisme, etc., qui ne sont d'ailleurs diagnostiquées que bien plus tard lorsque la maladie a bien progressé. Ils permettront également d'installer des modèles précliniques dans la recherche de nouveaux médicaments, favorisant la pratique de thérapies personnalisées et à la réparation tissulaire. Les organoïdes promettent donc de prendre une place cruciale dans la recherche de demain en tant que révolution technique mais également préclinique, voire clinique.

Le premier enjeu de cette thèse concerne le suivi du développement neuronal des organoïdes cérébraux dans le temps. L'information neuronale étant distribuée sur des centaines voire des milliers de cellules interconnectées en 3D. Décrypter précisément le code neuronal de ces systèmes biologiques nécessite d'enregistrer un grand nombre de cellules simultanément en couvrant finement le système biologique 3D en profondeur. Pour cela, des matrices de microélectrodes (MEA) planaires sont en général positionnées au contact du tissu afin de recueillir les activités électriques du réseau dans plusieurs endroits et en simultané. Cependant, une limitation importante des systèmes MEA planaires est à considérer du point de vue de l'échantillonnage spatial. Les MEA planaires ne permettent pas un échantillonnage 3D des activités électriques neuronales. Pourtant, plusieurs études montrent que l'information neuronale est réellement portée par une architecture 3D du système. Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse est de concevoir et tester un micro-dispositif qui permettrait d'enregistrer l'activité électrique en 3D des organoïdes cérébraux. Cette nouvelle stratégie technologique se présente sous la forme d'un couplage de deux micro-dispositifs : une MEA

planaire afin de recueillir l'activité électrique sur un plan, et d'un implant pour un échantillonnage spatial en profondeur du tissu. Ce choix s'est notamment décidé parce que nous avons acquis au cours de précédentes thèses au LAAS une méthodologie de fabrication de ces deux systèmes.

Un second enjeu concerne la standardisation des organoïdes cérébraux au cours des procédés biologiques pour reproduire le même type de tissu nerveux et avec les mêmes conditions physiologiques. De manière général la culture 3D d'organoïde est basée sur la croissance cellulaire à travers un matériel support (hydrogel, billes biocompatibles, etc.). Cependant, ces supports peuvent poser des limites à la diffusion et introduire des gradients de concentration d'oxygène, de pH ou de nutriments (glucose, lactate, etc.), ce qui peut augmenter l'hétérogénéité du système cellulaire. Cette information varie par exemple d'un point à un autre de la surface de l'organoïde, mais également dans la profondeur du tissu entre les différentes couches cellulaires. La possibilité de suivre ces paramètres dès les premiers stades du procédé biologique représente un avantage considérable pour un développement de tissu nerveux plus pertinent. Dans ce contexte, le second objectif de mes travaux de thèse sera d'intégration d'un capteur pH au sein du micro-dispositif 3D. Ainsi le micro-dispositif 3D final permettra de suivre sur le long terme l'activité électrique neuronale du réseau cellulaire simultanément avec les données de suivi métabolique du pH.

L'activité de recherche, dont fait état ce manuscrit, a été menée conjointement au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) du CNRS et la start-up Toulousaine Synaxys, qui développe des procédés de différenciation cellulaire pour répliquer *in vitro* les propriétés des réseaux de neurones 3D *in vivo*. Depuis quelques années, ces deux groupes travaillent en étroite collaboration afin d'associer leurs compétences et expertises complémentaires dans les domaines de la biologie cellulaire et des technologies de microfabrication. Dans ce contexte, les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la cadre du projet « 3DNeuroChip » qui vise à terme de développer matrices de microélectrodes tridimensionnelles multisites pour une imagerie 3D de l'activité électrique du tissu nerveux.

Le présent manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Le **Chapitre 1**, présente le contexte scientifique dans lequel la thèse s'est développée. Tout d'abord sont discutés les choix de nouveaux modèles d'organoïdes capables de bio mimer *in vitro* les caractéristiques des organes humains *in vivo*, entre autres les organoïdes cérébraux. Ensuite, une présentation des méthodes d'élaboration des organoïdes cérébraux *in vitro* est discutée avec les outils adaptés pour suivre le développement du réseau neuronal. L'une d'elles est la mesure des activités extracellulaires des neurones de l'organoïde avec des MEAs. Nous avons au cours de ce chapitre porté l'attention sur les différents dispositifs MEAs microfabriqués pour les mesures extracellulaires des cultures neuronales 3D et dont leurs limites résident sur la mesure des activités extracellulaire en 3D. Cela conduit donc au besoin d'un nouveau micro-dispositif intégrant une composante 3D capable de surveiller des activités neuronales en 3D et dont nous nous proposons de développer dans cette thèse. Dans la littérature il n'existe encore que quelques méthodologies publiées pour ce type de mesure. Enfin une dernière partie est consacrée aux capteurs adaptés pour le suivi physiologique des organoïdes

tels que l'oxygène ou le pH qui sont essentielles pour limiter la variabilité expérimentale des organoïdes et augmenter leurs reproductibilités.

Dans le **Chapitre 2**, l'attention a été portée sur la conception et le couplage de deux micro-dispositifs MEA-implant qui vont assurer la mesure électrophysiologique de l'organoïde cérébral en 3D. Il est d'abord discuté dans ce chapitre, sur la microfabrication d'un implant et d'une MEA planaire par une suite d'étapes de microtechnologies (photolithographie, évaporation, lift-off, etc.…) en salle blanche, au LAAS. Ensuite sont abordées les étapes de connectiques et de caractérisations électriques des microélectrodes. Enfin, la dernière étape de couplage des deux systèmes de mesures MEA-implant est discutée.

Dans le **Chapitre 3**, la validation du micro-dispositif de mesure tridimensionnelle MEA-implant est testé pour le suivi en temps réel de l'activité extracellulaire du réseau neuronal d'un hippocampe de rat sur une période de culture de 7 semaines. Tout d'abord, nous avons explicité la méthode de mesure des potentiels d'actions avec l'utilisation d'un logiciel MCS (Multi Channel System) et avec l'utilisation de deux systèmes d'acquisition synchronisés : MEA et implant. Ensuite, les potentiels d'action du réseau neuronal 3D sont enregistrés de manière spontanée et synchronisés en 3D. Dans un autre temps, une stimulation électrique est établie au sein du réseau afin de visualiser les connectivités neuronales 3D. Enfin, dans une dernière démarche d'optimisation des électrodes MEA, nous avons nanostructuré les microélectrodes grâce à un dépôt électrochimique d'un polymère conducteur (PEDOT:PSS), et comparé la qualité du signal enregistré à celui d'une microélectrode non traitée.

Pour terminer, dans le **Chapitre 4**, des travaux ont été focalisés sur l'intégration du capteur pH au sein du micro-dispositif avec l'emploi d'un oxyde métallique : l'oxyde d'iridium (IrO_x). L'introduction du chapitre est consacrée à une étude bibliographique sur les oxydes métalliques et en particulier sur la variabilité des structures IrO_x formées selon leurs modes de fabrication. Puis, une étude des différents paramètres influençant les performances de stabilité de la couche d'IrO_x est présentée. Dans la littérature, il est montré que la stabilité de l'IrO_x peut être affecté par les paramètres suivants : (1) la méthode électrochimique de déposition, (2) l'utilisation d'une membrane protectrice protégeant la corrosion de l'oxyde et (3) l'épaisseur du film d'oxyde métallique déposé. Une fois les paramètres optimaux sélectionnés, l'IrO_x est intégré au sein d'une MEA commerciale pour laquelle des calibrations ont été réalisées.

Chapitre 1

Etat de l’art et positionnement de la thèse

1 CHAPITRE. 1 ETAT DE L'ART ET POSITIONNEMENT DE LA THESE

1.1 DU MODELE *IN VIVO* AU MODELE *IN VITRO*

La culture cellulaire traditionnelle, celle étudiée sur des boites de Pétri depuis le 19ième siècle a permis de comprendre le monde cellulaire, leurs divisions, leurs proliférations et leurs mutations. Elle a offert aux scientifiques des observations lisibles ainsi qu'une manipulation facile du milieu. Pourtant la culture traditionnelle appelée communément la « culture 2D » reste à ce jour très éloignée des conditions réelles d'un système cellulaire *in vivo*. Depuis des décennies, les cultures *in vitro* 2D sont limitées par des environnements planaires, physiologiquement aberrants. Mais depuis peu, les études s'en détachent au profit de constructions 3D plus proches de la réalité : les organoïdes. Ces représentations en culture *in vitro* d'organes maintenus en 3D ont des architectures et des fonctionnalités qui se rapprochent de celles des tissus dont elles dérivent. C'est à partir de 1952, que l'idée de développer des systèmes 3D a surgit, Moscona et al[1] deux chercheurs Américains connus pour leurs travaux embryologiques ont constaté après prélèvement de cellules rénales, que les cellules s'auto-organisent une nouvelle fois pour reformer le tissu de départ. En 1956, l'expérience d'Ehrmann et al[2] fût l'étape clé à l'initiation de la culture 3D. Ils ont démontré une viabilité cellulaire plus longue lorsque la cellule était immergée dans du collagène de souris plutôt que dans une boîte à Pétri. C'est ainsi que des recherches autour de ce gel se sont développées et qui est en fait un tissu présent chez les mammifères. En 1973, il a été établi que le gel contenait de la fibronectine[3], une protéine qui est la principale responsable à l'auto-organisation cellulaire. Bien plus tard, Timpl et al. [4] fait la découverte d'une autre molécule complémentaire au matrigel, la laminine, qui assure l'auto-organisation cellulaire et la différenciation cellulaire, qui sont deux étapes vitales pour la survie et la prolifération cellulaire (Figure I. 1).

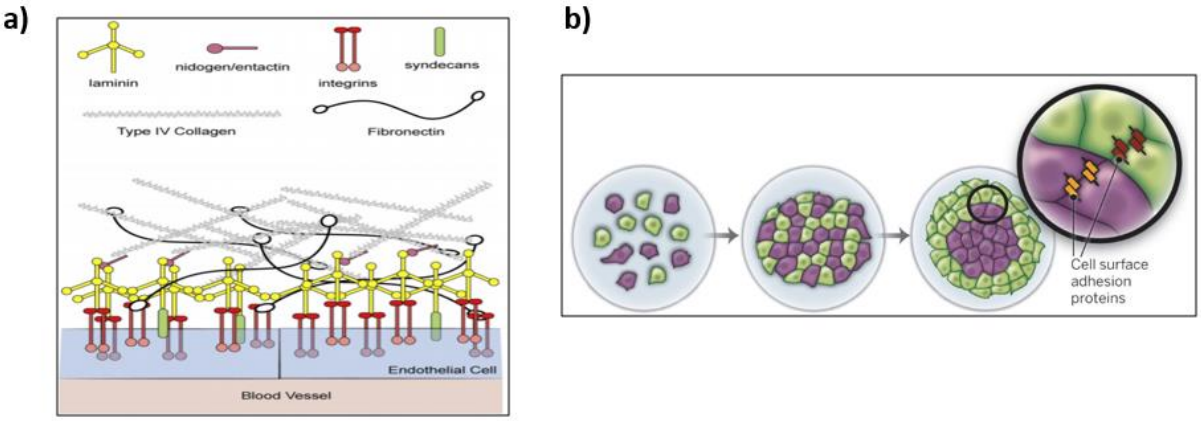


Figure I. 1:(a) Schéma explicatif du matrigel et des différentes interactions présentes entre les protéines : laminines, intégrines, fibronectines et le collagène (b) auto organisation cellulaire selon leurs affinités à travers un matrigel : agrégation ici de deux types cellulaires (violet) et (vert) puis auto organisation des cellules.

En résumé, le matrigel est un élément essentiel et nécessaire pour l'auto-organisation cellulaire et la formation d'un système cellulaire tridimensionnel. Les premières cultures 3D d'organoïdes ont été réalisées par Bissell et al[5], où une culture de cellules hépatiques est développée dans un matrigel tout en garantissant leurs fonctionnalités *in vitro*.

Aujourd'hui, le besoin de culture d'organes *in vitro* se fait ressentir, particulièrement pour la recherche de nouveaux médicaments qui s'avère souvent périlleuse. En effet, il est en fait difficile de prédire l'efficacité et la sécurité d'emploi du médicament chez l'homme à partir des modèles animaux (petits rongeurs, gros mammifères, primates, etc.). Actuellement, le taux d'échec en phase clinique de médicaments contre le cancer est proche de 90 %[6] et une étude Anglaise montre que les 10 % de médicaments ayant atteint le marché sont inefficaces[7] tant sur la survie des patients que sur leurs qualités de vie. Les modèles organes *in vitro* pourront à la fois bio-mimer les pathologies et garantir des traitements efficaces et personnalisés. Par ailleurs, l'utilisation des organes humains *in vitro* permet de se rapprocher des conditions physiologiques des organes humains *in vivo* contrairement au modèle animal, ce qui permet de modéliser fidèlement les signes cliniques associés à des maladies. Avec le développement des organes *in vitro*, cela pourrait devenir à terme un modèle alternatif à l'expérimentation animale.
Les organes *in vitro* se sont beaucoup développés depuis l'avènement des cellules souches en 2006, où il est dorénavant possible de modéliser des organes *in vitro* à partir de cellules souches issus de la reprogrammation de cellules humaines, qui auparavant étaient modélisées uniquement avec des cellules souches embryonnaires animales. Depuis, la culture 3D d'organes *in vitro* communément appelés les « organoïdes » s'est élargie. Beaucoup de modèles organoïdes ont émergé, comme Sato et al[8] a développé une culture d'organoïde d'intestin, Nakano et al[9] a reproduit une rétine ou encore très récemment Lancaster et al[10] a reproduit la totalité d'un cerveau humain *in vitro*.
À mi-chemin entre modèles *in vivo* et cultures de cellules *in vitro*, les organoïdes promettent donc de prendre une place cruciale dans la recherche de demain en tant que révolution technique mais également préclinique, voire clinique.

1.1.1 Définition d'un organoïde

L'organoïde est un organe mis en culture « *in vitro* » reproduisant la structure et les types cellulaires des organes *in vivo* qu'ils visent à mimer ainsi que certaines de leurs fonctions. Les avantages de la méthode sont nombreux : éviter l'expérimentation sur l'animal *in vivo*, cribler les médicaments actifs, en particuliers sur des copies de tissues dans leurs versions normales ou pathologiques, étudier les interactions cellulaires et les médiateurs paracrines qui les conditionnent, etc. Autrement dit c'est un moyen d'explorer les champs de *l'in vivo* tout en restant dans un environnement *in vitro*. Avec la culture d'une nouvelle variété de cellules communément appelées : cellules souches embryonnaires (ESC), cela va permettre de cultiver un organisme multicellulaire capable de s'auto organiser à travers un matrigel[11]. L'organoïde fabriqué grâce aux cellules ESC assurent alors les mêmes fonctionnalités que celui d'un organe *in vivo*.

Contrairement à la culture cellulaire 2D réalisée dans des boîtes à Pétri, les cellules souches n'arrivent pas à maturation parce qu'elles se développent sur une surface plane et rigide. La culture 3D propose quant à elle par l'utilisation d'un support en matrigel, une diversification cellulaire conduisant à la maturation et à la multi fonctionnalité cellulaire, soit un tissu similaire à celui d'un tissu « *in vivo* ». Au cours des dernières décennies, la technologie organoïde propose un modèle 3D innovant, de ce fait il s'est rapidement développé. Cette technologie peut employer une variété de cellules dans un système de culture 3D pour imiter les organes *in vivo*, comme des cellules souches embryonnaires (ESC)[1], des cellules souches pluripotentes induites (iPS)[12], des cellules souches adultes et même des cellules tumorales[13].

Cette technologie va rendre la connaissance du vivant plus fine où elle apportera de riches informations auprès de la communauté scientifique, notamment pour la modélisation et l'étude de développement des organes[10] et des maladies humaines, comme en témoignent des maladies génétiques[14], des maladies infectieuses[15] ou des tumeurs[16]. En même temps, les organoïdes peuvent être exploités comme une excellente plate-forme pour évaluer l'efficacité des médicaments[17] et de leurs toxicités[18]. Par ailleurs, cette technologie permettra de diminuer le nombre d'animaux utilisés. De même, la médecine de précision pourrait être une autre branche pivot de la technologie organoïde en prédisant avec précision les réponses aux médicaments[19] et en guidant pour élaborer des stratégies de traitement optimisées pour chaque patient. Enfin, les organoïdes peuvent servir d'approche alternative à la stratégie de remplacement tissulaire pour les organes malades ou non fonctionnels (Figure I. 2).

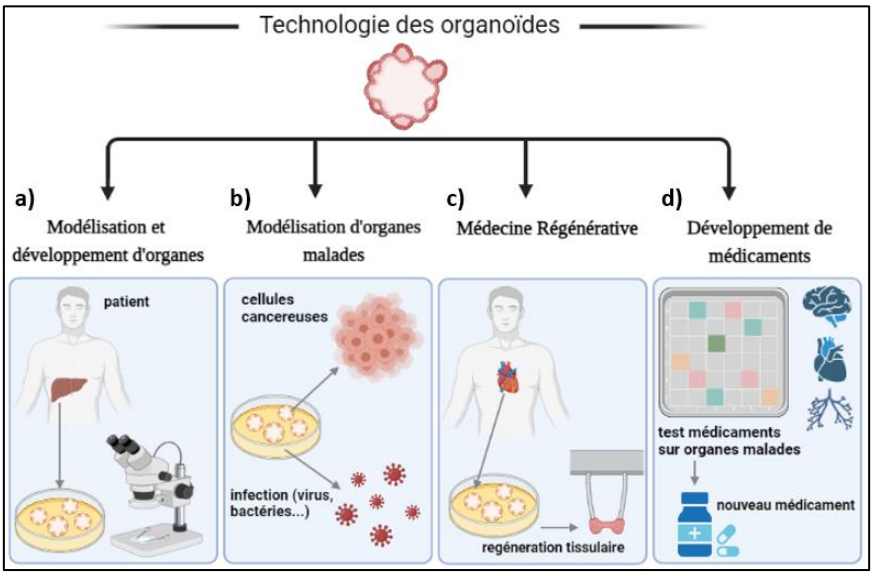


Figure I. 2: Les applications potentielles des organoïdes. (a) Modélisation et étude du développement des organes et (b) des organes malades de types : infectieuses, génétiques et cancéreuses. (c) Médecine de régénération remplaçant des organes non fonctionnels par des organoïdes sains ; (d) développement de médicaments testant leurs efficacités et toxicités sur les différents types d'organoïdes (cerveau, cœur, poumons, etc.).

1.1.1.1 Caractéristiques et fonctionnalités des organoïdes

Pour rappel, les cellules souches pluripotentes que l'on retrouve dans les ESC ont pour caractéristique d'être des cellules indifférenciées, c'est-à-dire non spécialisées. Elles sont capables de générer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et de développer l'organisme vivant (cellules, tissus, organes). Le développement des organoïdes est justement

basé sur la différenciation des ESC, ce qui pose des questions éthiques. C'est donc Yamanaka prix Nobel 2012 qui proposa une solution alternative permettant de s'exempter d'utiliser des cellules souches embryonnaires. Pour cela, il propose d'utiliser des cellules adultes constituants l'organisme et de les reprogrammer génétiquement afin de reproduire des cellules souches ayant les mêmes caractéristiques que les ESC [12] c'est-à-dire pluripotentes : capable de se multiplier à l'infini et de se différencier dans tous les types de cellules qui composent un organisme adulte (Figure I. 3). La reprogrammation génétique de cellules adultes consiste à les modifier génétiquement pour réactiver des gènes embryonnaires de dédifférenciation et de prolifération illimitée, caractéristiques d'une cellule souche pluripotente. Les étapes pour obtenir une lignée iPS est laborieuse puisque seulement 0,5 % à 1% des cellules traitées redeviennent pluripotentes après 6 mois de culture. Une fois testées, les lignées iPS sont utilisées dans des cultures *in vitro* pour se différencier en diverses types cellulaires : cellules cardiaques, cellules endothéliales, cellules immunitaires, cellules dendritiques, plaquettes, globules rouges, muscles, hépatocytes, cellules rétiniennes, neurones, cellules épithéliales, cellules pancréatiques[12].

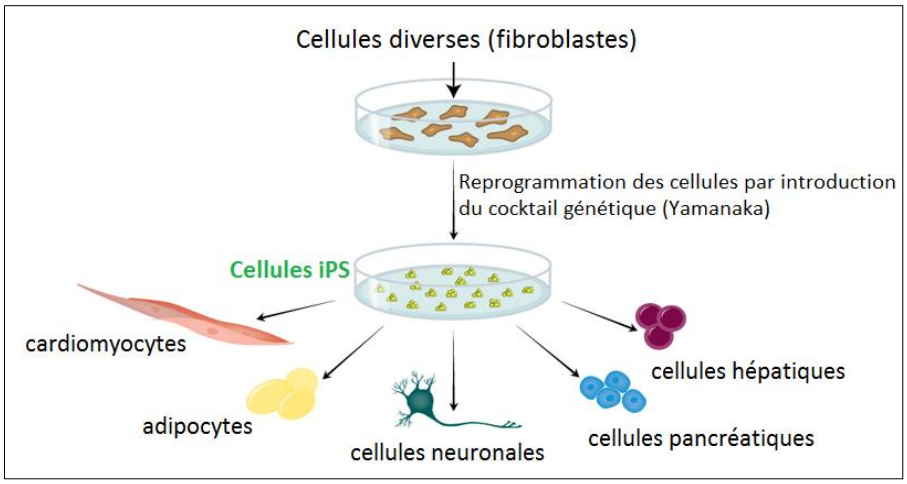


Figure I. 3: Culture de cellules « ordinaires » subissant une reprogrammation cellulaire. Celles-ci deviennent des cellules iPS capables de se différencier pour générer des cellules : cardiaques, adipeuses, neuronales, pancréatiques, hépatiques[20].

Les cellules iPS vont pouvoir se différencier grâce à un support en matrigel ou hydrogel qui favorisera l'auto-organisation et la prolifération cellulaire.

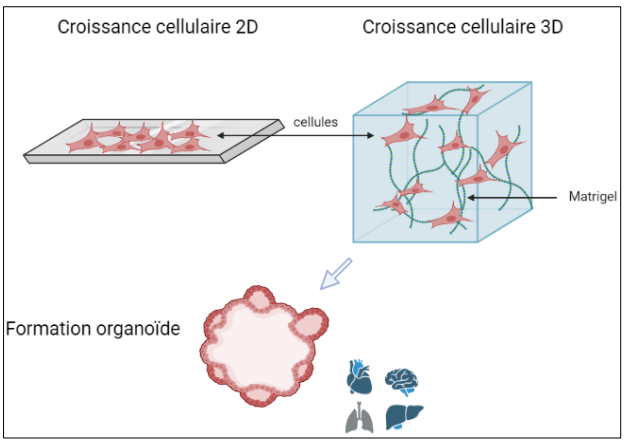


Figure I. 4: Formation d'un organoïde à partir d'une culture cellulaire de cellules souches embryonnaires (ESC) cultivées dans un support matrigel.

Le matrigel est une matrice extracellulaire (ECM) que l'on retrouve chez tous les êtres vivants et qui est principalement composée de protéines et de fibres engendrant un maillage, où les cellules peuvent adhérer et se développer dans une architecture défini[21,22]. On pourra ainsi définir l'architecture de l'organoïde suivant la structure et les propriétés chimiques du gel. Des hydrogels naturels comme l'alginate[23], la soie[24], le collagène[11] sont manipulés pour favoriser une croissance naturelle de l'organoïde mais aussi l'utilisation de polymères synthétiques biocompatibles[25] comme le poly(éthylène glycol) (PEG) ou le poly acide glycolique (PGA) [26] sont favorables à la croissance d'un tissu 3D grâce à leurs structures poreuses aux propriétés mécaniques intéressantes (Figure I. 4).

On pourra observer sur la Figure I. 5 que des neurones cultivés par culture 2D présentent une morphologie aplatie, alors que les neurones cultivés par culture 3D à l'aide d'un matrigel présentent une morphologie arrondie avec des interactions matricielles dans toutes les dimensions spatiales. D'où l'importance d'utiliser des matrigels pour l'initiation de cultures 3D aux architectures complexes[27].

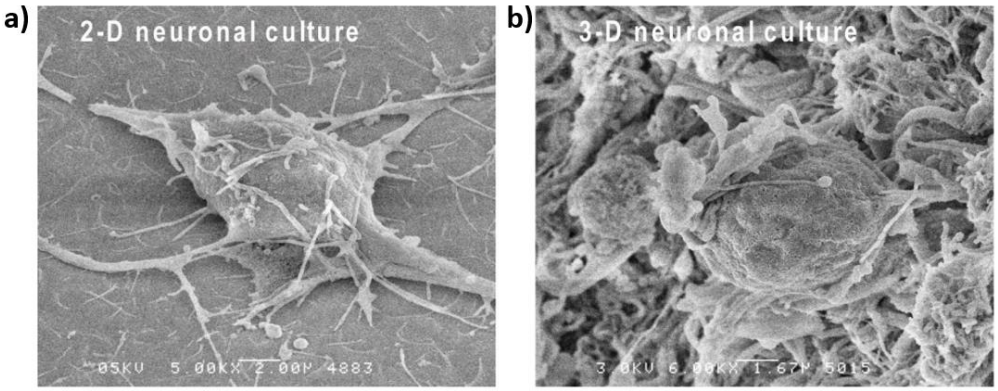


Figure I. 5: Images MEB de cultures neuronales (a) en 2D (b) et 3D (droite).

Il a été observé que la dimensionnalité de la construction d'un tissu nerveux influence sur son comportement sur l'activité nerveuse des neurones[28,29]. Une étude a montré que le réseau neuronal 3D différait de celui d'un réseau 2D parce que la culture 3D produisait une connectivité neuronale plus étendue et donc plus dynamique que la culture 2D. Les neurones sont sujets à propager des potentiels d'actions afin de garantir la transmission de l'information. Ces potentiels d'action (PA) sont de courte durée (1ms) et de forme et d'amplitude invariable. Il est possible d'enregistrer ces PA avec des microélectrodes comme celles qui figurent dans l'image ci-dessous (Figure I. 6.a et c). Nous observons sur la Figure I. 6.d des PA produits par la culture 3D et qui sont espacés par des périodes de dormances alors que la culture 2D (Figure I. 6.b) produit des PA de fréquences élevées. Selon Magill[30] et Bourke[31] la fréquence des PA avec des périodes de dormances en culture 3D semble se rapprocher du modèle *in vivo* d'un cerveau.

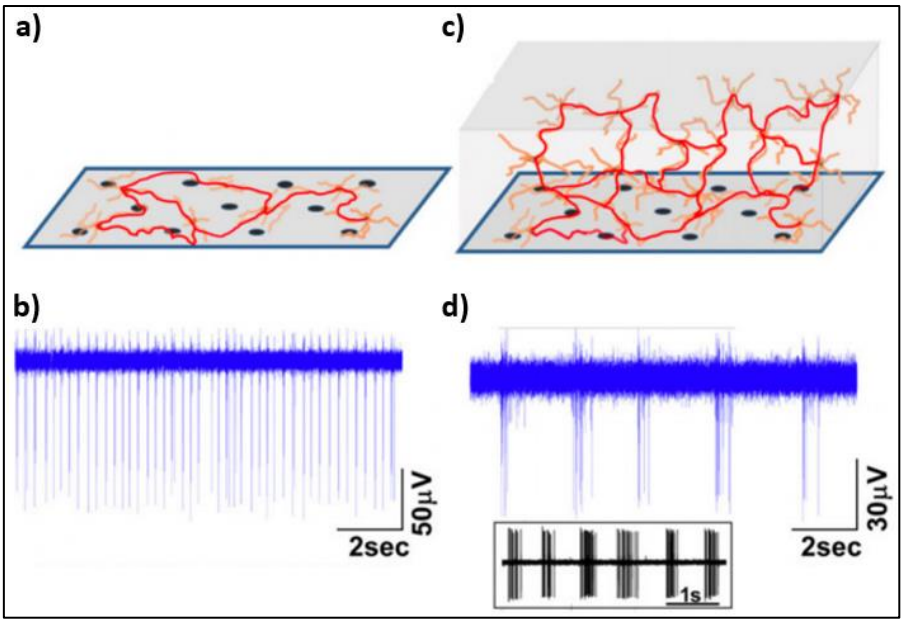


Figure I. 6: Formation de réseaux en 2D et 3D d'une culture corticale embryonnaire de rat (a) 2D et (c) 3D. Enregistrements des PA sur des microélectrodes planaires pour les cultures (b) 2D et (d) 3D.

La Figure I. 7, résume la progression des cultures d'organoïdes depuis plus de 50 ans. Depuis les premières cultures statiques 2D sur des boîtes à Pétri en 1900, avec la microscopie optique comme principal outil de caractérisation cellulaire. Bien plus tard, en 1950 les cultures 3D ont fait surfaces avec d'autres moyens de caractérisations comme des sondes optiques ou chimiques (oxygène, pH, etc.). Puis dans les années 2000, avec la progression de la micro-technologie, des cultures 3D dynamiques sont apparus. Cela a conduit au déploiement de micro-capteurs intégrés (pH, oxygène, glucose, etc.) et ce qui améliore la qualité du contrôle des cultures d'organoïdes sur le long terme. Grâce à ces progrès, il est aujourd'hui possible de se rapprocher des conditions réelles du modèle humain *in vivo*.

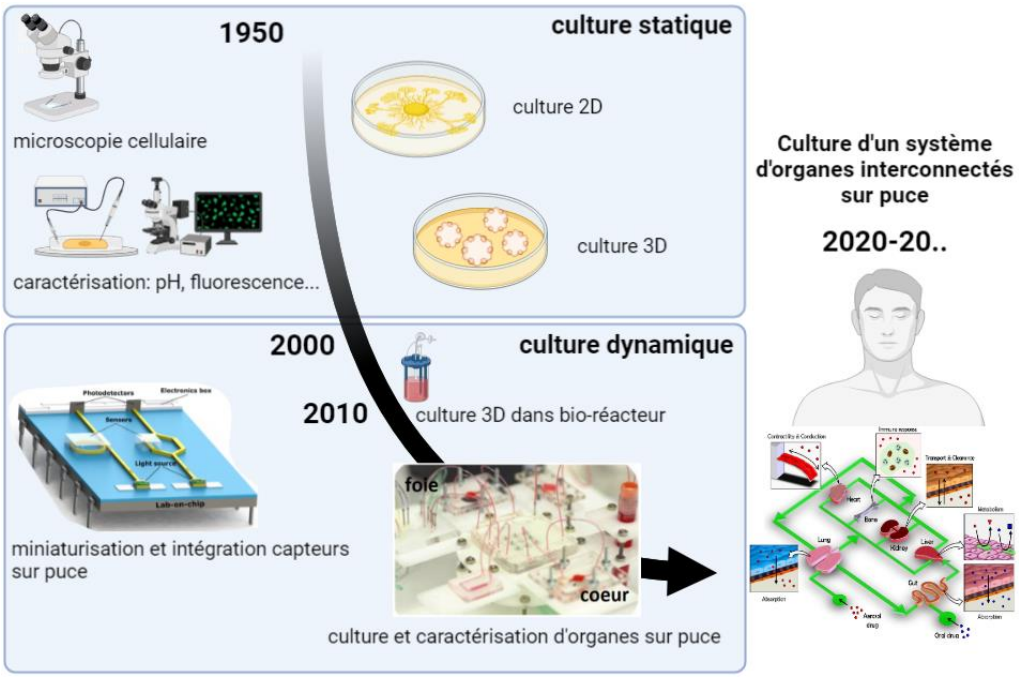


Figure I. 7: Progression des cultures d'organoïdes depuis plus de 50 ans.

1.1.1.2 Fonctionnalités des organoïdes

Comme discuté auparavant, il est possible avec l'utilisation de cellules iPS et d'un matrigel de mimer les fonctionnalités d'organes *in vivo* comme le cœur, le cerveau, le foie, etc. L'identification des organoïdes formés est établie grâce à l'identification des cellules fonctionnelles et marquées par fluorescence. Dans la Figure I. 8, on observe une grande variété d'organoïdes formés et caractérisés optiquement : poumons, foie, pancréas et la rétine.

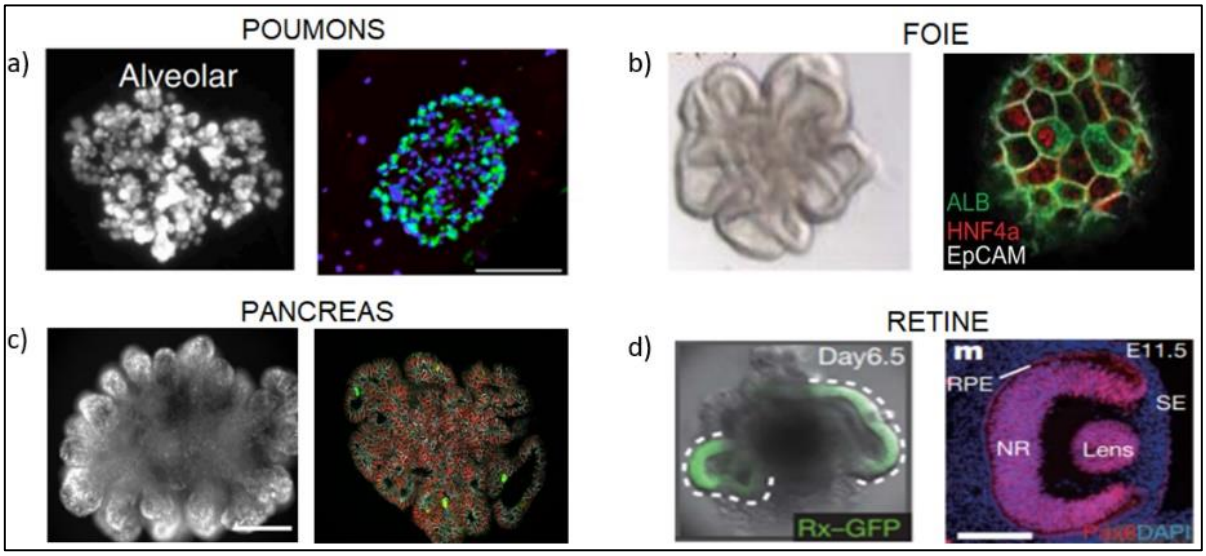


Figure I. 8: Formation d'organoïdes : a) Poumons32 : alvéole imagé par microscopie et avec des biomarqueurs (bleu et vert). b) Foie33 : observation de cellules hépatiques Hnf4-α en rouge et d'Albumine en vert. c) Pancréas34 : formation de cellules épithéliales en en rouge. d) Rétine[32] : formation du cristallin (Lens) et de la crête neurale (NR) représentatifs de la cornée.

Malgré les nombreuses prouesses que peuvent apporter la technologie des organoïdes, il reste encore des problèmes notamment celle de reproduire des organoïdes identiques parce que leurs organisations cellulaires restent encore spontanées. De plus, la création d'un organe entier par ingénierie tissulaire est limitée par la complexité de la vascularisation des tissus créés. La vascularisation permet en effet d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires aux cellules afin d'assurer une fonctionnalité physiologique à l'organe[33,34]. C'est pour cela que de nouvelles plateformes technologiques comme la micro impression ou la microfluidique ont vu le jour et dans lesquels des cellules peuvent être cultivées dans des chambres microscopiques. Leurs environnements sont ainsi contrôlés, leurs permettant d'imiter les fonctionnalités de cellules des modèles *in vivo*[35] (pancréatiques, neurones, cardiaques, etc.). Même s'ils sont encore des organes imparfaits puisqu'ils ont des capacités fonctionnelles réduites vu leurs petites tailles.

Comme sur le Tableau I. 1 ci-dessous, des micro puits en collagène ont été façonnés par micro impression afin de mimer des cryptes intestinales[36] *in vitro*. Il est également possible de mimer un système à plusieurs organes, *in vitro*. Tel représenté dans le tableau ci-dessous, l'équipe de Bishop et al[37] a réussi à reproduire dans trois chambres distinctes des organoïdes de poumons, foie et cœur reliés à travers des canaux microfluidiques. Les systèmes microfluidiques sont également très sollicités pour la vascularisation des organoïdes, c'est-à-dire faciliter le passage des nutriments ou d'oxygène à travers des canaux permettant le développement de l'organoïde dans des conditions optimales.

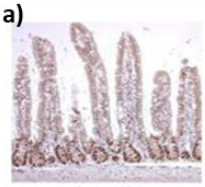
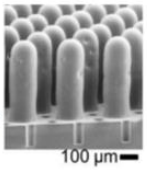
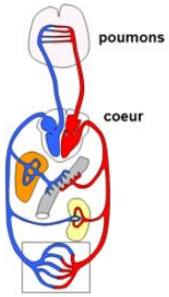
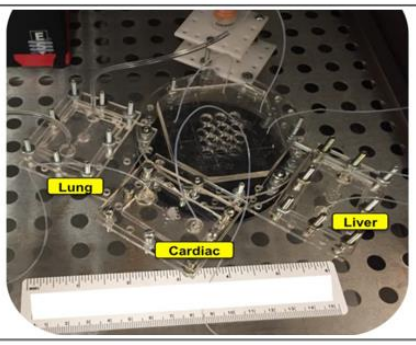
In Vivo	*In Vitro*	Fonctionnalité
a)  intestin	Microfabrication de micropuits sur support en collagène 	Cryptes intestinales
b) 		Canaux fluidiques reliant poumons, cœur et foie

Tableau I. 1: Nouvelles plateformes technologiques in vitro permettant d'imiter des organes in vivo.(a) Cryptes intestinales bio-mimés in vitro avec des micro puits fabriqués sur collagène[36], (b) système microfluidique reliant trois types d'organoïde : poumons, cœur et foie[37].

Depuis quarante ans, les avancées sur le développement des organoïdes n'a cessé de croitre. Il y a de plus en plus d'équipes qui utilisent les organoïdes comme moyen pour tester des médicaments pour contrer des cellules cancéreuses. Comme par exemple l'équipe de Drost[38] à l'institut d'oncologie aux Pays Bas qui délivrent des médicaments ciblés aux tumeurs de reins, où l'organoïde est ciblé par différents principes actifs permettant la destruction des cellules malades. En raison du développement des organoïdes, la médecine devient de plus en plus personnalisée.

Nous avons vu que de nombreux modèles d'organoïdes peuvent répliquer les fonctionnalités et les caractéristiques des organes *in vivo* humains grâce au développement de la biologie cellulaire et aux outils technologiques. Nous allons, dans le paragraphe suivant nous concentrer sur les modèles d'organoïdes cérébraux qui nous intéresseront dans le cadre du projet de thèse.

1.2 LES ORGANOÏDES CEREBRAUX

1.2.1 Introduction

Le cerveau contient près de 100 milliards de neurones[39] qui communiquent entre eux au sein d'un réseau interconnecté et chacune des communications génèrent des fonctions cérébrales comme : la motricité, la sensorialité, le langage, la créativité, la mémoire, les émotions ou encore les prises de décision. Les circuits neuronaux sont un réseau dynamique mais intrinsèquement complexe, ils renferment encore une grande incompréhension au sujet du dysfonctionnement des circuits liés aux maladies du cerveau comme l'autisme, l'Alzheimer et autres maladies neurodégénératives. Chaque neurone est constitué d'un corps cellulaire, de prolongements appelés dendrites et axones (Figure I.9). Ces derniers émettent des connexions

avec d'autres neurones par l'intermédiaire de synapses. Les connexions se créent à travers des flux d'impulsions électriques, appelés potentiels d'action (PA). Les PA permettent de transmettre une information d'un neurone à un autre. La propagation du PA se fait le long des synapses et provoque l'ouverture de vésicules contenant des neurotransmetteurs. Les neurotransmetteurs sont ensuite diffusés pour agir sur des récepteurs localisés sur la membrane postsynaptique. Le neurone postsynaptique reçoit le signal chimique et le convertit en signal électrique (Figure I. 9).

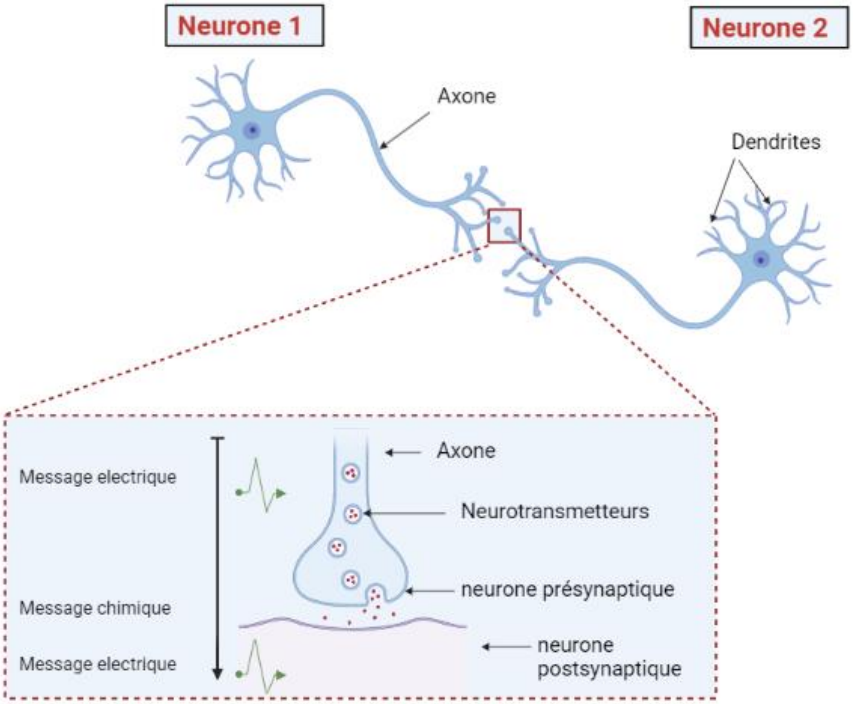


Figure I. 9: Schéma explicatif du principe de propagation du potentiel d'action à travers deux neurones.

1.2.1.1 Le potentiel d'action

1.2.1.1.1 Propriétés physiologiques du neurone

L'activité électrique des cellules est responsable d'une grande partie du comportement complexe des organismes. Le cerveau et la moelle épinière sont au centre d'une grande partie de cette activité, où des neurones transportent l'activité électrique à travers un vaste réseau. Les neurones sont composés d'une membrane renfermant de nombreuses protéines, récepteurs, canaux ioniques et pompes qui sont responsables du contrôle de la concentration de divers ions par rapport au milieu extracellulaire. Les canaux ioniques situés sur la membrane permettent le passage de différentes espèces ioniques (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-) entre les environnements intracellulaire et extracellulaire (Figure I. 10). En effet c'est la membrane cellulaire qui sépare les deux environnements : intracellulaire et extracellulaire. La naissance d'un PA résulte d'une distribution inégale des ions de part et d'autre de la membrane. Les potentiels d'action permettent de transmettre une information d'un neurone à un autre.

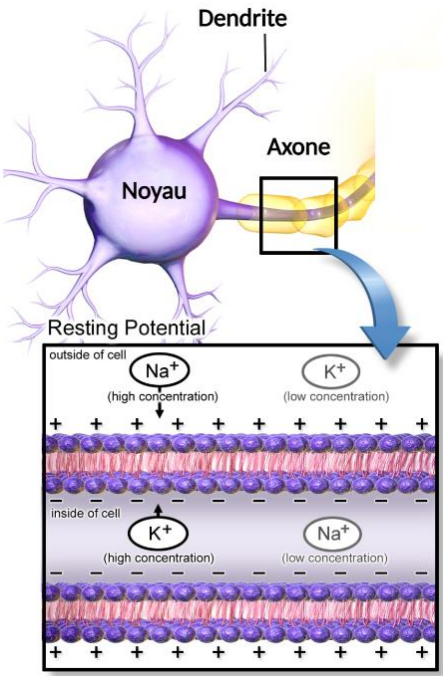


Figure I. 10: Répartition ionique de part et d'autre de la membrane plasmique de l'axone.

Le PA dépend donc de l'ouverture et de la fermeture des canaux ioniques à un endroit donné du neurone. Un stimulus est à l'origine du déclenchement du PA, il peut être mécanique, thermique, physicochimique ou électrique. Pour être efficace, c'est-à-dire capable de déclencher un PA, il faut que le stimulus soit capable d'amener le potentiel de membrane au-dessus d'un seuil qui se situe à – 55mV. Le PA nerveux est très bref, il ne dure que de 1 à 2 ms. Pendant le déroulement d'un PA, on peut distinguer quatre phases, de dépolarisation, de repolarisation, d'hyperpolarisation et de retour au potentiel initial, au cours desquelles les canaux ioniques sont ouverts ou fermés (Figure I. 11).

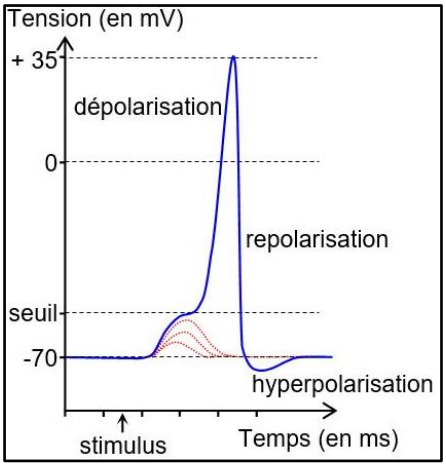


Figure I. 11: Potentiel d'action.

Au vu de la densité des neurones, il existe des milliers de trains de potentiels d'action qui sont émis constamment par les différents neurones. Il est possible d'étudier ces flux électriques par électrophysiologie et de coder l'information neuronale émanant de plusieurs zones du cerveau[40,41] (Figure I. 12).

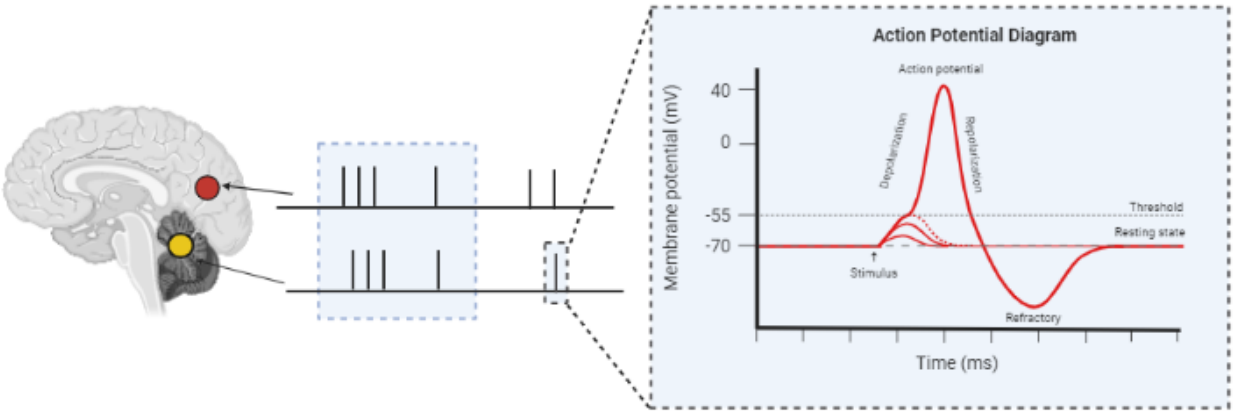


Figure I. 12: Synchronicité du signal : trains de potentiels exprimés dans deux zones cérébrales distinctes.

1.2.1.1.2 La propagation du potentiel d'action

La propagation du PA dépend de la dépolarisation de proche en proche de la membrane entraînant ainsi le déplacement spatial du PA le long des synapses du neurone. Elle provoque alors l'ouverture des vésicules synaptiques qui contiennent des neurotransmetteurs. Les neurotransmetteurs sont ensuite diffusés pour agir sur des récepteurs localisés sur la membrane postsynaptique. Le neurone postsynaptique reçoit le signal chimique et le convertit en signal électrique. L'arborisation synaptique d'un neurone lui permet de recevoir entre 1000 et 10 000 signaux électriques. Dans la Figure I. 13, est illustré la propagation du PA grâce à la libération de glutamate comme neurotransmetteur[42]. Le glutamate est diffusé le long de la fente synaptique, une partie du glutamate est fixée sur la membrane postsynaptique, ce qui crée un nouveau PA. Tandis qu'une autre partie du glutamate qui ne s'est pas fixé sur les récepteurs, est recyclée vers sa synapse d'origine.

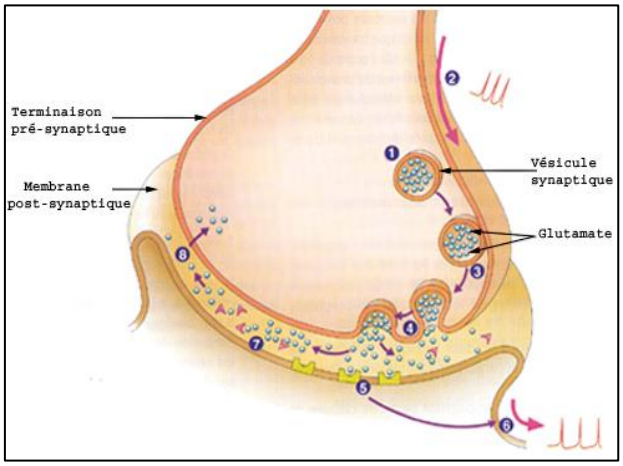


Figure I. 13: La transmission synaptique : (1) Stockage du glutamate dans des vésicules synaptiques; (2) Propagation du PA vers la terminaison présynaptique; (3) Fusion des vésicules avec la membrane présynaptique; (4) Libération du glutamate dans la fente synaptique; (5) Fixation du glutamate sur les récepteurs de la membrane postsynaptique; (6) Conversion du signal chimique en signal électrique et propagation du PA; (7) Inactivation du glutamate par des enzymes; (8) Recapture du glutamate.

On ne compte pas moins d'une centaine de neurotransmetteurs qui sont synthétisés par des enzymes du corps cellulaire du neurone. Leurs présences sont fondamentales pour garantir le bon fonctionnement corporel chez les vertébrés, puisque les neurotransmetteurs contrôlent les

émotions, la cognition et les mouvements. Parmi les plus connus et les plus étudiés on citera : la Dopamine, l'Endorphine, le GABA, le Glutamate et la Sérotonine[43]. Ils jouent le rôle d'excitateur ou d'inhibiteur, c'est-à-dire qu'ils favorisent ou empêche la génération d'un PA. Certains de ces neurotransmetteurs sont associés à des maladies psychologiques ou physiques, comme la dopamine qui est moins synthétisée et provoquerait des tremblements caractéristiques de la maladie de Parkinson[44].

1.2.2 Les modèles d'organoïdes cérébraux

Les connaissances actuelles sur le cerveau humain sont principalement basées sur des cerveaux de cadavres, principalement en raison de problèmes éthiques. Par conséquent, les animaux principalement les rongeurs ont traditionnellement été utilisés comme organismes modèles pour la recherche en neurosciences et pour la recherche sur les maladies neurologiques. Cependant, la structure et le développement du cerveau varient considérablement entre les rongeurs et les humains. Par exemple, la maladie d'Alzheimer est une forme de maladie neurodégénérative très difficile à tester sur les rongeurs car elle touche plus particulièrement les Hommes. Cette maladie caractérisée par la détérioration lente et irréversible de groupes particuliers de cellules nerveuses et leurs morts sont la principale cause de démence dans notre société. Il existe encore aujourd'hui beaucoup de médicaments qui n'arrivent pas sur le marché car la phase clinique présente des échecs élevés, comme pour la maladie d'Alzheimer où 99.6% des médicaments développés[45] n'ont pas abouti.

Alternativement, les scientifiques comptent sur des cultures neuronales humaines *in vitro*, basées sur une culture 3D et qui permet de correspondre sur la nature des connexions synaptique. Grâce au développement des cellules souches iPS et de la bio-ingénierie cellulaire, il est possible de recréer l'architecture du tissu cérébral humain *in vitro*, de bio-mimer les maladies neurodégénératives et de développer de nouvelles stratégies de de criblage.

C'est en 2014 que Lancaster et al[46] ont introduit pour la première fois le concept d'organoïdes du cerveau humain, servant à fournir un nouvel outil pour étudier les mécanismes des maladies neurologiques[47,48]. Il y a eu une augmentation exponentielle de l'utilisation de cette technologie, en particulier comme outil de modélisation *in vitro* des maladies[10,49–51] et pour tester de nouvelles approches thérapeutiques[52,53]. Comme la collaboration entre l'Université de Yale, l'institut du Cerveau-CNRS, l'INSERM et l'Hôpital Pitié-Salpêtrière qui ont démontré avec l'utilisation d'un modèle « mini-cerveau » *in vitro* et infecté au virus SARS-CoV-2 que le virus pénétrait à travers les neurones et qu'il était bien responsable des maux de tête, de la perte d'odorat, des pertes de conscience ou encore des AVC, comme observé chez les patients malades de la Covid-19 [54]. L'équipe de Lancaster[10] a identifié plusieurs régions du cerveau par marquage optique comme : le cerveau antérieur lié à la mémoire et à la logique ; le cortex antérieur responsable de l'empathie, l'émotion et de la prise de décision ; le cortex préfrontal responsable des émotions et humeurs ; l'hippocampe responsable de la mémoire et du repère géospatial (Figure I. 14). En somme, l'équipe de Lancaster a démontré par la reconnaissance de ces différentes régions cérébrales dans l'organoïde que ce système était auto-organisé, et ce qui a amené de nombreux scientifiques à s'interroger sur sa complexité architecturale.

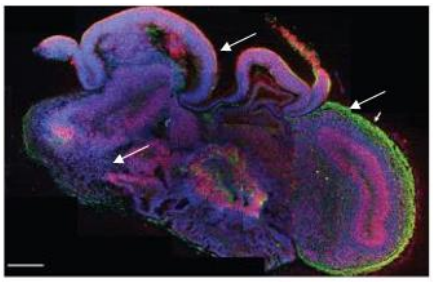


Figure I. 14: Section d'un organoïde cérébral représentant plusieurs régions du cerveau : cerveau antérieur, le cortex antérieur, le cortex préfrontal, l'hippocampe et le plexus choroïde.

Dans la littérature on retrouvera la méthode de culture de sphéroïdes qui contrairement aux organoïdes ne peut former qu'une seule région du tissu cérébral[55]. Les sphéroïdes sont des cultures 3D où des agrégats cellulaires se développent en suspension sans la présence d'un matrigel et forment par conséquent une architecture moins complexe que l'organoïde. Il existe par ailleurs des plateformes pour favoriser la croissance de certaines cellules neuronales et inhiber d'autres pour créer une zone spécifique du cerveau (Figure I. 15). Ces plateformes de type microfluidique ou billes servent de guide à la croissance 3D du tissu.

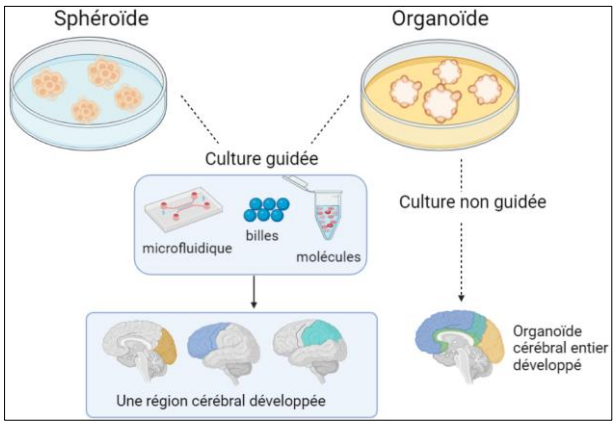


Figure I. *15*: Culture 3D de « mini cerveaux » : avec sphéroïdes et organoïde. Création de régions spécifiques du cerveau grâce à la culture guidée de sphéroïde et d'organoïde (gauche). Création d'un « mini cerveaux » entier avec une culture non guidée d'organoïde (droite).

1.2.3 Echafaudage des organoïdes cérébraux

Il existe parmi les cultures d'organoïdes des stratégies permettant d'orienter la morphogénèse du cerveau et d'obtenir une ou plusieurs régions cérébrales. Cette architecture peut être contrôlée de multiples façons, soit à l'aide de plateformes comme des systèmes micro-fluidiques[56,57] et des micro billes[58], ou soit par l'ajout de molécules[59,60].

Avec l'utilisation d'échafaudages, les organoïdes fourniront des interactions complexes : cellule-cellule et cellule-environnement et cela permettra d'imiter au mieux la structure et les mécanismes du cerveau *in vivo*[25]. On retrouvera alors plusieurs types de matériaux assurant une architecture 3D aux cellules neuronales et facilement modelables, comme les métaux, les verres, les polymères et les céramiques[61]. Les polymères sont les matériaux les plus couramment employés en raison de leurs architectures, propriétés mécaniques, biocompatibilités et biodégradabilités[25]. De plus, ils peuvent posséder une architecture poreuse

où l'inter-connectivité des pores sont liées, développant ainsi un échafaudage. Par l'utilisation d'échafaudages très poreux, les cellules auront une bonne adhésion entre elles et permettront les échanges d'oxygène, de nutriments et de métabolites[62], tout en assurant une meilleure maturation de l'organisation fonctionnelle de l'organoïde. D'autres technologies existent aujourd'hui pour innerver le cerveau et améliorer la longévité du tissu nerveux. Li et al[63] ont employé un substrat en PDMS poreux pour une meilleure ramification des neurones en 3D ainsi qu'une meilleure viabilité des neurones (Figure I. 16.1). D'autres équipes se sont intéressées aux propriétés mécaniques du substrat afin de guider la croissance des axones pour apporter des paramètres physiologiques semblables au cerveau *in vivo*[64], comme Kim et al[64] qui ont modifié les propriétés anisotropiques du collagène pour favoriser les connexions neuronales dans un sens plutôt que dans un autre (Figure I. 16.2). Également une autre équipe, celle de Pautot et al (Synaxys)[58] ont utilisé un guidage des axones par l'utilisation de billes de verre fonctionnalisées comme support de la culture neuronale (Figure I. 16.3). Celle-ci sera détaillée dans le chapitre 3 puisqu'il s'agit du protocole de culture que nous avons utilisé pour la croissance de l'organoïde cérébral.

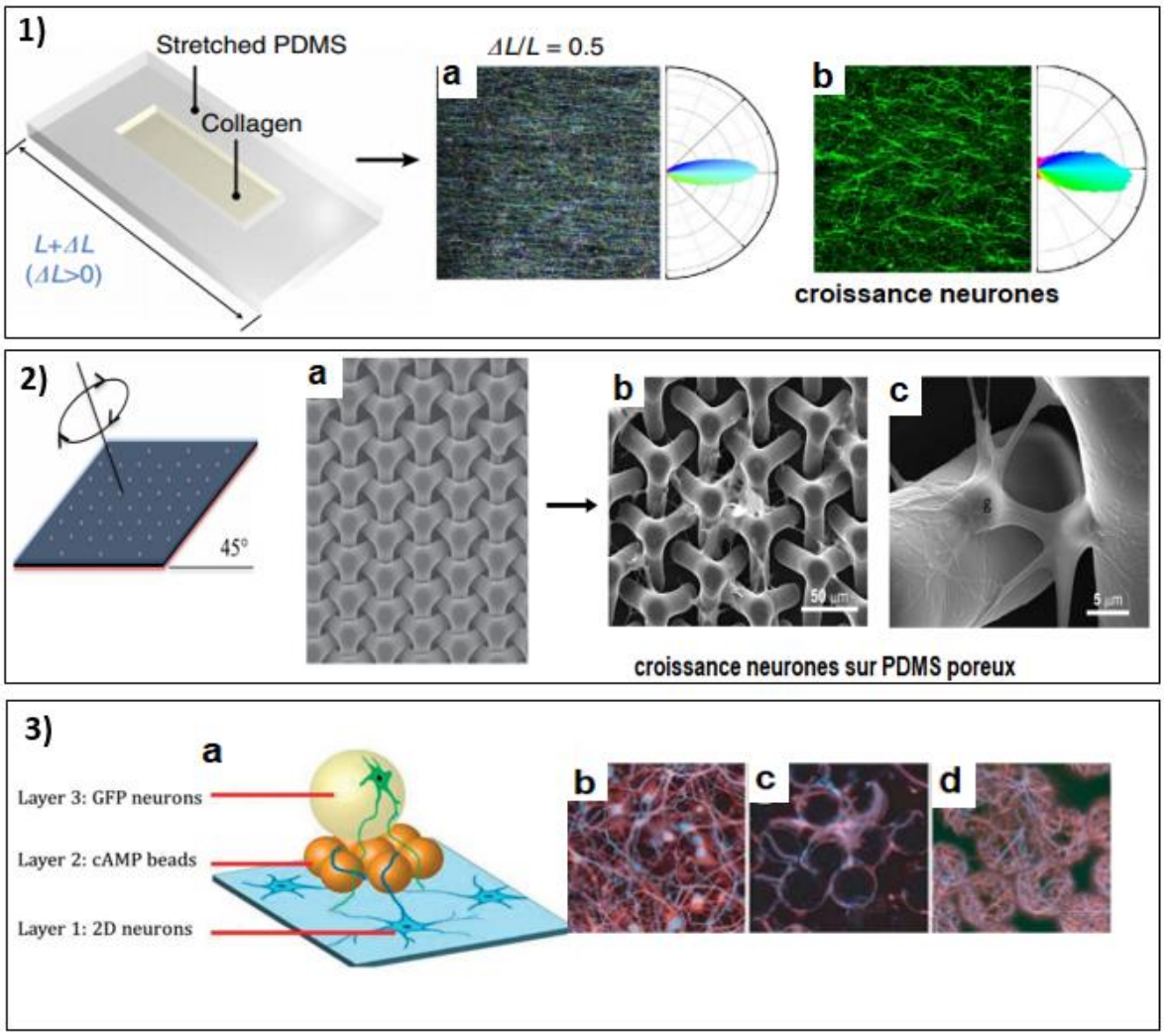


Figure I. 16: Croissance du tissu neuronal et guidé via des supports (1.a) l'orientation anisotropique du collagène (2.a) un PDMS poreux et (3.a) des billes de silicium fonctionnalisé. (1.b) croissance neurone orienté horizontalement (vert) ; (2.b-c) croissance des neurones à travers les pores du PDMS ; (3.b-d) croissance guidée des neurones sur billes (rouge et bleu).

Enfin, d'autres approches comme les systèmes microfluidiques éléments support à la culture permettent de mieux imiter l'innervation physiologique, d'améliorer la diffusion de nutriments ou d'oxygène[65,66] et de limiter la mort prématurée des cellules neuronales[67]. Récemment, des bioréacteurs à filage multi-puits miniaturisés (Figure I. 17.a) ont été conçus sur mesure pour réduire le coût de maintenance des cultures d'organoïdes et pour ajuster mécaniquement le microenvironnement optimal pour la formation d'un organoïde cérébral spécifique. Sur la Figure I. 17.a, la partie antérieure du cerveau a été développée dans chacun des micro-puits[68]. Une autre équipe s'est quant à elle intéressée au transport de l'oxygène et des nutriments jusqu'au tissu cérébral avec l'utilisation de canaux fluidiques[66] (Figure I. 17.b), ils ont observé une baisse de la mortalité cellulaire et une meilleure activité des cellules. Ces dispositifs favorisent le bio mimétisme du cerveau *in vitro*[57,69,70].

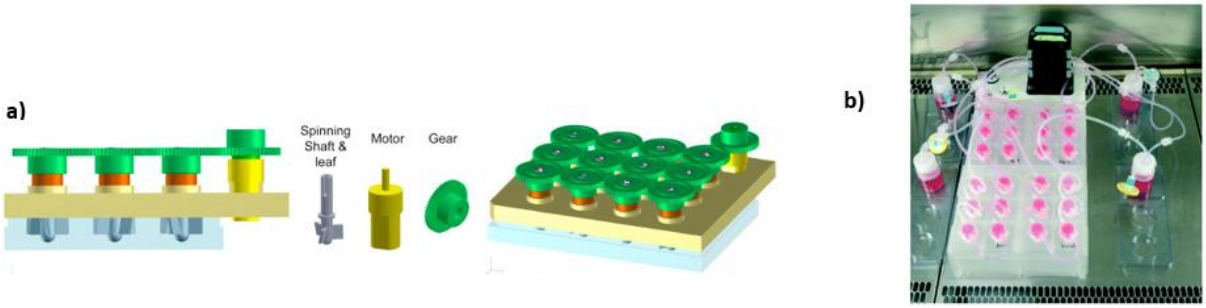


Figure I. 17: (a) Modèle à filage multi-puits miniaturisés qui contrôle mécaniquement l'environnement de l'organoïde pour former la partie antérieur du cerveau[68]. (b) Système microfluidique où 24 chambres contiennent chacune un organoïde cérébral et connectés à une pompe péristaltique qui permet le renouvellement des éléments nutritifs[66].

1.2.4 Reproductibilité des organoïdes cérébraux

Du fait de la complexité architecturale des organoïdes cérébraux, il réside des problèmes tel que leurs reproductibilités. Dans la littérature il existe plusieurs façons de les produire, cependant les structures formées sont variables d'une équipe à une autre, ce sont des systèmes très hétérogènes qui ne permettent pas des études comparatives et donc approfondies. C'est pourquoi l'équipe de Lancaster[10] a réussi à établir un protocole spécifique pour le développement du premier organoïde cérébral entier *in vitro*. Ce protocole a été amélioré par l'équipe de Quadrato [71] pour faciliter la maturation des synapses.

Le protocole consiste à former un tissu tridimensionnel, similaire à un embryon par l'utilisation de 2500 cellules iPS. Après neuf jours de culture, les corps embryoïdes formés se différencient pour produire des cellules souches neurales ou cellules du neuroectoderme (astrocytes, neurones). Pour maintenir un développement 3D et une croissance tissulaire complexe, les cellules souches neurales sont introduites dans des gouttelettes de Matrigel. Le système Matrigel/cellules est ensuite transféré dans un bioréacteur rotatif pour quelques jours afin d'améliorer l'absorption des nutriments dans le système. Cette méthode a conduit au développement rapide de tissus cérébraux désignés comme organoïdes cérébraux, ils ne nécessitent que de 20 à 30 jours avant que les premières régions cérébrales ne se forment (Figure I. 18). Par ailleurs la durée de vie de ces organoïdes peut être allongée sur plusieurs mois[72] voire

plusieurs années[46], ce qui peut renseigner sur les conditions de maturations des cellules neuronales lorsqu'elles sont affectées par des troubles neurologiques.

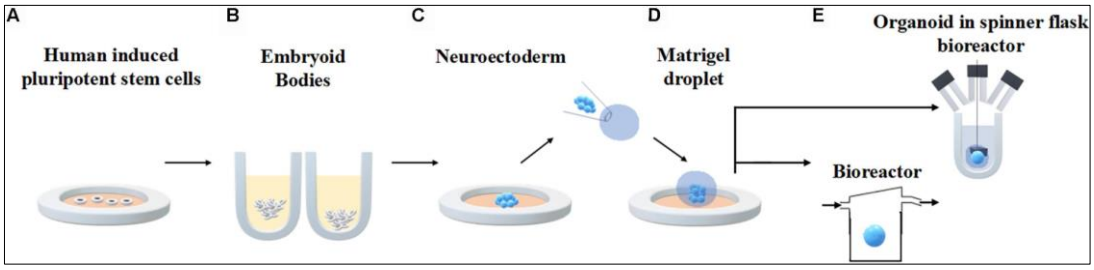


Figure I. 18: Protocole de préparation d'un organoïde cérébral humain. (A) Cellules souches humaines sont déployées sur des plaques (B) après 9 jours de cultures, formation d'un corps d'embryoïdes. (C) Etape de différenciation, où les cellules astrocytes, neurones sont générées. (D) Incorporation des cellules différenciées dans des gouttelettes de Matrigel et (E) transfert dans un bioréacteur[10] pour l'absorption des nutriments.

Bien que l'organoïde formé puisse mimer l'organe cérébral, son organisation structurelle 3D, sa petite taille (quelques millimètres), sa forme et ses connexions neuronales complexifient l'étude de son développement. C'est pourquoi on retrouve un grand nombre d'instruments de pointe permettant de faciliter l'analyse des caractéristiques des organoïdes cérébraux.

1.2.5 Application des organoïdes cérébraux

Les organoïdes cérébraux sont aujourd'hui de nouveaux modèles modélisant des troubles cérébraux neurologiques, comme le virus Zika transmis du moustique à l'Homme peut engendrer des complications de nature neurologique chez l'Homme. Avec l'aide des modèles organoïdes cérébraux, cela a démontré que le virus était la cause de la mort cellulaire des neurones et de la réduction de la taille de l'organoïde[68,73].

D'autres encore, comme les troubles causant la maladie de schizophrénie ont été étudiés par l'équipe de Fei[74]. Ils en ont déduit avec l'utilisation d'un organoïde cérébral humain sous sa forme pathologique, que ces troubles pourraient provenir de l'interaction de deux protéines DISC1 et Ndel1. Ils ont montré qu'il était possible d'interrompre cette liaison, ce qui permettrait de mieux comprendre les mécanismes liés à ce trouble psychiatrique complexe.

L'ensemble des causes liées au trouble du spectre de l'autisme (TSA) est une autre maladie étudiée avec des modèles organoïdes et qui permet notamment de comprendre son neuro développement. Il a été admis que l'autisme serait dû à un déséquilibre des proportions de neurones excitateurs et de neurones inhibiteurs causé par la dysfonctionnalité du neurotransmetteur GABA[75].

Ces différents modèles ainsi décrits fournissent un aperçu des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de certaines maladies.

Il reste cependant des progrès à faire sur la méthode de culture des organoïdes cérébraux pour imiter des maladies neurodégénératives comme Alzheimer ou Parkinson, car ces maladies apparaissent tardivement alors que les organoïdes développés sont uniquement étudiés au stade embryonnaire[76].

1.2.6 Moyens de caractérisations des cultures organoïdes cérébraux *in vitro*

Caractériser l'organisation structurelle 3D des cellules et les connexions neuronales au sein des organoïdes sont importants pour établir des similitudes avec le cerveau humain. À cet égard, des outils facilitant l'analyse structurale et fonctionnelle ont été mis à disposition pour cartographier au mieux l'organisation neuronal globale au sein des organoïdes. La taille des organoïdes est souvent très petite, comme par exemple le cortex développé *in vitro* faisant une taille moyenne de 4 mm de diamètre alors que le cortex humain mesure en moyenne 15 cm de diamètre[68,77], où par ailleurs se développe de nombreux troubles neurologiques[78]. Il est donc essentiel de développer des outils adaptés à l'échelle des organoïdes pouvant identifier son architecture complexe et ses fonctionnalités, ce qui permettra d'identifier et de cibler de futurs traitements thérapeutiques.

Dans les paragraphes suivants nous citerons l'ensemble des moyens déployés pour caractériser l'organisation cellulaire des organoïdes qui sont notamment optiques. Puis nous aborderons les outils électrophysiologiques qui identifient les fonctionnalités neuronales des organoïdes.

1.2.6.1 Caractérisations structurelles

1.2.6.1.1 L'immunohistochimie

La microscopie cellulaire inventée au 17ième siècle par le scientifique Van Leeuwenhoek a changé considérablement la vision des biologistes. Le progrès optique a été considérable tout le long du 19ième siècle, particulièrement avec la découverte du photon en 1924 par Planck et Einstein qui amena la naissance de la microscopie par fluorescence. Cette méthode a permis à de nombreux scientifiques d'imager le milieu biologique en présence de molécules fluorescentes. L'immunohistochimie (IHC)[13,46] est un outil déroulant ce procédé pour visualiser des cellules neuronales de la culture 3D cérébrale. Cette technique consiste à quantifier les liaisons protéines-anticorps à l'aide de marqueurs fluorophores. Autrement dit, ces fluorophores permettent de marquer des anticorps qui se fixeront par la suite sur des protéines situées au sein de cellules neuronales. En effet, l'IHC permet d'accéder à une résolution spatiale très élevée jusqu'à quelques dixièmes de micromètres qui permet d'observer les différents constituants d'un échantillon avec un excellent contraste et une grande sensibilité (Figure I.19). Il est possible d'observer en parallèle plusieurs marqueurs en utilisant des fluorophores de différentes couleurs et qui apporteront des informations sur la localisation de différentes régions cérébrales. Par cette méthode Lancaster et al[10] ont utilisé une panoplie de marqueurs biologiques comme le DAPI (violet), l'Hoechst (bleu), SOX2, EMX1, AUTS2, NRP2 (rouge) ou TUJ1 (vert) (Figure I. 20). Ils ont permis d'identifier les régions du cerveau : l'hippocampe, le cortex préfrontal et le cortex dorsal.

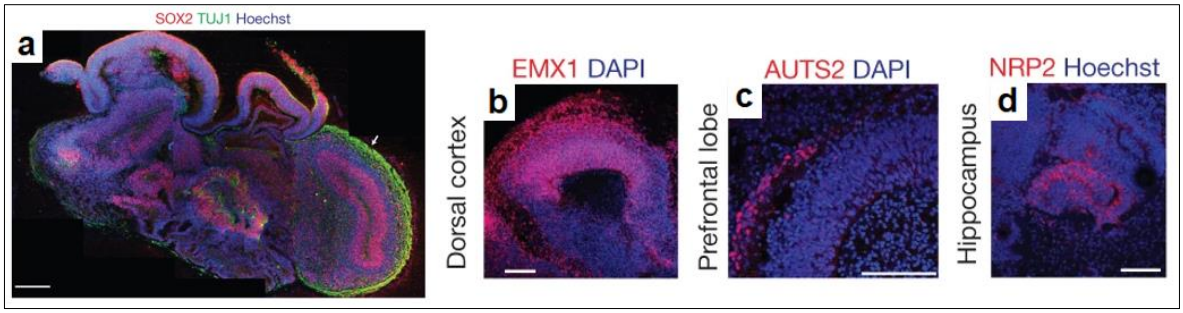


Figure I. 19: Images microscopiques de (a) l'architecture du mini cerveau avec la présence de cellules souches (protéines SOX2 marquées en rouge) et de cellules neuronales (protéines TUJ1 marquées en vert) ; (b) région cortex dorsal (protéines EMX1 (rouge) et DAPI (violet)) ; (c) région préfrontal (protéines AUTS2 (rouge) et DAPI (violet)) ; (d) région hippocampe (protéines NRP2 (rouge) et Hoechst (bleu)).

Il s'avère que l'IHC peut révéler des artefacts de mesures lorsqu'il s'agit de quantifier les anticorps à travers plusieurs couches cellulaires structuré en 3D. En résumé l'imagerie des organoïdes demeurent fastidieuses du fait qu'ils comportent plusieurs couches cellulaires[79]. Sur ce problème, la technologie des microscopes optiques s'est intensifiée et a offert une résolution de l'image 3D des tissus cellulaires, une acquisition rapide des images, une diminution de photoblanchiment et donc d'une meilleure observation du développement des organoïdes à long terme. A savoir que le photoblanchiment est l'une des principales limites au système de la microscopie à fluorescence car le rendement de la fluorescence et de sa durée de vie sont diminuées. C'est le cas de la microscopie confocale qui permet d'imager en profondeur des tissus nerveux en apportant une dimension 3D à l'image[80]. Comme il est montré sur la Figure I. 20, il est possible d'apercevoir la gaine de myéline (vert) entourant l'axone (rouge) sur un ensemble de neurones. En effet l'imagerie confocale à champ profond est une puissante technologie permettant de reconstruire la morphologie 3D du tissu nerveux[81].

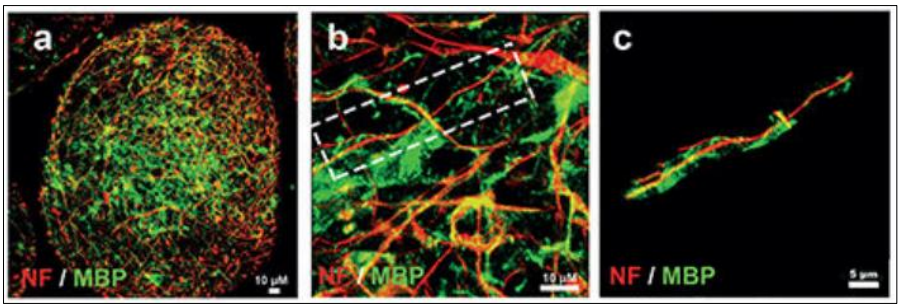


Figure I. 20: (a) Reconstruction 3D d'un tissu nerveux humain avec des cellules iPS montrant un, (b-c) la gaine de myéline (vert) entourant l'axone (rouge).

1.2.6.1.2 Séquençage ARNm

Une autre technique permettant de caractériser l'organoïde cérébral développé *in vitro* est le séquençage des ARN-messager (ARNm). Elle consiste à analyser le phénotype cellulaire à partir ARNm, qui rappelons que l'ARNm renferme le code génétique de la cellule. Ainsi à partir d'un séquençage du tissu biologique, les biologistes peuvent évaluer le nombre de gènes exprimés et déterminer les types de cellules exprimés. Par exemple si le tissu analysé est d'origine cérébrale, alors le séquenceur ARNm déterminera le nombre de type cellulaire exprimé au sein du tissu, comme des neurones, astrocytes, oligodendrocytes, cellules gliales[55] etc. Cette technique a permis à l'équipe de Velasco[82] de démontrer que le modèle organoïde

cérébral qu'ils avaient fabriqués *in vitro* pouvait générer de manière fiable une riche diversité cellulaire similaire à celle développée chez le cortex cérébral humain.

1.2.6.2 Caractérisations fonctionnelles

La communication interneurone est essentiellement basée sur des processus électriques et chimiques. Ce processus a été expérimenté pour la première fois en 1952 par à Hodgkin et Huxley, qui ont démontré expérimentalement les processus d'échanges ioniques transmembranaires de sodium et de potassium dans la conduction électrique d'un nerf. Ils enregistrent des signaux électriques de l'ordre de quelques millisecondes avec des électrodes appliquées sur le nerf, c'est en effet la naissance de l'électrophysiologie qui a permis aux neuroscientifiques de comprendre en temps réel le mécanisme de transmission électrique dans une structure cérébrale. Dès les années 1960, de nouveaux systèmes sont apparus permettant d'enregistrer l'activité électrique de plusieurs cellules neuronales simultanément et pour étudier leurs relations synaptiques[83], notamment grâce à l'essor des nouvelles technologies de microfabrication du silicium[84,85]. Cela a permis d'intensifier les mesures extracellulaires, en particulier avec les cellules neuronales cultivées *in vitro* où les études *in vivo* étaient difficilement réalisables. Les électrodes de mesure peuvent être utilisées pour la stimulation ainsi que l'enregistrement. Nous décrirons ci-dessous certaines techniques abordées dans le cas des cultures d'organoïdes cérébraux.

1.2.6.2.1 L'imagerie calcique

Bien que la caractérisation par les différentes techniques citées précédemment renseignent sur les types cellulaires formées dans les organoïdes cérébraux, elle ne permet cependant pas d'établir une analyse fonctionnelle de ces organoïdes. Étant donné que les organoïdes cérébraux sont des modèles au cours desquels les neurones nouveau-nés sont produits en continu, leurs caractéristiques électrophysiologiques se révèlent importantes puisqu'elles indiquent leurs fonctionnalités et leurs maturations.

L'imagerie calcique[86] utilise une approche optique et électrophysiologique, elle sonde par fluorescence les variations de concentration en ions calcium à travers les canaux présents dans les membranes du corps cellulaire de neurones. En effet, la variation de la concentration calcique induira la présence d'une activité neuronale, c'est donc cette activité qui est mesurée par fluorescence. Lancaster[87] et son équipe ont pu démontrer la fonctionnalité du mini cerveau produit par culture *in vitro* en visualisant l'activité spontanée des neurones par flux calcique. Ils ont en effet pu observer les oscillations calciques provoquées par le fonctionnement des neurones. Pour ce faire, ils ont marqué le calcium présent naturellement dans le tissu cortical par le marqueur Fluo-4 calcium (ROI) auquel ils ont rajouté du Glutamate pour accentuer les oscillations (Figure I. 21).

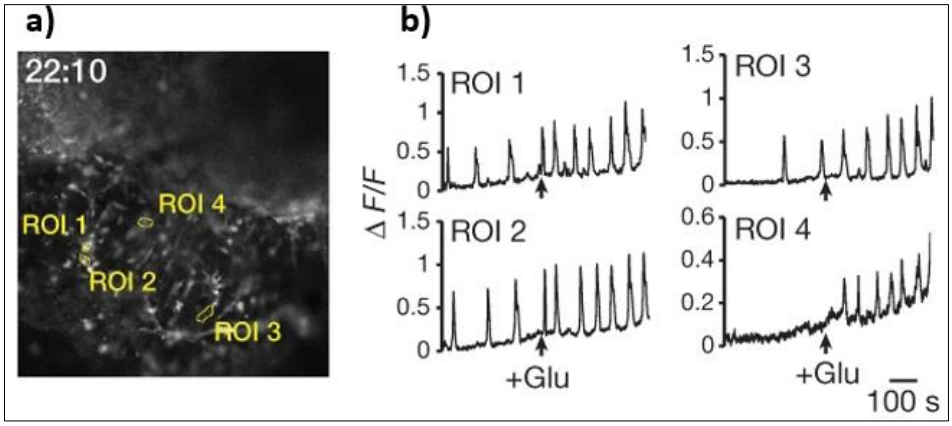


Figure I. 21: (a) Marqueur Fluo-4 calcium (ROI, jaune) dans le cerveau ; (b) oscillations calciques et accentuation des oscillations par ajout de Glutamate.

1.2.6.2.2 L'optogénétique

Depuis la progression de l'optique, la biologie n'a cessé de faire de nouvelles découvertes dans le domaine cellulaire. La naissance de l'optogénétique qui comme son nom l'indique couple optique et génétique, consiste à introduire dans les cellules un gène photosensible qui est activé par une stimulation lumineuse. Dans le cas des cellules neuronales, la stimulation optique va modifier l'état de polarisation de la membrane du neurone et contrôler l'activité de la cellule modifiée et des cellules de son réseau.

L'optogénétique a permis aux neuroscientifiques d'analyser des circuits neuronaux complexes, comme l'épilepsie, la maladie de Parkinson et le traitement des douleurs chroniques. Cette technique justifie d'un enregistrement de l'activité neuronale à haute résolution temporelle[88] et qui s'est avérée être utile pour cartographier le réseau neuronal des organoïdes[88].

L'équipe de Mansour[67] a réalisé une transplantation d'un organoïde humain dans un cerveau d'une souris dans le but d'innerver l'organoïde. De ce fait, ils ont utilisé l'optogénétique pour montrer la connectivité entre l'organoïde greffé et le cerveau hôte. Pour cela, ils implantent une fibre optique au sein de l'organoïde et des microélectrodes dans le cerveau hôte. Vient ensuite la stimulation optique de l'organoïde qui engendre une réponse électrophysiologique des neurones du cerveau hôte. Cela suppose de conclure qu'il existe un réseau établi entre le greffon et le cerveau hôte (Figure I. 22).

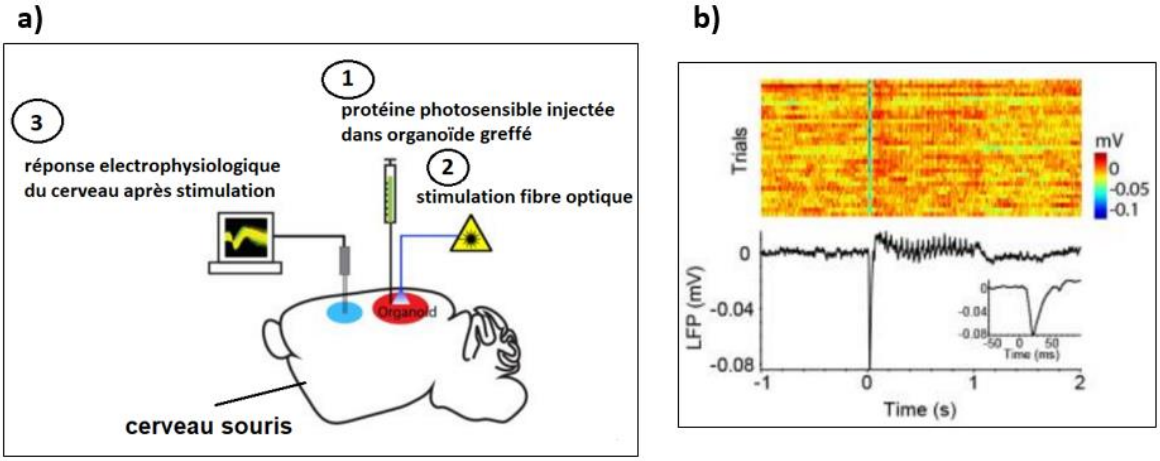


Figure I. 22: Suivis électrophysiologique d'un organoïde humain transplanté dans un cerveau de souris. (a) Stimulation optique de l'organoïde. (b) réponse électrophysiologique (Local Field Potential) des neurones du cerveau hôte (souris).

1.2.6.2.3 Patch-clamp

La technique du patch-clamp est une technique référencée depuis les années 1970 dans les mesures électrophysiologiques consistant à mesurer des courants ioniques intracellulaires (Figure I. 23). Rappelons que dans les membranes cellulaires des neurones, il existe des canaux ioniques transportant des ions de types potassium, sodium, calcium à des vitesses de 10^6 ions/seconde et qui par conséquent génèrent un faible courant électrique de quelque picoampères. Ce courant ionique est mesuré par une micropipette en verre (1µm de diamètre) qui est en contact avec une cellule unique. La méthode patch-clamp permet d'obtenir une résolution temporelle élevée de l'activité neuronale à travers la cellule neuronale[89], cependant elle offre une moins bonne résolution spatiale lorsqu'il s'agit d'évaluer l'activité des neurones de plusieurs cellules d'un tissu cérébral [55]. C'est une technique qui reste difficile à employer, puisque la micropipette doit être minutieusement insérée à la cellule de faible dimension (µm). Par ailleurs, le patch-clamp ne permet pas l'étude sur le long terme puisqu'une fois la micropipette retirée du système, la cellule neuronale est lésée.

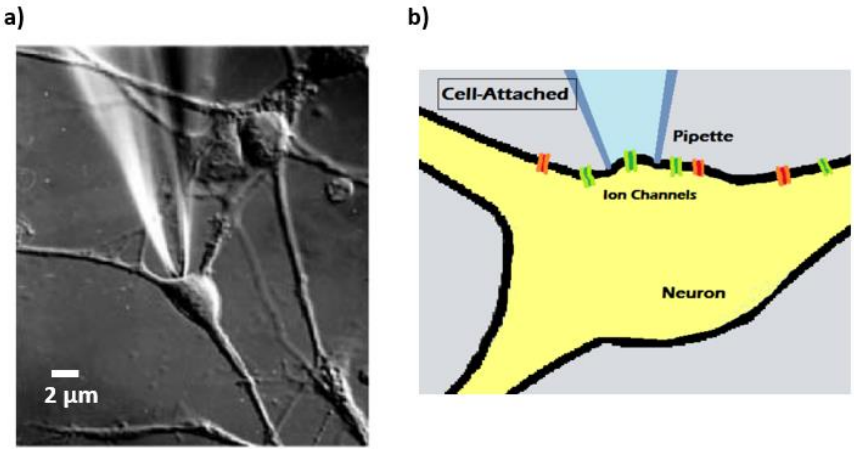


Figure I. 23: Mesure électrophysiologique du neurone avec la technique patch-clamp : (a) image microscope d'une pipette de patch scellée à un neurone en culture[90], (b) pipette attaché sur la membrane cellulaire du neurone et mesurant l'activité électrophysiologique d'un canal ionique[91].

1.2.6.2.4 Multi Electrodes Array (MEA)

Les MEA (Multi Electrodes Array) ou matrices de microélectrodes, sont des systèmes de mesures électrophysiologiques adoptés au cours des dernières années[92] dans lesquelles sont regroupées un ensemble de microélectrodes (plusieurs dizaines voire milliers de microélectrodes) sur une faible surface planaire (μm^2). L'avantage des MEAs c'est qu'elles enregistrent l'activité extracellulaire des neurones sans dommage mécanique à la membrane plasmique des neurones[93] et sur le long terme[72]. On trouve des électrodes de différentes tailles, de quelques micromètres à des centaines de micromètres. La faible taille des électrodes permet d'accéder à des activités unitaires des neurones alors que les électrodes de plus grands diamètres enregistrent des activités électriques d'une population de neurones.

C'est depuis les années 1960, où le développement de la technologie sur silicium a commencé que les premières MEAs sont apparues. Comme en 1969 à l'Université de Stanford, où l'équipe d'Angell a conçu pour la première fois un réseau de microélectrodes intégré sur silicium pour sonder l'activité neuronale *in vivo* à partir du cortex de chat[94] (Figure I. 24.a). C'est la première MEA implantable construite. À la même époque, à l'Université d'Harvard, Thomas et al[95] ont micro-fabriqué des microélectrodes au nombre de 30 intégrées dans une chambre de culture. C'est dans cette chambre que seront cultivées pour la première fois des cellules cardiaques pour des mesures électrophysiologique *in vitro* (Figure I. 24.b), c'est la première MEA non-implantable développée.

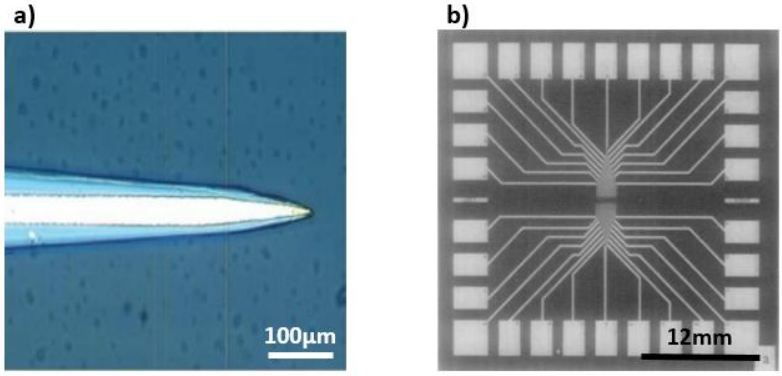


Figure I. 24: (a) Image optique du premier modèle MEA[94] implantable pour des mesures in vivo. (b) Premier modèle MEA sur verre, pour des mesures in vitro[95].

Les MEAs peuvent être fabriquées sous plusieurs supports : silicium, verre ou polymère flexible. Suivant leurs modes de fabrications, elles apportent différentes approches pour les mesures. Par exemple, la technologie sur silicium garantit grâce à ses propriétés électroniques une intégration sur le même substrat d'une partie acquisition et stimulation à la fois[96] (Figure I. 25.a). Tandis que la technologie MEA sur verre n'impose pas de stress aux cellules comme le silicium, c'est une technologie compatible aux cultures cellulaires *in vitro* pour le long terme. En plus, les MEAs sur verre ont l'avantage d'être transparente, ce qui leurs permettent de réaliser en parallèle des mesures électriques, des observations au microscope[97] (Figure I. 25.b). Enfin, nous retrouvons les MEAs fabriquées sur polymère flexible, celles-ci sont plus utiles

lorsque les mesures sont *in vivo*, elles ont l'avantage de causer moins de lésions et affectent moins la fonctionnalité tissulaire[98] (Figure I. 25.c).

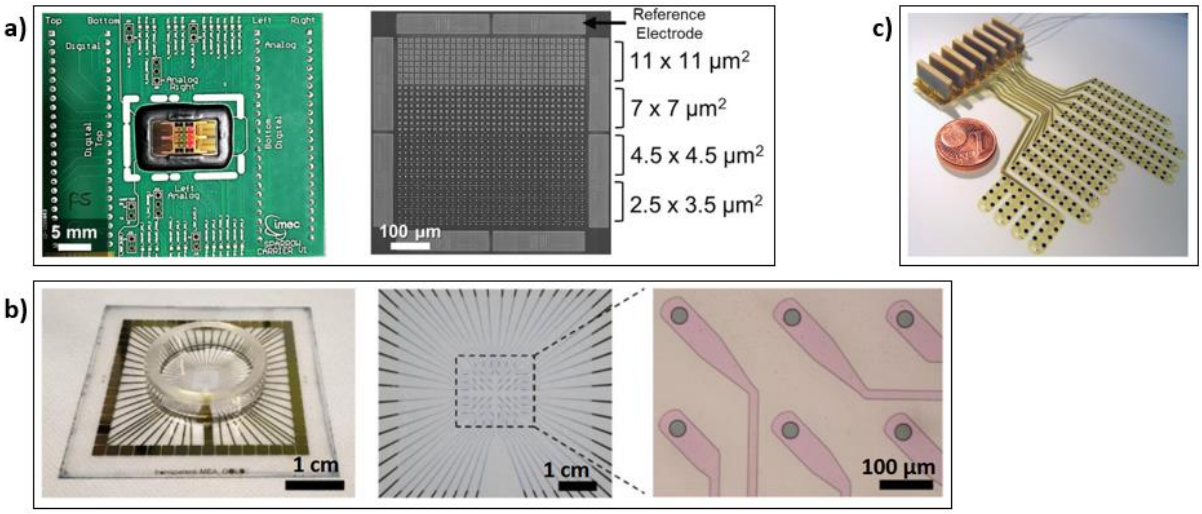


Figure I. 25: (a) Image d'une puce CMOS-MEA composée de 16 384 électrodes en nitrure de titane et de différentes tailles[99]. (b) Image optique d'une MEA sur verre (à gauche), gros plan de la région d'enregistrement transparente (au centre) et image au microscope des électrodes d'enregistrement (à droite)[100]. (c) Réseau de 252 électrodes intégrées sur implant en polyimide[101].

Grâce à la forte densité d'électrodes (60 à 20000) sur quelques millimètres, les MEAs ont prouvées un grand potentiel pour la cartographie du réseau neuronal mais également pour les tests de pharmacologies[102].

Pour résumer, la connaissance du cerveau est très limitée par le manque de modèles représentatifs. Néanmoins depuis la découverte des cellules souches iPS et de la progression des techniques d'échafaudages des organoïdes cérébraux, il est possible de représenter des modèles de cerveaux humains *in vitro*, suite à quoi ils pourront modéliser des maladies neurodégénératives. Par ailleurs, le suivi du développement de l'organoïde cérébral est établi soit optiquement ou soit par mesure de potentiels d'actions avec des MEAs. Pour notre part, nous nous intéresserons à cette dernière méthode de suivi puisqu'au LAAS nous avons acquis une méthodologie de fabrication de micro-capteurs MEMS et dont les MEAs.

1.3 LE SUIVI DU DEVELOPPEMENT DE L'ORGANOÏDE CEREBRAL AVEC LES MEAS

1.3.1 L'intérêt des MEAs

Les MEAs sont aujourd'hui appliquées dans les études en neurosciences[103] et ont montré un grand potentiel pour les études de réseaux neuronaux *in vitro* [102], notamment pour la cartographie du réseau grâce à une forte densité d'électrodes situé au centre de la MEA. Cette forte densité pouvant atteindre jusqu'à 3333 électrodes/mm^2, offre des enregistrements avec une très haute résolution spatiale[104]. On compte parmi les cultures de neurones *in vitro* qui

soient manipulées dans des chambres MEAs la culture 2D[105], la culture tranche de cerveau[106] et la culture d'organoïde cérébral[107] (Figure I. 26).

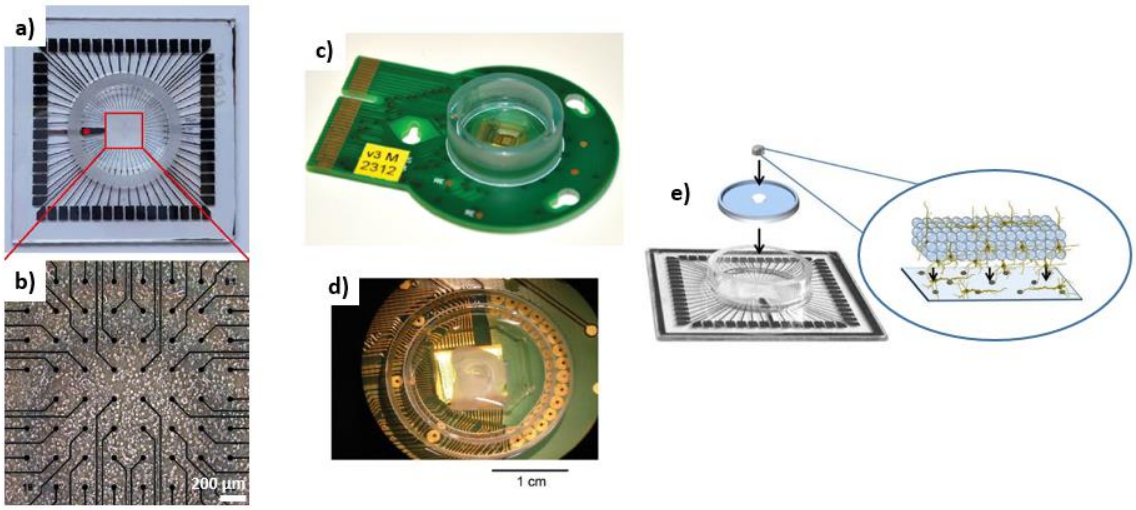


Figure I. 26: (a) Culture 2D de neurones de l'hippocampe sur MEA, (b) réseau 60 électrodes (S=100µm²)[105]. (c) MEA-CMOS avec 11.011 électrodes (S=35µm²), (d) culture de tranche de cerveau[106]. (e) Culture organoïde cérébral assurée par des billes (d=40µm) et contenu dans une chambre MEA[107].

Jusqu'à présent, la plupart des cultures réalisées sur les MEAs planaires étaient des cultures 2D. Néanmoins, depuis le boom des cultures 3D ces dix dernières années, les MEAs planaires ou traditionnelles ne permettent plus de mesurer les activités électriques sur l'ensemble du réseau 3D. En effet, il réside une inconnue sur le développement du réseau neuronal avec les MEAs planaires (2D), car la composante 3D du réseau n'est pas prise en compte lors les mesures. Pour y remédier, des MEAs 3D se développent sur cet axe pour pallier aux limites des MEAs 2D[108].

1.3.2 Les nouveaux modèles de MEA pour le suivi des cultures 3D

La culture 3D de cellules neuronales ou d'organoïdes cérébraux permets aujourd'hui d'étudier le développement tissulaire, de même que le développement de maladies par le biais de la pharmacologie ciblée. Bien que l'optogénétique[88] reste un domaine avancée dans l'étude électrophysiologique des cultures 3D de cellules neuronales, le développement des cultures sur puces a sollicité le développement des MEA (2D). Néanmoins, la surveillance des cellules dans un micro environnement 3D n'est pas adaptée puisqu'elle n'étudie pas réellement la cartographie des neurones qui s'établissent sur son ensemble. Parvenir à développer des systèmes d'enregistrement 3D de l'activité électrique de tissus nerveux constitue donc certainement un verrou actuel majeur en neurosciences. Plusieurs approches récentes pour surmonter les défis de l'enregistrement électrophysiologique 3D pourraient être utilisées pour décrypter précisément le code neuronal des organoïdes cérébraux, comme l'utilisation d'une plateforme qui intégrerait des microélectrodes dans les trois dimensions[104,108–110] (Figure I. 27.a). Il y a également l'utilisation de microélectrodes intégrées dans une plateforme macroporeuse et au sein de l'organoïde[111,112] (Figure I. 27.b) qui soit capable d'enregistrer l'activité cérébral en trois dimension. Récemment des ingénieurs de l'équipe de Rogers ont commencé à développer des implants flexibles qui couvrent la surface de l'organoïde sacrifiant l'accès à la région interne[113,114] (Figure I. 27.c). Quelques exemples de MEA-3D sont citées ci-dessous.

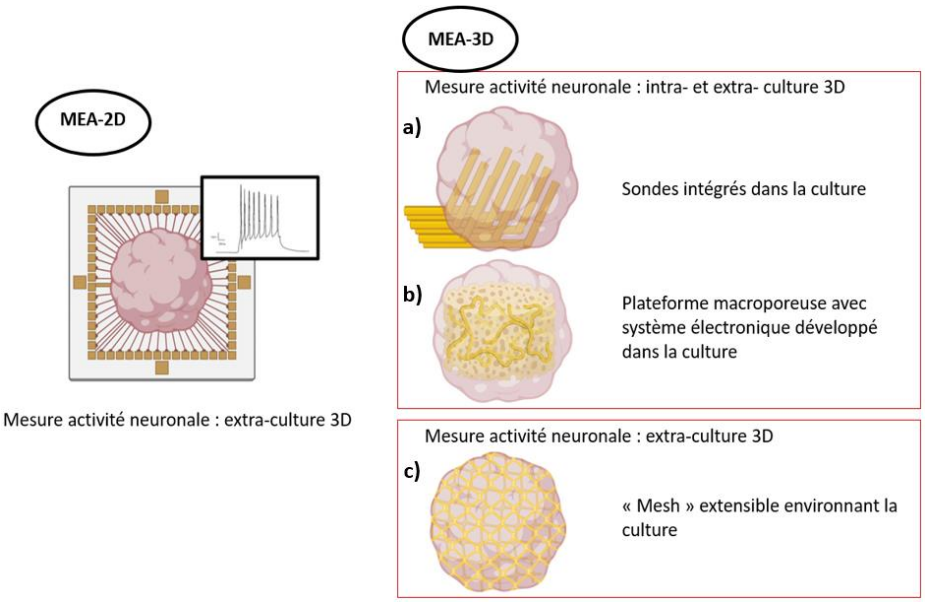


Figure I. 27: Stratégies pour l'électrophysiologie tridimensionnelle[115]. (a) l'utilisation d'une plateforme (silicium, PDMS) intégrant des électrodes sur les trois dimensions[104,108–110], (b) les électrodes sont intégrées dans une plateforme macroporeuse couvrant tous le volume de l'organoïde[111,112], (c) les implants flexibles couvrent la surface de l'organoïde[113,114].

Plusieurs formes d'architectures sont conçues autour des MEAs afin de cartographier un réseau 3D des cultures. Comme Yuan[104] et al ont réussi à cartographier l'interactivité d'une centaine de neurones distants de quelques micromètres à quelque millimètre. Les MEAs sont capables de mesurer des réponses du circuit cérébral à plusieurs endroits et de classifier les fonctionnalités des neurones[107], cela grâce à une HD-MEA (High Density MicroElectrode Array) qui contient jusqu'à 20000 microélectrodes (d=18µm). Bien qu'elle n'étudie pas la structure 3D de la culture, elle permet d'accéder grâce à sa forte densité de microélectrodes aux corrélations de signaux spécifiques de neurones individuels (Figure I. 28). Ce qui fait défaut à cette technique, c'est la quantité de donnée extraite et qui est difficile à analyser. Des algorithmes sont ainsi créés pour analyser pleinement des données extraites[116].

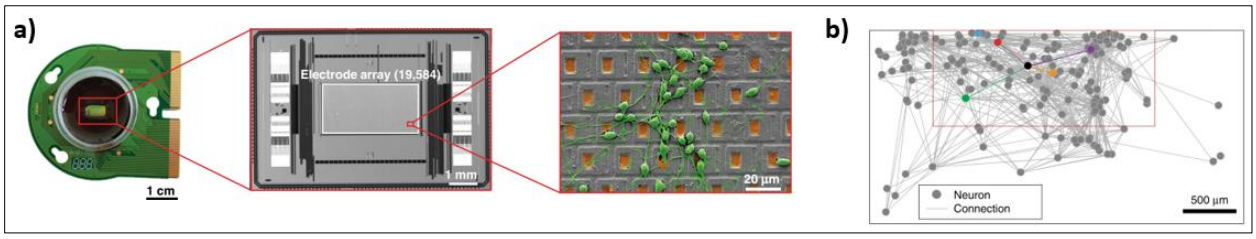


Figure I. 28: Système HD-MEA empaquetant 19,584 électrodes sur une surface de 1.8 × 3.5 mm2 et image de culture de neurones sur HD-MEA par microscopie électronique à balayage (MEB). (b) Carte de connectivité d'un réseau de 204 neurone à la 2ième semaine de culture[104].

Une autre approche technologique permet d'accéder à des mesures électrophysiologiques 3D de la culture, avec l'utilisation d'un maillage intégrant des microélectrodes. Ce maillage à base d'un polymère flexible, va permettre d'enrober la culture en prenant sa forme et cela sur la totalité du temps de développement du tissu. L'équipe de Rogers et al. [114] ont enregistré l'activité électrique de neurones à l'aide de fils spirales conçus pour s'étirer et se déformer pour s'accommoder à la croissance du tissu cérébral (Figure I. 29). Les fils sont microfabriqués sur

du polyimide (épaisseur 4µm), où sont assemblées 9 microélectrodes en or (d=10µm) sur une surface de 60x60 µm^2.

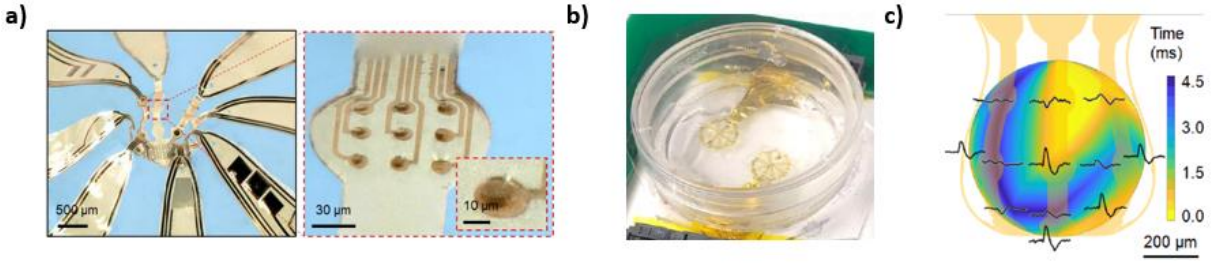


Figure I. 29: Interfaces neuronales tridimensionnelles multifonctionnelles pour organoïdes corticaux[114] (a) MEA-3D conçus pour s'étirer et se déformer pour suivre la croissance volumétrique d'un organoïde cérébral, avec intégrées 9 microélectrodes (d=10µm) sur 60x60 µm^2 pour le suivi électrophysiologique. (b) Culture organoïde cérébral enrobée avec le maillage. (c) Cartographie spatio-temporelle 3D de l'activité neuronale spontanée à travers la surface du tissu cérébral[114].

Cependant cette approche ne permet pas une mesure 3D car son maillage borne la culture 3D et ne se concentre pas sur ce qui se passe à l'intérieur de la culture. D'autres équipes utilisent d'autres configurations pour allier un système 3D de mesure sur MEA. Spanu et al[109] proposent de former une soixantaine piliers d'or (h=110µm) sur des MEAs traditionnelles (Figure I. 30). Ils utilisent un dépôt galvanostatique pour former les piliers et cultivent un organoïde cérébral dans la chambre MEA. Il note avec cette méthode, une amélioration du signal sur bruit puisque la surface de mesure est plus grande, en revanche cette méthode ne permet pas de cartographier le réseau neuronal en 3D puisqu'elle mesure toujours une activité électrique planaire.

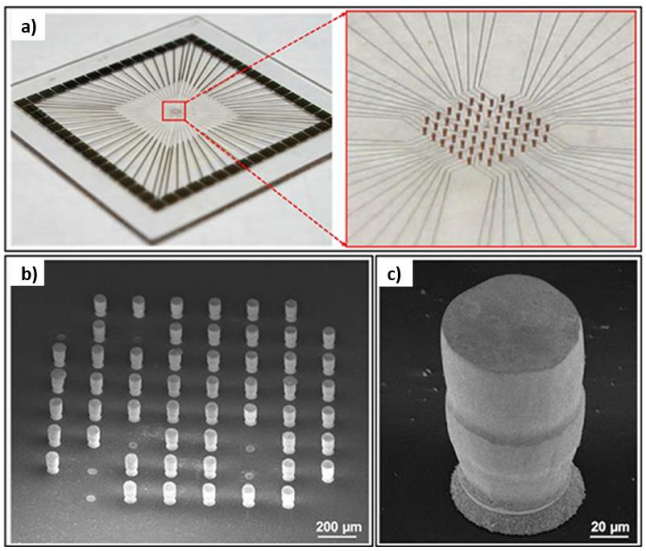


Figure I. 30: (a) Photo MEA-3D. Images MEB (b) zone d'enregistrement de l'activité électrophysiologique composant 60 piliers d'or (c) électrode d'or sous la forme pilier et d'hauteur 110 µm[109].

Soscia et al[108] ont quant à eux bien intégré une troisième dimensionnalité aux MEA planaires. Pour ce faire, ils ont courbé mécaniquement dix sondes en polyimide pour donner un système de mesure sur les plans X, Y et Z. On compte au total 256 électrodes (d= 50µm) intégrées aux sondes (Figure I. 31), ce qui leurs ont permis de cartographier le réseau neuronal d'une culture 3D pendant plus d'un mois. Néanmoins cette technique peut montrer des incommodités, car la courbure des sondes s'effectue manuellement et peut endommager des électrodes.

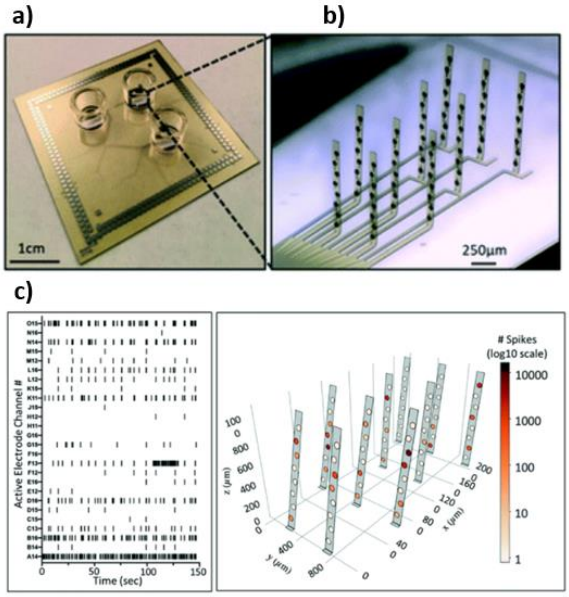


Figure I. 31: (a) Dispositif MEA-3D (b) avec des sondes polyimide courbées, (c) enregistrement activité électrophysiologique en trois dimensions de la culture 3D de cellules neuronales[108].

Très récemment l'équipe de Shin et al[110] ont réussi à mettre en point une MEA 3D en intégrant avec celle-ci une fibre optique permettant de stimuler in situ une culture d'organoïde cortical. Pour ce faire, ils ont empilé des MEA 2D pour reproduire un système de mesure en 3D. Ainsi la MEA-3D intègre une soixantaine d'électrodes (d=60µm), situées dans les 3 plans. Grâce à une fibre optique intégrée, ils ont réalisé des stimulations optiques afin de cartographier la croissance des neurones dans le milieu. Pour parvenir à un tel résultat, ils ont relevé sur plusieurs électrodes une synchronicité du signal électrique. Qui de plus est plus fréquente à mesure que l'organoïde se développe (Figure I. 32).

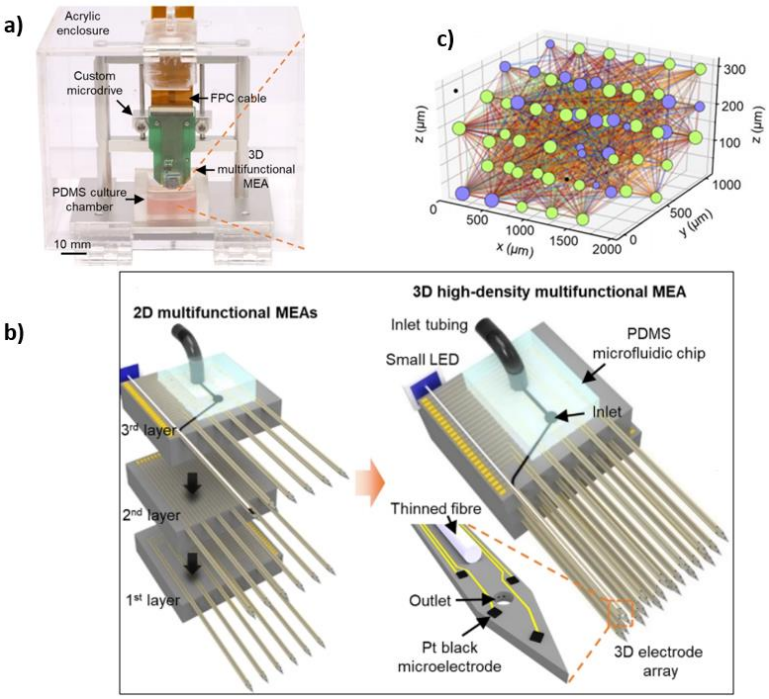


Figure I. 32: (a) Photographie du système MEA 3D introduit dans une chambre de culture, (b) Schémas montrant trois MEA 2D empilées pour former à droite une MEA 3D intégrant 63 électrodes (d=60µm) et d'une fibre optique pour la stimulation. (c) Cartographie du réseau 3D : analyse de la dynamique du réseau et corrélations entre les nœuds de neurones à 14 jours[110].

Cette étude apporte des résultats prometteurs pour les neuroscientifiques car elle permettrait d'expliquer comment des groupes neuronaux situés dans des zones différentes sont reliés de manière dynamique et fonctionnelle.

Pour résumer, aujourd'hui il existe des méthodes de suivi des potentiels d'actions (PA) extracellulaires des organoïdes cérébraux ou des cultures 3D avec des MEAs planaires 2D. Par le grand nombre d'électrodes qui constituent la MEA, il est possible de cartographier le réseau neuronal avec une très bonne résolution spatio-temporelle. Cependant l'information du développement cérébral est rognée puisque l'information des PA dans la dimension 3D est manquante. Nous avons vu, que seulement deux équipes travaillent aujourd'hui à rechercher des technologies de types MEA 3D. La technologie pour ce type de mesure est donc quasi inexistante et pourtant très importante à considérer. C'est d'ailleurs le problème dont fait face la startup Synaxys avec qui nous collaborons et qui actuellement n'utilisent que des MEAs planaires 2D pour le suivi des organoïdes cérébraux. Il existe par ailleurs d'autres données à considérer lors des cultures d'organoïdes pour assurer leurs viabilités sur le long terme et leurs reproductibilités. Ils concernent les données physiologiques tels que l'oxygène, le pH, les nutriments (glucose, lactate, etc.) du milieu de culture. Nous verrons dans le paragraphe suivant les éléments qui permettent de suivre et de contrôler ce type de milieu.

1.4 LES OUTILS ADAPTES POUR LE SUIVI PHYSIOLOGIQUE DES CULTURES D'ORGANOÏDES

Des données tels que le pH, le taux d'oxygène dissous, ou d'autres nutriments (glucose, lactate, etc.) semblent inconnues dans le milieu de culture des organoïdes, ce qui peut augmenter l'hétérogénéité du milieu et/ou le contrainte de vivre dans un milieu en hypoxie ou mal nourri. Cela met l'accent sur la nécessité d'assurer une surveillance en continue avec des capteurs adaptés afin d'obtenir des cultures d'organoïdes viables sur le long terme. Par exemple, lorsque l'organoïde cérébral est mal vascularisé, cela empêche la diffusion des nutriments à travers les cellules qui le constituent. Le système cellulaire par définition a besoin d'énergie pour maintenir ses fonctionnalités, où les molécules d'oxygène et de glucose apportent cette énergie, suite à quoi la cellule rejette des déchets dont du gaz carbonique CO_2 entrainant l'acidification du milieu (Figure I. 33).

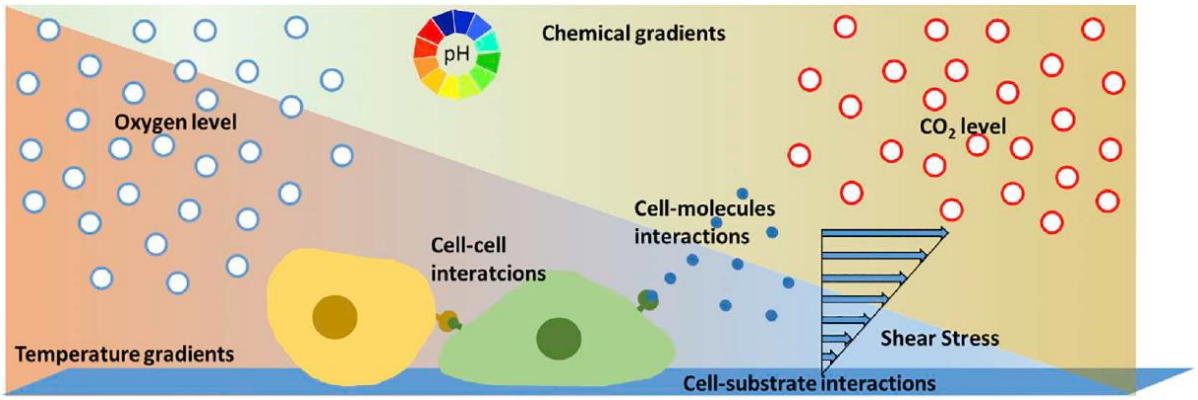


Figure I. 33: Illustration montrant le micro environnement cellulaire où des composés physicochimiques tels que : pH, CO_2, température et O_2 interragissent[117].

De plus, une grande variabilité des cultures a été observée du fait de la provenance des cellules, mais aussi des conditions expérimentales[118]. Ce sont des facteurs importants qui peuvent augmenter la variabilité expérimentale des organoïdes et limiter leurs reproductibilités. La possibilité de suivre les paramètres physiologiques (glucose, oxygène ou en pH) grâce à des capteurs intégrés, dès les premiers stades du procédé biologique représente un avantage considérable pour un développement du tissu nerveux plus pertinent. Par ailleurs, les cultures d'organoïdes étant cadrées dans des micro environnements, un réel besoin de miniaturisation des capteurs est crucial pour assurer une standardisation des mesures. On dénombre principalement deux techniques permettant le suivi de micro cultures *in vitro* et de manière non-invasive : les capteurs optiques et électrochimiques. Une variété de capteurs sont intégrés dans des cultures cellulaires pour mesurer l'oxygène[119–122] et le pH[121,123–128].

1.4.1 Les capteurs optiques et électrochimiques

Du fait de la faible concentration de métabolites dans le milieu cellulaire (µM-pM) : d'oxygène, de glucose, de lactate et d'autres nutriments, il convient alors d'adapter un capteur sensible à leurs détections. Cette sélectivité peut aussi bien dépendre du matériau utilisé que du mode de détection employé. Pour cela il existe une variété de matériaux et plusieurs modes de détection capables de suivre le métabolisme cellulaire (Tableau I. 2).

Type de métabolite détectée	Mode de détection	Types de capteurs utilisés
pH	Potentiométrique	ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor)[129]
		Oxyde d'Iridium[130]
		LAPS (Light-addressable potentiometric sensor)[131]
	Optique	Optodes[132]
		Colorants optiques[133]
Oxygène	Ampérométrique	Electrodes type Clark[134]
	Optique	Colorants optiques[135]
Glucose/Lactate	Ampérométrique	Catalyse enzymatique[136]
	Optique	Colorants optiques[137]
H_2O_2	Ampérométrique	Platine[138]

Tableau I. 2: Les modes de détection capables de suivre les métabolites cellulaire tels que : (pH, O_2, glucose, lactate, H_2O_2.

1.4.1.1 Capteurs optiques

Par le progrès rapide de la microscopie optique, la microscopie à fluorescence fait partie des techniques les plus employées pour le suivi du métabolisme cellulaire. L'emploi de sondes

fluorescentes permet d'accéder à plusieurs types d'informations notamment le marquage cellulaire et les mesures métaboliques tels que : le pH[133], l'oxygène[135], le glucose/lactate[137]. La fluorescence est une forme de luminescence se produisant suite à l'absorption de photons par une molécule de type fluorophore. Les facteurs comme le pH, la polarité, la présence d'ions ou les éventuelles interactions avec d'autres molécules influencent la fluorescence (Figure I. 34).

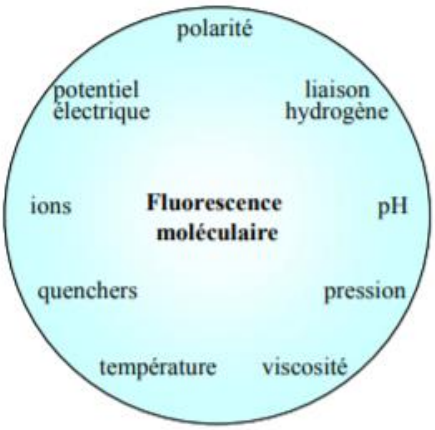


Figure I. 34: Schéma des différents facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la fluorescence.

Ces capteurs optiques ont pour avantage de s'intégrer de manière non-invasive dans des micro cultures difficiles d'accès. Par exemple, les capteurs fluorophores se dispersent facilement dans le milieu grâce à leurs tailles micrométriques. C'est le cas de Funfak et al[139] qui a analysé l'activité du pH dans une culture cellulaire d'E. coli. Des micro particules de polymère contenant un colorant sensible au pH ont été immobilisées dans une micro chambre contenant la culture E. coli et qui ont suivi durant plus de 4 jours sa variation de pH, soit de plus de 3 unités de pH (Figure I. 35.a). Pour ce faire, la mesure utilise le principe de la fluorescence et la loi de Beer-Lambert (A = k x C), où l'absorbance (A) ou densité optique absorbée par la culture est proportionnelle à la concentration (C) des ions hydronium (H_3O^+) présents en solution. Les particules sensibles au pH sont excitées par une source lumineuse et leurs rayonnements émis sont mesurés à l'aide d'un détecteur. L'intensité de la lumière est déterminée par une photodiode et convertie en un courant photoélectrique (Figure I. 35.b).

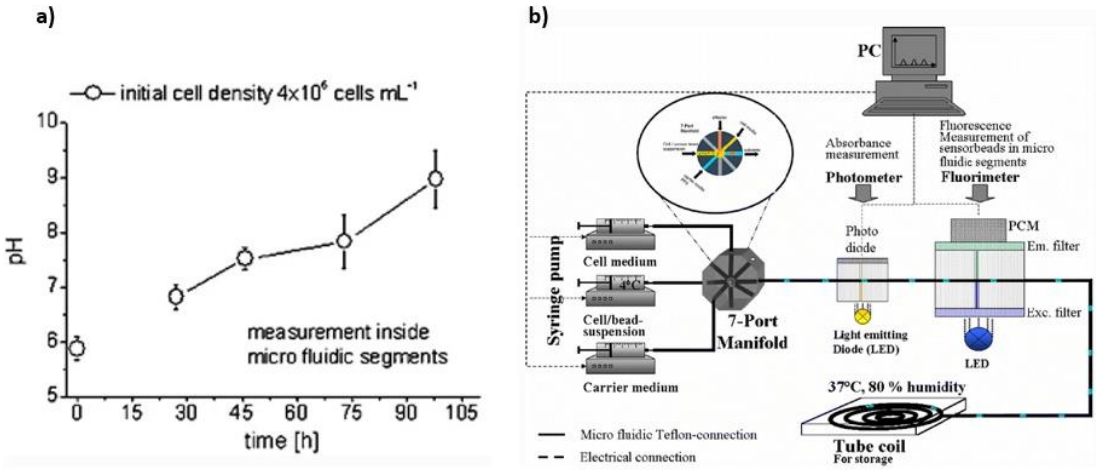


Figure I. 35: (a) Installation expérimentale pour la mesure de l'intensité de fluorescence en fonction du pH pour analyser l'activité physiologique d'une culture cellulaire d'E. coli en développement. (b) Mesure du pH durant le développement de la culture cellulaire d'E. coli.

1.4.1.2 Capteurs électrochimiques

Bien que la microscopie optique basée sur la fluorescence reste l'approche la plus courante pour surveiller le pH d'une culture cellulaire, elle est suivie de près par la détection électrochimique. Cela est dû à la facilité d'intégration et à la miniaturisation des électrodes, rendant leurs utilisations pratiques[140]. De plus, les capteurs électrochimiques sont très sensibles, ils répondent très rapidement et ils sont peu coûteux puisqu'ils ne nécessitent pas de gros équipements ou d'instrumentation haut de gamme pour transformer l'information chimique en signal électrique. Par ailleurs, nous rajouterons que le besoin de suivre des cultures d'organoïdes de manière continue et longue, nécessite des capteurs stables dans le temps et des capteurs qui n'apportent pas de toxicité dans le milieu de culture. Or les capteurs optiques souffrent de photo-blanchiment[141], c'est-à-dire que les molécules de fluorophores perdent en intensité lumineuse avec le nombre d'excitation qu'elles subissent. Qui en plus génèrent des radicaux libres lors des réactions chimiques entre la lumière et l'oxygène, ce qui peut être nocif à long terme pour le milieu de culture[142].

On dénombre aujourd'hui, deux techniques récurrentes et utilisées comme moyens de détection électrochimique du métabolisme cellulaire des cultures 3D : ampérométrique et potentiométrique.

1.4.1.2.1 Les capteurs ampérométriques

L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé. Elle est fonction de la concentration des corps électroactifs qui seront oxydés ou réduits à une électrode de travail qui est connecté à une contre électrode et à une électrode de référence. Il est donc possible, après étalonnage de déterminer la concentration des corps présents par la mesure de l'intensité (Figure I. 36).

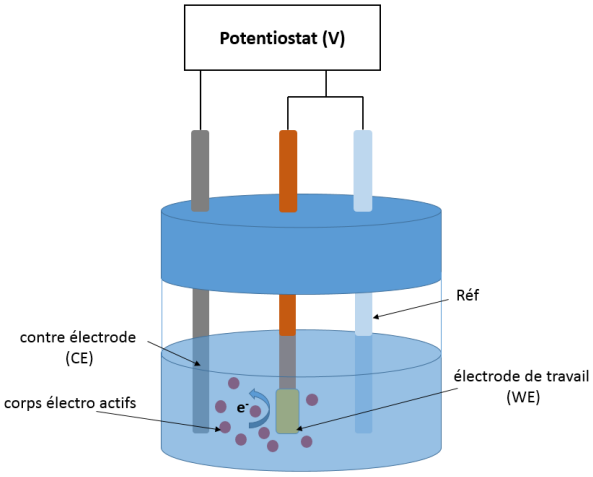


Figure I. 36 : Principe d'un capteur ampérométrique. Potentiostat délivrant le courant à un système à trois électrodes : CE, WE et l'électrode Réf et qui baignent dans une solution électrolytique. Des corps électro actifs sont oxydés ou réduits à la surface de la WE.

1.4.1.2.2 Les capteurs potentiométriques

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel (ddp) entre une électrode de mesure (électrode de travail) et une électrode de référence. La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement des concentrations des ions présents dans la solution. Par cette méthode, nous sommes capables de mesurer soit des potentiels d'oxydation/réduction, soit des potentiels pH ou soit d'autres types de potentiels (pCl, pNa…). Par exemple pour la mesure du potentiel pH, on mesure la ddp entre l'électrode indicatrice et l'électrode de référence (Figure I. 37). La ddp indique un potentiel proportionnel à la concentration des ions H_3O^+ de la solution. Cette proportionnalité est régie par la relation de Nernst où le potentiel E_0' représente la constante du potentiel standard de l'électrode indicatrice, R la constante des gaz parfaits, F la constante de Faraday et enfin T, la température fixée dans les conditions standards à 25°C.

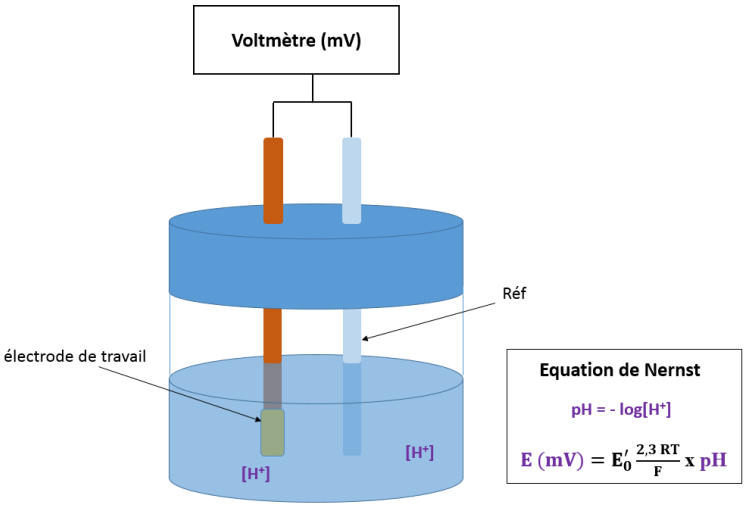


Figure I. 37: Principe d'un capteur potentiométrique: un voltmètre mesure la différence de potentiel à partir d'un système à deux électrodes : l'électrode de travail et l'électrode de référence et qui baignent dans une solution électrolytique. Le pH de la solution est mesuré grâce à la relation de Nernst.

En raison des avantages de l'électrochimie, notamment dans la fonctionnalisation a permis le développement de capteurs électrochimiques essentiellement dans le domaine du vivant ou de l'environnement. Une sélectivité et une sensibilité élevées peuvent être fournies par la fonctionnalisation du capteur, et sont utilisées dans la détection de molécules biologiques telles que les protéines, le glucose, ou l'ADN. Depuis l'avènement des micro cultures 3D *in vitro* où le besoin de la miniaturisation des capteurs est devenu indispensable, une large gamme de capteurs se sont développés pour le suivis du pH[143], oxygène[121], glutamate[144], glucose[121], acide ascorbique[145], etc.

On retrouvera une large gamme de pH-mètres électrochimiques reposant principalement sur des mesures potentiométriques, parmi elles les ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) et les électrodes à oxydes métalliques sont les capteurs les plus employés dans les cultures cellulaires. En effet les transistors à effet de champ sensibles aux ions (ISFET) sont des capteurs très sensibles aux variations de concentration en ions H_3O^+ [129]. Le principe de base du transistor ISFET est de contrôler le courant circulant entre deux zones de semi-conducteur (source et

drain) par l'application d'une tension sur l'électrolyte à analyser. Le courant traversant le dispositif est proportionnel à la concentration en ions H_3O^+ de la solution.

Bionas[129] est une entreprise commercialisant des plateformes microfluidiques assurant un suivis du métabolisme cellulaire avec des capteurs ISFET pour le pH et ampérométrique pour l'oxygène (Figure I. 38.-b). La haute résolution du capteur pH (27 V/ pH) leur permet de suivre le métabolisme cellulaire d'une culture de cellules tumorales. Dans la Figure I. 38. c une faible acidification du milieu est mesuré avec le capteur ISFET, soit 0,5 unité de pH. Ce système microfluidique est en plus avantageux car il leur permet d'établir une routine de mesure pH toute les 48h avec un système de pompage assurant l'apport des nutriments à la culture. Par ailleurs, afin d'analyser l'efficacité de médicaments, ils appliquent des tests de criblage sur des cellules cancéreuses et analysent en temps réel leurs réponses : pH, oxygène et température.

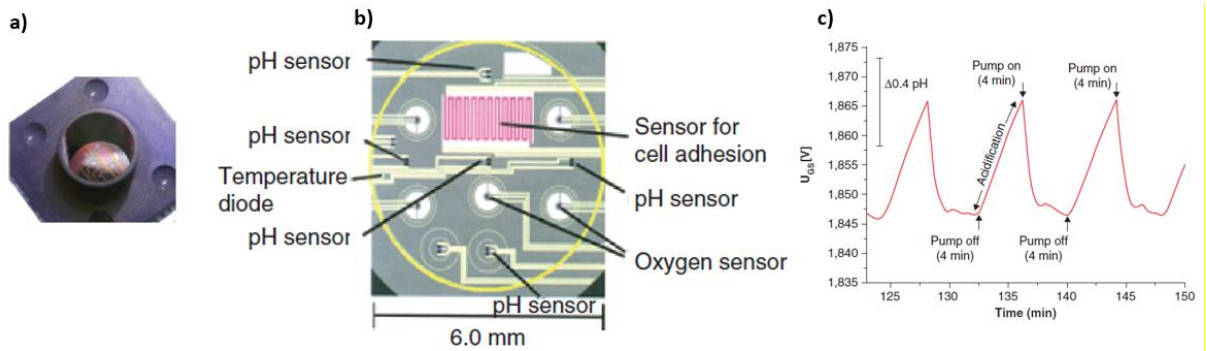


Figure I. 38: (a) Photo de la micro puce avec le puit de culture. (b) Système microfluidique à base de silicium qui intègre des micro capteurs : pH (ISFET), oxygène (ampérométrique) et température (optique). (c) Mesure du pH à partir d'une culture cellulaire tumorale avec le capteur IFSET, où le potentiel varie en fonction du pH de la culture (Bionas et al).

D'autres capteurs pH miniaturisés et très sensibles font concurrence aux capteurs ISFET, comme les électrodes à oxydes métalliques. Ils ont l'avantage contrairement aux ISFET d'être fabriqués sur tous types de substrats comme les substrats transparents qui sont très sollicités en biologie pour les observations optiques du milieu. Les oxydes métalliques, tels que l'oxyde de platine, l'oxyde d'Iridium ou l'oxyde de Ruthénium[146] sont souvent préférés en raison de leurs intégrations simples et de leurs grandes sensibilités[147]. En intégrant un capteur pH d'oxyde d'iridium dans une plateforme microfluidique, Ges et al[148] ont suivis l'activité d'acidification d'une culture de cellules cardiaques de souris sur quelques minutes sur la gamme pH [6-7,6] avec une sensibilité de 70 ± 5 mV/pH (Figure I. 39.a-c). Bitziou et al[149]ont quant à eux cartographier les variations pH à partir de différentes zones d'un tissu d'estomac. Pour ce faire ils disposent d'une plateforme où sont contenus des électrodes de pH en oxyde d'iridium (IrO_x) et sur laquelle est cultivée le tissu d'estomac. Cette technique leur a permis de suivre l'acidification du tissu lorsqu'il était soumis à des médicaments dans la gamme pH [6,8-7,6] avec une sensibilité de 70 ± 10 mV/pH (Figure I. 39.d-f).

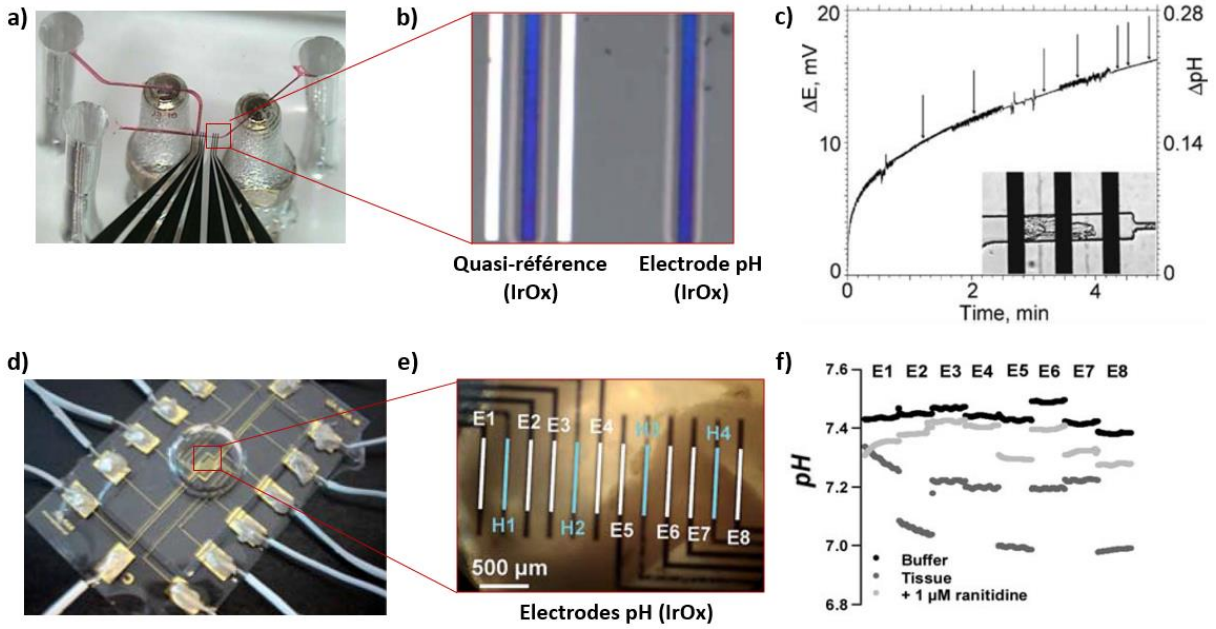


Figure I. 39: (a) Plateforme microfluidique contrôlant le pH d'une culture de cellules cardiaques avec (b) un système à 2 électrodes : quasi-référence (IrOx) et une électrode pH (IrOx). (c) Mesure de la sensibilité pH à partir de ΔE (mV) en fonction du temps (min) (Ges et al). (d) Mesure pH d'une culture de tissu d'estomac à partir d'une plateforme microfluidique avec (b) une électrode de référence (Ag/AgCl) et 8 électrodes pH (IrOx). (c) Mesures en temps réel du pH sur différentes zones du tissu avec les 8 électrodes IrOx (Bitziou et al).

1.5 PLAN DE THESE

Cette revue bibliographique a permis de mettre en évidence le développement des organoïdes qui proposent des modèles mimant *in vitro* les caractéristiques des organes *in vivo*. C'est une technique qui permet de faire avancer la médecine clinique puisqu'elle donne lieu à bio-mimer des maladies : génétiques, infectieuses, tumorales et en même temps qui permet d'évaluer l'efficacité de médicaments. Parmi les organoïdes développés, le cerveau humain intéresse les neuroscientifiques pour la recherche des maladies neurologiques et de leurs traitements. Ces modèles permettent de se rapprocher du modèle cerveau humain.

Nous avons vu dans ce chapitre qu'il existait de nombreux protocoles pour cultiver des organes de cerveaux *in vitro*. Néanmoins pour s'affranchir des problèmes liés à la reproductibilité et à la viabilité des cultures 3D *in vitro*, de nouveaux outils adaptés à la taille millimétrique de la culture sont créés pour assurer une surveillance de son développement. Des outils comme la microscopie optique ou les Multi Electrode Arrays (MEAs) planaires 2D ont montrés un grand potentiel pour la cartographie de réseaux neuronaux.

Néanmoins avec des MEAs planaires 2D, les mesures électrophysiologiques ne prennent pas en compte la totalité de la structure 3D de l'organoïde cérébral. En effet, aucun système ne permet encore un échantillonnage 3D des activités électriques neuronales. C'est pourquoi, nous, nous sommes intéressés à concevoir un micro-dispositif offrant des mesures électrophysiologiques dans les trois plans de l'organoïde cérébral (Figure I. 40). Ayant acquis

aux cours de précédentes thèses (V. Castagnola[150], A. Lecomte[151] et V. Saunier[152]) la technologie de capteurs MEMS, plus spécifiquement les technologies MEA et implant, nous avons décidé de coupler ces deux technologies afin de concevoir un micro-dispositif 3D pour le suivi électrophysiologique des organoïdes cérébraux développés par la start-up Synaxys. La fabrication du micro-dispositif et le couplage MEA-Implant seront discutés dans le chapitre 2.

Pour continuer, dans le chapitre 3, nous discuterons des mesures électrophysiologiques 3D menées avec le micro-dispositif MEA-Implant dans une culture neuronale 3D. Il y a également le système de suivi des nutriments qui doit être fait en amont afin de justifier d'un meilleur transport des nutriments[153]. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans le chapitre 4 à l'intégration d'un micro capteur pH facilement intégrable dans le micro-dispositif et développé donc par la méthode électrochimique. Cette étude a pour objectif de nous renseigner sur l'environnement du développement de la culture neuronale 3D. Un schéma du micro-dispositif final est dessiné ci-dessous.

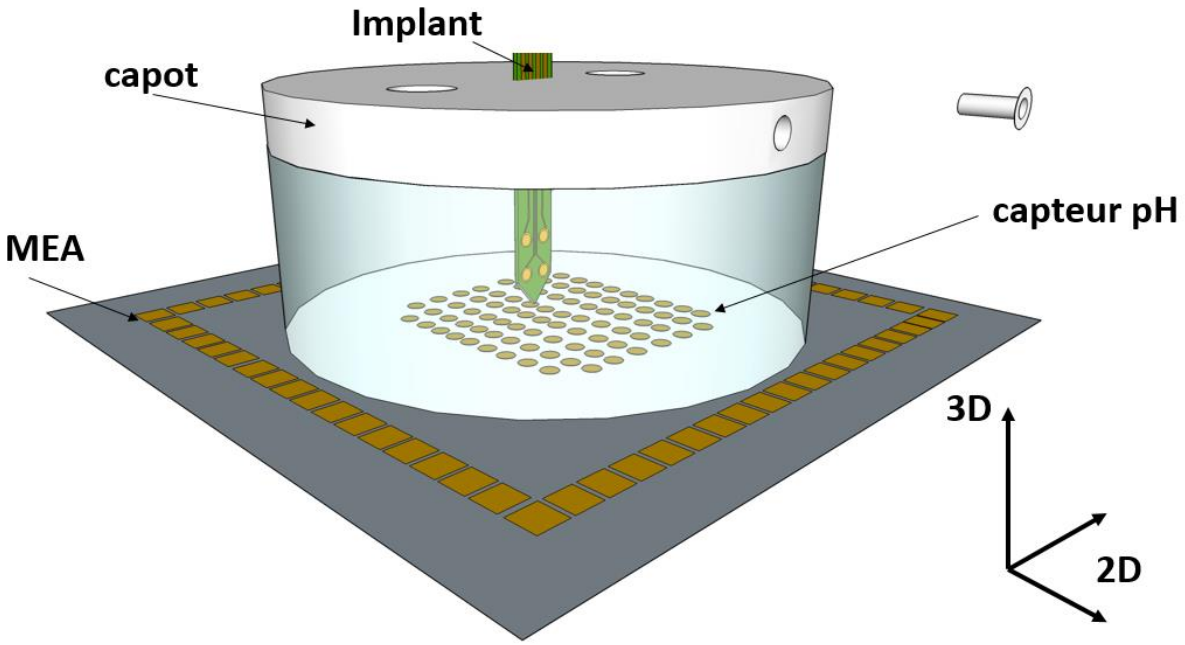


Figure I. 40: Schéma du micro-dispositif final après couplage de l'implant et de la MEA. La MEA planaire constituée de 60 microélectrodes planaires 2D et l'implant de 4 microélectrodes 3D. Le capteur pH est situé sur l'une des microélectrodes de la MEA.

1.6 RÉFÉRENCES

(1) Moscona, A.; Moscona, H. The Dissociation and Aggregation of Cells from Organ Rudiments of the Early Chick Embryo. *J. Anat.* **1952**, *86* (Pt 3), 287–301.

(2) Ehrmann, R. L.; Gey, G. O. The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen. *J. Natl. Cancer Inst.* **1956**, *16* (6), 1375–1403.

(3) Hynes, R. O. Alteration of Cell-Surface Proteins by Viral Transformation and by Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70* (11), 3170–3174. https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3170.

(4) Timpl, R.; Rohde, H.; Robey, P. G.; Rennard, S. I.; Foidart, J. M.; Martin, G. R. Laminin--a Glycoprotein from Basement Membranes. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (19), 9933–9937.

(5) Li, M. L.; Aggeler, J.; Farson, D. A.; Hatier, C.; Hassell, J.; Bissell, M. J. Influence of a Reconstituted Basement Membrane and Its Components on Casein Gene Expression and Secretion in Mouse Mammary Epithelial Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (1), 136–140.

(6) Hay, M.; Thomas, D. W.; Craighead, J. L.; Economides, C.; Rosenthal, J. Clinical Development Success Rates for Investigational Drugs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32* (1), 40–51. https://doi.org/10.1038/nbt.2786.

(7) Davis, C.; Naci, H.; Gurpinar, E.; Poplavska, E.; Pinto, A.; Aggarwal, A. Availability of Evidence of Benefits on Overall Survival and Quality of Life of Cancer Drugs Approved by European Medicines Agency: Retrospective Cohort Study of Drug Approvals 2009-13. *BMJ* **2017**, *359*, j4530. https://doi.org/10.1136/bmj.j4530.

(8) Sato, T.; Vries, R. G.; Snippert, H. J.; van de Wetering, M.; Barker, N.; Stange, D. E.; van Es, J. H.; Abo, A.; Kujala, P.; Peters, P. J.; Clevers, H. Single Lgr5 Stem Cells Build Crypt-Villus Structures in Vitro without a Mesenchymal Niche. *Nature* **2009**, *459* (7244), 262–265. https://doi.org/10.1038/nature07935.

(9) Nakano, T.; Ando, S.; Takata, N.; Kawada, M.; Muguruma, K.; Sekiguchi, K.; Saito, K.; Yonemura, S.; Eiraku, M.; Sasai, Y. Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs. *Cell Stem Cell* **2012**, *10* (6), 771–785. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.009.

(10) Lancaster, M. A.; Renner, M.; Martin, C.-A.; Wenzel, D.; Bicknell, L. S.; Hurles, M. E.; Homfray, T.; Penninger, J. M.; Jackson, A. P.; Knoblich, J. A. Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly. *Nature* **2013**, *501* (7467), 373–379. https://doi.org/10.1038/nature12517.

(11) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **2006**, *126* (4), 677–689. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044.

(12) Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126* (4), 663–676. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024.

(13) Lancaster, M. A.; Knoblich, J. A. Organogenesis in a Dish: Modeling Development and Disease Using Organoid Technologies. *Science* **2014**, *345* (6194), 1247125. https://doi.org/10.1126/science.1247125.

(14) Bigorgne, A. E.; Farin, H. F.; Lemoine, R.; Mahlaoui, N.; Lambert, N.; Gil, M.; Schulz, A.; Philippet, P.; Schlesser, P.; Abrahamsen, T. G.; Oymar, K.; Davies, E. G.; Ellingsen, C. L.; Leteurtre, E.; Moreau-Massart, B.; Berrebi, D.; Bole-Feysot, C.; Nischke, P.; Brousse, N.; Fischer, A.; Clevers, H.; de Saint Basile, G. TTC7A Mutations Disrupt Intestinal Epithelial Apicobasal Polarity. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124* (1), 328–337. https://doi.org/10.1172/JCI71471.

(15) Finkbeiner, S. R.; Zeng, X.-L.; Utama, B.; Atmar, R. L.; Shroyer, N. F.; Estes, M. K. Stem Cell-Derived Human Intestinal Organoids as an Infection Model for Rotaviruses. *mBio* **2012**, *3* (4), e00159-00112. https://doi.org/10.1128/mBio.00159-12.

(16) Yeung, T. M.; Gandhi, S. C.; Wilding, J. L.; Muschel, R.; Bodmer, W. F. Cancer Stem Cells from Colorectal Cancer-Derived Cell Lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (8), 3722–3727. https://doi.org/10.1073/pnas.0915135107.

(17) van de Wetering, M.; Francies, H. E.; Francis, J. M.; Bounova, G.; Iorio, F.; Pronk, A.; van Houdt, W.; van Gorp, J.; Taylor-Weiner, A.; Kester, L.; McLaren-Douglas, A.; Blokker, J.; Jaksani, S.; Bartfeld, S.; Volckman, R.; van Sluis, P.; Li, V. S. W.; Seepo, S.; Sekhar Pedamallu, C.; Cibulskis, K.; Carter, S. L.; McKenna, A.; Lawrence, M. S.; Lichtenstein, L.; Stewart, C.; Koster, J.; Versteeg, R.; van Oudenaarden, A.; Saez-Rodriguez, J.; Vries, R. G. J.; Getz, G.; Wessels, L.; Stratton, M. R.; McDermott, U.; Meyerson, M.; Garnett, M. J.; Clevers, H. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* **2015**, *161* (4), 933–945. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.053.

(18) Meng, Q. Three-Dimensional Culture of Hepatocytes for Prediction of Drug-Induced Hepatotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, *6* (6), 733–746. https://doi.org/10.1517/17425251003674356.

(19) Abbasi, J. Patient-Derived Organoids Predict Cancer Treatment Response. *JAMA* **2018**, *319* (14), 1427. https://doi.org/10.1001/jama.2018.3760.

(20) *Induced Pluripotent Stem Cells: R&D Systems*. https://www.rndsystems.com/resources/articles/differentiation-potential-induced-pluripotent-stem-cells (accessed 2022-01-19).

(21) Meng, X.; Leslie, P.; Zhang, Y.; Dong, J. Stem Cells in a Three-Dimensional Scaffold Environment. *SpringerPlus* **2014**, *3* (1), 80. https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-80.

(22) Dutta, R. C.; Dutta, A. K. Cell-Interactive 3D-Scaffold; Advances and Applications. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27* (4), 334–339. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.02.002.

(23) Alsberg, E.; Anderson, K. W.; Albeiruti, A.; Franceschi, R.; Mooney, D. J. Cell-Interactive Alginate Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *J. Dent. Res.* **2001**, *80*, 2025–2029. https://doi.org/10.1177/00220345010800111501.

(24) Wang, X.; Sun, L.; Maffini, M. V.; Soto, A.; Sonnenschein, C.; Kaplan, D. L. A Complex 3D Human Tissue Culture System Based on Mammary Stromal Cells and Silk Scaffolds for Modeling Breast Morphogenesis and Function. *Biomaterials* **2010**, *31* (14), 3920–3929. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.118.

(25) Jeong, C. G.; Hollister, S. J. Mechanical, Permeability, and Degradation Properties of 3D Designed Poly(1,8 Octanediol-Co-Citrate) Scaffolds for Soft Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2010**, *93* (1), 141–149. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31568.

(26) Sell, S.; Wolfe, P.; Garg, K.; McCool, J.; Rodriguez, I.; Bowlin, G. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. *Polymers* **2010**, *2*, 522–553. https://doi.org/10.3390/polym2040522.

(27) Laplaca, M.; Vernekar, V.; Shoemaker, J.; Cullen, D. K.; Coulter, W. Three-Dimensional Neuronal Cultures. *Methods Bioeng. 3D Tissue Eng.* **2010**.

(28) Abbott, A. Cell Culture: Biology's New Dimension. *Nature* **2003**, *424* (6951), 870–872. https://doi.org/10.1038/424870a.

(29) Ulloa Severino, F. P.; Ban, J.; Song, Q.; Tang, M.; Bianconi, G.; Cheng, G.; Torre, V. The Role of Dimensionality in Neuronal Network Dynamics. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29640. https://doi.org/10.1038/srep29640.

(30) Magill, P. J.; Bolam, J. P.; Bevan, M. D. Relationship of Activity in the Subthalamic Nucleus–Globus Pallidus Network to Cortical Electroencephalogram. *J. Neurosci.* **2000**, *20* (2), 820–833. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00820.2000.

(31) Bourke, J. L.; Quigley, A. F.; Duchi, S.; O'Connell, C. D.; Crook, J. M.; Wallace, G. G.; Cook, M. J.; Kapsa, R. M. I. Three-Dimensional Neural Cultures Produce Networks That Mimic Native Brain Activity. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12* (2), 490–493. https://doi.org/10.1002/term.2508.

(32) Eiraku, M.; Takata, N.; Ishibashi, H.; Kawada, M.; Sakakura, E.; Okuda, S.; Sekiguchi, K.; Adachi, T.; Sasai, Y. Self-Organizing Optic-Cup Morphogenesis in Three-Dimensional Culture. *Nature* **2011**, *472* (7341), 51–56. https://doi.org/10.1038/nature09941.

(33) Ingber, D. E. Reverse Engineering Human Pathophysiology with Organs-on-Chips. *Cell* **2016**, *164* (6), 1105–1109. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.049.

(34) Bhatia, S. N.; Ingber, D. E. Microfluidic Organs-on-Chips. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32* (8), 760–772. https://doi.org/10.1038/nbt.2989.

(35) Meyvantsson, I.; Beebe, D. J. Cell Culture Models in Microfluidic Systems. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1* (1), 423–449. https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.113042.
(36) Wang, Y.; Gunasekara, D. B.; Reed, M. I.; DiSalvo, M.; Bultman, S. J.; Sims, C. E.; Magness, S. T.; Allbritton, N. L. A Microengineered Collagen Scaffold for Generating a Polarized Crypt-Villus Architecture of Human Small Intestinal Epithelium. *Biomaterials* **2017**, *128*, 44–55. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.005.
(37) Skardal, A.; Murphy, S. V.; Devarasetty, M.; Mead, I.; Kang, H.-W.; Seol, Y.-J.; Shrike Zhang, Y.; Shin, S.-R.; Zhao, L.; Aleman, J.; Hall, A. R.; Shupe, T. D.; Kleensang, A.; Dokmeci, M. R.; Jin Lee, S.; Jackson, J. D.; Yoo, J. J.; Hartung, T.; Khademhosseini, A.; Soker, S.; Bishop, C. E.; Atala, A. Multi-Tissue Interactions in an Integrated Three-Tissue Organ-on-a-Chip Platform. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 8837. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08879-x.
(38) Calandrini, C.; Schutgens, F.; Oka, R.; Margaritis, T.; Candelli, T.; Mathijsen, L.; Ammerlaan, C.; van Ineveld, R. L.; Derakhshan, S.; de Haan, S.; Dolman, E.; Lijnzaad, P.; Custers, L.; Begthel, H.; Kerstens, H. H. D.; Visser, L. L.; Rookmaaker, M.; Verhaar, M.; Tytgat, G. A. M.; Kemmeren, P.; de Krijger, R. R.; Al-Saadi, R.; Pritchard-Jones, K.; Kool, M.; Rios, A. C.; van den Heuvel-Eibrink, M. M.; Molenaar, J. J.; van Boxtel, R.; Holstege, F. C. P.; Clevers, H.; Drost, J. An Organoid Biobank for Childhood Kidney Cancers That Captures Disease and Tissue Heterogeneity. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1310. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15155-6.
(39) Herculano-Houzel, S. The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain. *Front. Hum. Neurosci.* **2009**, *3*. https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009.
(40) Ritz, R.; Sejnowski, T. J. Synchronous Oscillatory Activity in Sensory Systems: New Vistas on Mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1997**, *7* (4), 536–546. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80034-7.
(41) Barinaga, M. Listening In on the Brain. *Science* **1998**, *280* (5362), 376–378. https://doi.org/10.1126/science.280.5362.376.
(42) *Le message nerveux*. https://www.bioinformatics.org/oeil-couleur/dossier/nerveux.html (accessed 2022-01-17).
(43) Mukherjee, S.; Das, S. K.; Vaidyanathan, K.; Vasudevan, D. M. Consequences of Alcohol Consumption on Neurotransmitters -An Overview. *Curr. Neurovasc. Res.* **2008**, *5* (4), 266–272.
(44) Barone, P. Neurotransmission in Parkinson's Disease: Beyond Dopamine: Neurotransmission in Parkinson's Disease. *Eur. J. Neurol.* **2010**, *17* (3), 364–376. https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02900.x.
(45) Pistollato, F.; Ohayon, E. L.; Lam, A.; Langley, G. R.; Novak, T. J.; Pamies, D.; Perry, G.; Trushina, E.; Williams, R. S. B.; Roher, A. E.; Hartung, T.; Harnad, S.; Barnard, N.; Morris, M. C.; Lai, M.-C.; Merkley, R.; Chandrasekera, P. C. Alzheimer Disease Research in the 21 St Century: Past and Current Failures, New Perspectives and Funding Priorities. *Oncotarget* **2016**, *7* (26), 38999–39016. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9175.
(46) Lancaster, M. A.; Knoblich, J. A. Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. *Nat. Protoc.* **2014**, *9* (10), 2329–2340. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158.
(47) Di Lullo, E.; Kriegstein, A. R. The Use of Brain Organoids to Investigate Neural Development and Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2017**, *18* (10), 573–584. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.107.
(48) Paşca, S. P. The Rise of Three-Dimensional Human Brain Cultures. *Nature* **2018**, *553* (7689), 437–445. https://doi.org/10.1038/nature25032.
(49) Mariani, J.; Coppola, G.; Zhang, P.; Abyzov, A.; Provini, L.; Tomasini, L.; Amenduni, M.; Szekely, A.; Palejev, D.; Wilson, M.; Gerstein, M.; Grigorenko, E. L.; Chawarska, K.; Pelphrey, K. A.; Howe, J. R.; Vaccarino, F. M. FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* **2015**, *162* (2), 375–390. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.034.
(50) Raja, W. K.; Mungenast, A. E.; Lin, Y.-T.; Ko, T.; Abdurrob, F.; Seo, J.; Tsai, L.-H. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells

Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLOS ONE* **2016**, *11* (9), e0161969. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161969.

(51) Lee, C.-T.; Bendriem, R. M.; Wu, W. W.; Shen, R.-F. 3D Brain Organoids Derived from Pluripotent Stem Cells: Promising Experimental Models for Brain Development and Neurodegenerative Disorders. *J. Biomed. Sci.* **2017**, *24* (1), 59. https://doi.org/10.1186/s12929-017-0362-8.

(52) Yin, X.; Mead, B. E.; Safaee, H.; Langer, R.; Karp, J. M.; Levy, O. Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* **2016**, *18* (1), 25–38. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005.

(53) Pellegrini, L.; Bonfio, C.; Chadwick, J.; Begum, F.; Skehel, M.; Lancaster, M. A. Human CNS Barrier-Forming Organoids with Cerebrospinal Fluid Production. *Science* **2020**, *369* (6500). https://doi.org/10.1126/science.aaz5626.

(54) Song, E.; Zhang, C.; Israelow, B.; Lu-Culligan, A.; Prado, A. V.; Skriabine, S.; Lu, P.; Weizman, O.-E.; Liu, F.; Dai, Y.; Szigeti-Buck, K.; Yasumoto, Y.; Wang, G.; Castaldi, C.; Heltke, J.; Ng, E.; Wheeler, J.; Alfajaro, M. M.; Levavasseur, E.; Fontes, B.; Ravindra, N. G.; Van Dijk, D.; Mane, S.; Gunel, M.; Ring, A.; Kazmi, S. A. J.; Zhang, K.; Wilen, C. B.; Horvath, T. L.; Plu, I.; Haik, S.; Thomas, J.-L.; Louvi, A.; Farhadian, S. F.; Huttner, A.; Seilhean, D.; Renier, N.; Bilguvar, K.; Iwasaki, A. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in Human and Mouse BrainNeuroinvasion of SARS-CoV-2 in Humans and Mice. *J. Exp. Med.* **2021**, *218* (3). https://doi.org/10.1084/jem.20202135.

(55) Paşca, A. M.; Sloan, S. A.; Clarke, L. E.; Tian, Y.; Makinson, C. D.; Huber, N.; Kim, C. H.; Park, J.-Y.; O'Rourke, N. A.; Nguyen, K. D.; Smith, S. J.; Huguenard, J. R.; Geschwind, D. H.; Barres, B. A.; Paşca, S. P. Functional Cortical Neurons and Astrocytes from Human Pluripotent Stem Cells in 3D Culture. *Nat. Methods* **2015**, *12* (7), 671–678. https://doi.org/10.1038/nmeth.3415.

(56) McNulty, J. D.; Marti-Figueroa, C.; Seipel, F.; Plantz, J. Z.; Ellingham, T.; Duddleston, L. J. L.; Goris, S.; Cox, B. L.; Osswald, T. A.; Turng, L.-S.; Ashton, R. S. Micro-Injection Molded, Poly(Vinyl Alcohol)-Calcium Salt Templates for Precise Customization of 3D Hydrogel Internal Architecture. *Acta Biomater.* **2019**, *95*, 258–268. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.050.

(57) Karzbrun, E.; Kshirsagar, A.; Cohen, S. R.; Hanna, J. H.; Reiner, O. Human Brain Organoids on a Chip Reveal the Physics of Folding. *Nat. Phys.* **2018**, *14* (5), 515–522. https://doi.org/10.1038/s41567-018-0046-7.

(58) Pautot, S.; Wyart, C.; Isacoff, E. Y. Colloid-Guided Assembly of Oriented 3D Neuronal Networks. *Nat. Methods* **2008**, *5* (8), 735–740. https://doi.org/10.1038/NMETH.1236.

(59) Eiraku, M.; Watanabe, K.; Matsuo-Takasaki, M.; Kawada, M.; Yonemura, S.; Matsumura, M.; Wataya, T.; Nishiyama, A.; Muguruma, K.; Sasai, Y. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* **2008**, *3* (5), 519–532. https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.002.

(60) Kadoshima, T.; Sakaguchi, H.; Nakano, T.; Soen, M.; Ando, S.; Eiraku, M.; Sasai, Y. Self-Organization of Axial Polarity, inside-out Layer Pattern, and Species-Specific Progenitor Dynamics in Human ES Cell–Derived Neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (50), 20284–20289. https://doi.org/10.1073/pnas.1315710110.

(61) Haycock, J. W. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. In *3D Cell Culture*; Haycock, J. W., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; Vol. 695, pp 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_1.

(62) Lee, J.; Cuddihy, M. J.; Kotov, N. A. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2008**, *14* (1), 61–86. https://doi.org/10.1089/teb.2007.0150.

(63) Li, S.; Severino, F. P. U.; Ban, J.; Wang, L.; Pinato, G.; Torre, V.; Chen, Y. Improved Neuron Culture Using Scaffolds Made of Three-Dimensional PDMS Micro-Lattices. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **2018**, *13* (3), 034105. https://doi.org/10.1088/1748-605X/aaa777.

(64) Kim, S. H.; Im, S.-K.; Oh, S.-J.; Jeong, S.; Yoon, E.-S.; Lee, C. J.; Choi, N.; Hur, E.-M. Anisotropically Organized Three-Dimensional Culture Platform for Reconstruction of a Hippocampal Neural Network. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 14346. https://doi.org/10.1038/ncomms14346.

(65) Zhang, S.; Wan, Z.; D. Kamm, R. Vascularized Organoids on a Chip: Strategies for Engineering Organoids with Functional Vasculature. *Lab. Chip* **2021**, *21* (3), 473–488. https://doi.org/10.1039/D0LC01186J.

(66) Berger, E.; Magliaro, C.; Paczia, N.; Monzel, A. S.; Antony, P.; Linster, C. L.; Bolognin, S.; Ahluwalia, A.; Schwamborn, J. C. Millifluidic Culture Improves Human Midbrain Organoid Vitality and Differentiation. *Lab. Chip* **2018**, *18* (20), 3172–3183. https://doi.org/10.1039/C8LC00206A.

(67) Mansour, A. A.; Gonçalves, J. T.; Bloyd, C. W.; Li, H.; Fernandes, S.; Quang, D.; Johnston, S.; Parylak, S. L.; Jin, X.; Gage, F. H. An in Vivo Model of Functional and Vascularized Human Brain Organoids. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36* (5), 432–441. https://doi.org/10.1038/nbt.4127.

(68) Qian, X.; Nguyen, H. N.; Song, M. M.; Hadiono, C.; Ogden, S. C.; Hammack, C.; Yao, B.; Hamersky, G. R.; Jacob, F.; Zhong, C.; Yoon, K.; Jeang, W.; Lin, L.; Li, Y.; Thakor, J.; Berg, D. A.; Zhang, C.; Kang, E.; Chickering, M.; Nauen, D.; Ho, C.-Y.; Wen, Z.; Christian, K. M.; Shi, P.-Y.; Maher, B. J.; Wu, H.; Jin, P.; Tang, H.; Song, H.; Ming, G. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-Bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* **2016**, *165* (5), 1238–1254. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.032.

(69) Haring, A. P.; Sontheimer, H.; Johnson, B. N. Microphysiological Human Brain and Neural Systems-on-a-Chip: Potential Alternatives to Small Animal Models and Emerging Platforms for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Stem Cell Rev. Rep.* **2017**, *13* (3), 381–406. https://doi.org/10.1007/s12015-017-9738-0.

(70) Kilic, O.; Pamies, D.; Lavell, E.; Schiapparelli, P.; Feng, Y.; Hartung, T.; Bal-Price, A.; T. Hogberg, H.; Quinones-Hinojosa, A.; Guerrero-Cazares, H.; Levchenko, A. Brain-on-a-Chip Model Enables Analysis of Human Neuronal Differentiation and Chemotaxis. *Lab. Chip* **2016**, *16* (21), 4152–4162. https://doi.org/10.1039/C6LC00946H.

(71) Quadrato, G.; Nguyen, T.; Macosko, E. Z.; Sherwood, J. L.; Min Yang, S.; Berger, D. R.; Maria, N.; Scholvin, J.; Goldman, M.; Kinney, J. P.; Boyden, E. S.; Lichtman, J. W.; Williams, Z. M.; McCarroll, S. A.; Arlotta, P. Cell Diversity and Network Dynamics in Photosensitive Human Brain Organoids. *Nature* **2017**, *545* (7652), 48–53. https://doi.org/10.1038/nature22047.

(72) Trujillo, C. A.; Gao, R.; Negraes, P. D.; Gu, J.; Buchanan, J.; Preissl, S.; Wang, A.; Wu, W.; Haddad, G. G.; Chaim, I. A.; Domissy, A.; Vandenberghe, M.; Devor, A.; Yeo, G. W.; Voytek, B.; Muotri, A. R. Complex Oscillatory Waves Emerging from Cortical Organoids Model Early Human Brain Network Development. *Cell Stem Cell* **2019**, *0* (0). https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.002.

(73) Cugola, F. R.; Fernandes, I. R.; Russo, F. B.; Freitas, B. C.; Dias, J. L. M.; Guimarães, K. P.; Benazzato, C.; Almeida, N.; Pignatari, G. C.; Romero, S.; Polonio, C. M.; Cunha, I.; Freitas, C. L.; Brandão, W. N.; Rossato, C.; Andrade, D. G.; Faria, D. de P.; Garcez, A. T.; Buchpigel, C. A.; Braconi, C. T.; Mendes, E.; Sall, A. A.; Zanotto, P. M. de A.; Peron, J. P. S.; Muotri, A. R.; Beltrão-Braga, P. C. B. The Brazilian Zika Virus Strain Causes Birth Defects in Experimental Models. *Nature* **2016**, *534* (7606), 267–271. https://doi.org/10.1038/nature18296.

(74) Ye, F.; Kang, E.; Yu, C.; Qian, X.; Jacob, F.; Yu, C.; Mao, M.; Poon, R. Y. C.; Kim, J.; Song, H.; Ming, G.; Zhang, M. DISC1 Regulates Neurogenesis via Modulating Kinetochore Attachment of Ndel1/Nde1 during Mitosis. *Neuron* **2017**, *96* (5), 1041-1054.e5. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.010.

(75) Fatemi, S. H.; Reutiman, T. J.; Folsom, T. D.; Thuras, P. D. GABAA Receptor Downregulation in Brains of Subjects with Autism. *J. Autism Dev. Disord.* **2009**, *39* (2), 223–230. https://doi.org/10.1007/s10803-008-0646-7.

(76) Arber, C.; Lovejoy, C.; Wray, S. Stem Cell Models of Alzheimer's Disease: Progress and Challenges. *Alzheimers Res. Ther.* **2017**, *9* (1), 42. https://doi.org/10.1186/s13195-017-0268-4.

(77) Lancaster, M. A.; Corsini, N. S.; Wolfinger, S.; Gustafson, E. H.; Phillips, A. W.; Burkard, T. R.; Otani, T.; Livesey, F. J.; Knoblich, J. A. Guided Self-Organization and Cortical Plate

Formation in Human Brain Organoids. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (7), 659–666. https://doi.org/10.1038/nbt.3906.

(78) Bystron, I.; Blakemore, C.; Rakic, P. Development of the Human Cerebral Cortex: Boulder Committee Revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9* (2), 110–122. https://doi.org/10.1038/nrn2252.

(79) Dekkers, J. F.; Alieva, M.; Wellens, L. M.; Ariese, H. C. R.; Jamieson, P. R.; Vonk, A. M.; Amatngalim, G. D.; Hu, H.; Oost, K. C.; Snippert, H. J. G.; Beekman, J. M.; Wehrens, E. J.; Visvader, J. E.; Clevers, H.; Rios, A. C. High-Resolution 3D Imaging of Fixed and Cleared Organoids. *Nat. Protoc.* **2019**, *14* (6), 1756–1771. https://doi.org/10.1038/s41596-019-0160-8.

(80) Hernández-Cruz, A.; Sala, F.; Adams, P. Subcellular Ca2+ Transients Visualized by Confocal Microscopy in a Voltage-Clamped Vertebrate Neuron. *Science* **1990**, *247*, 858–862. https://doi.org/10.1126/science.2154851.

(81) Pamies, D.; Barrera, P.; Block, K.; Makri, G.; Kumar, A.; Wiersma, D.; Smirnova, L.; Zhang, C.; Bressler, J.; Christian, K. M.; Harris, G.; Ming, G.; Berlinicke, C. J.; Kyro, K.; Song, H.; Pardo, C. A.; Hartung, T.; Hogberg, H. T. A Human Brain Microphysiological System Derived from Induced Pluripotent Stem Cells to Study Neurological Diseases and Toxicity. *ALTEX* **2017**, *34* (3), 362–376. https://doi.org/10.14573/altex.1609122.

(82) Velasco, S.; Kedaigle, A. J.; Simmons, S. K.; Nash, A.; Rocha, M.; Quadrato, G.; Paulsen, B.; Nguyen, L.; Adiconis, X.; Regev, A.; Levin, J. Z.; Arlotta, P. Individual Brain Organoids Reproducibly Form Cell Diversity of the Human Cerebral Cortex. *Nature* **2019**, *570* (7762), 523–527. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1289-x.

(83) Gesteland, R. C.; Howland, B.; Lettvin, J. Y.; Pitts, W. H. Comments on Microelectrodes. *Proc. IRE* **1959**, *47* (11), 1856–1862. https://doi.org/10.1109/JRPROC.1959.287156.

(84) Terzuolo, C. A.; Araki, T. An Analysis of Intra- Versus Extracellular Potential Changes Associated with Activity of Single Spinal Motoneurons*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1961**, *94* (2), 547–558. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1961.tb35558.x.

(85) Verzeano, M.; Negishi, K. Neuronal Activity in Cortical and Thalamic Networks. *J. Gen. Physiol.* **1960**, *43* (6), 177–195. https://doi.org/10.1085/jgp.43.6.177.

(86) Grienberger, C.; Konnerth, A. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron* **2012**, *73* (5), 862–885. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011.

(87) Lancaster, M. A.; Renner, M.; Martin, C.-A.; Wenzel, D.; Bicknell, L. S.; Hurles, M. E.; Homfray, T.; Penninger, J. M.; Jackson, A. P.; Knoblich, J. A. Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly. *Nature* **2013**, *501* (7467), 373–379. https://doi.org/10.1038/nature12517.

(88) Hochbaum, D. R.; Zhao, Y.; Farhi, S. L.; Klapoetke, N.; Werley, C. A.; Kapoor, V.; Zou, P.; Kralj, J. M.; Maclaurin, D.; Smedemark-Margulies, N.; Saulnier, J. L.; Boulting, G. L.; Straub, C.; Cho, Y. K.; Melkonian, M.; Wong, G. K.-S.; Harrison, D. J.; Murthy, V. N.; Sabatini, B. L.; Boyden, E. S.; Campbell, R. E.; Cohen, A. E. All-Optical Electrophysiology in Mammalian Neurons Using Engineered Microbial Rhodopsins. *Nat. Methods* **2014**, *11* (8), 825–833. https://doi.org/10.1038/nmeth.3000.

(89) Li, R.; Sun, L.; Fang, A.; Li, P.; Wu, Q.; Wang, X. Recapitulating Cortical Development with Organoid Culture in Vitro and Modeling Abnormal Spindle-like (ASPM Related Primary) Microcephaly Disease. *Protein Cell* **2017**, *8* (11), 823–833. https://doi.org/10.1007/s13238-017-0479-2.

(90) Sigworth, F.; Klemic, K. Patch-Clamp Technologies for Ion Channel Research. **2007**. https://doi.org/10.1007/0-387-68919-2_17.

(91) Patch Clamp. *Wikipedia*; 2021.

(92) Giandomenico, S. L.; Mierau, S. B.; Gibbons, G. M.; Wenger, L. M. D.; Masullo, L.; Sit, T.; Sutcliffe, M.; Boulanger, J.; Tripodi, M.; Derivery, E.; Paulsen, O.; Lakatos, A.; Lancaster, M. A. Cerebral Organoids at the Air-Liquid Interface Generate Diverse Nerve Tracts with Functional Output. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22* (4), 669–679. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0350-2.

(93) Spira, M. E.; Hai, A. Multi-Electrode Array Technologies for Neuroscience and Cardiology. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8* (2), 83–94. https://doi.org/10.1038/nnano.2012.265.

(94) Wise, K. D.; Angell, J. B.; Starr, A. An Integrated-Circuit Approach to Extracellular Microelectrodes. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1970**, *BME-17* (3), 238–247. https://doi.org/10.1109/TBME.1970.4502738.
(95) Thomas, C.; Springer, P.; Loeb, G.; Berwaldnetter, Y.; Okun, L. A Miniature Microelectrode Array to Monitor the Bioelectric Activity of Cultured Cells. *Exp. Cell Res.* **1972**, *74* (1), 61–66. https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90481-8.
(96) Yuan, X.; Hierlemann, A.; Frey, U. Extracellular Recording of Entire Neural Networks Using a Dual-Mode Microelectrode Array With 19 584 Electrodes and High SNR. *IEEE J. Solid-State Circuits* **2021**, *56* (8), 2466–2475. https://doi.org/10.1109/JSSC.2021.3066043.
(97) Heuschkel, M. O.; Fejtl, M.; Raggenbass, M.; Bertrand, D.; Renaud, P. A Three-Dimensional Multi-Electrode Array for Multi-Site Stimulation and Recording in Acute Brain Slices. *J. Neurosci. Methods* **2002**, *114* (2), 135–148. https://doi.org/10.1016/S0165-0270(01)00514-3.
(98) Lecomte, A.; Degache, A.; Descamps, E.; Dahan, L.; Bergaud, C. In Vitro and in Vivo Biostability Assessment of Chronically-Implanted Parylene C Neural Sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *251*, 1001–1008. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.057.
(99) Miccoli, B.; Lopez, C. M.; Goikoetxea, E.; Putzeys, J.; Sekeri, M.; Krylychkina, O.; Chang, S.-W.; Firrincieli, A.; Andrei, A.; Reumers, V.; Braeken, D. High-Density Electrical Recording and Impedance Imaging With a Multi-Modal CMOS Multi-Electrode Array Chip. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*.
(100) Middya, S.; Curto, V. F.; Fernández-Villegas, A.; Robbins, M.; Gurke, J.; Moonen, E. J. M.; Kaminski Schierle, G. S.; Malliaras, G. G. Microelectrode Arrays for Simultaneous Electrophysiology and Advanced Optical Microscopy. *Adv. Sci.* **2021**, *8* (13), 2004434. https://doi.org/10.1002/advs.202004434.
(101) Rubehn, B.; Bosman, C.; Oostenveld, R.; Fries, P.; Stieglitz, T. A MEMS-Based Flexible Multichannel ECoG-Electrode Array. *J. Neural Eng.* **2009**, *6* (3), 036003. https://doi.org/10.1088/1741-2560/6/3/036003.
(102) Novellino, A.; Scelfo, B.; Palosaari, T.; Price, A.; Sobanski, T.; Shafer, T. J.; Johnstone, A. F. M.; Gross, G. W.; Gramowski, A.; Schroeder, O.; Jügelt, K.; Chiappalone, M.; Benfenati, F.; Martinoia, S.; Tedesco, M. T.; Defranchi, E.; D'Angelo, P.; Whelan, M. Development of Micro-Electrode Array Based Tests for Neurotoxicity: Assessment of Interlaboratory Reproducibility with Neuroactive Chemicals. *Front. Neuroengineering* **2011**, *0*. https://doi.org/10.3389/fneng.2011.00004.
(103) Obien, M. E. J.; Deligkaris, K.; Bullmann, T.; Bakkum, D. J.; Frey, U. Revealing Neuronal Function through Microelectrode Array Recordings. *Front. Neurosci.* **2015**, *0*. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00423.
(104) Yuan, X.; Schröter, M.; Obien, M. E. J.; Fiscella, M.; Gong, W.; Kikuchi, T.; Odawara, A.; Noji, S.; Suzuki, I.; Takahashi, J.; Hierlemann, A.; Frey, U. Versatile Live-Cell Activity Analysis Platform for Characterization of Neuronal Dynamics at Single-Cell and Network Level. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 4854. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18620-4.
(105) Gottschling, C.; Wegrzyn, D.; Denecke, B.; Faissner, A. Elimination of the Four Extracellular Matrix Molecules Tenascin-C, Tenascin-R, Brevican and Neurocan Alters the Ratio of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Sci. Rep.* **2019**, *9*. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50404-9.
(106) Gong, W.; Senčar, J.; Bakkum, D.; Jäckel, D.; Obien, M. E.; Radivojevic, M.; Hierlemann, A. Multiple Single-Unit Long-Term Tracking on Organotypic Hippocampal Slices Using High-Density Microelectrode Arrays. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00537.
(107) Frega, M.; Tedesco, M.; Massobrio, P.; Pesce, M.; Martinoia, S. Network Dynamics of 3D Engineered Neuronal Cultures: A New Experimental Model for in-Vitro Electrophysiology. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5489. https://doi.org/10.1038/srep05489.
(108) Soscia, D. A.; Lam, D.; Tooker, A. C.; Enright, H. A.; Triplett, M.; Karande, P.; Peters, S. K. G.; Sales, A. P.; Wheeler, E. K.; Fischer, N. O. A Flexible 3-Dimensional Microelectrode Array for in Vitro Brain Models. *Lab. Chip* **2020**, *20* (5), 901–911. https://doi.org/10.1039/C9LC01148J.

(109) Spanu, A.; Colistra, N.; Farisello, P.; Friz, A.; Arellano, N.; Rettner, C. T.; Bonfiglio, A.; Bozano, L.; Martinoia, S. A Three-Dimensional Micro-Electrode Array for *in-Vitro* Neuronal Interfacing. *J. Neural Eng.* **2020**, *17* (3), 036033. https://doi.org/10.1088/1741-2552/ab9844.

(110) Shin, H.; Jeong, S.; Lee, J.-H.; Sun, W.; Choi, N.; Cho, I.-J. 3D High-Density Microelectrode Array with Optical Stimulation and Drug Delivery for Investigating Neural Circuit Dynamics. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 492. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20763-3.

(111) Kim, H.; Kim, M. K.; Jang, H.; Kim, B.; Kim, D. R.; Lee, C. H. Sensor-Instrumented Scaffold Integrated with Microporous Spongelike Ultrabuoy for Long-Term 3D Mapping of Cellular Behaviors and Functions. *ACS Nano* **2019**, *13* (7), 7898–7904. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b02291.

(112) Tian, B.; Liu, J.; Dvir, T.; Jin, L.; Tsui, J. H.; Qing, Q.; Suo, Z.; Langer, R.; Kohane, D. S.; Lieber, C. M. Macroporous Nanowire Nanoelectronic Scaffolds for Synthetic Tissues. *Nat. Mater.* **2012**, *11* (11), 986–994. https://doi.org/10.1038/nmat3404.

(113) Song, E.; Li, J.; Won, S. M.; Bai, W.; Rogers, J. A. Materials for Flexible Bioelectronic Systems as Chronic Neural Interfaces. *Nat. Mater.* **2020**, *19* (6), 590–603. https://doi.org/10.1038/s41563-020-0679-7.

(114) Park, Y.; Franz, C. K.; Ryu, H.; Luan, H.; Cotton, K. Y.; Kim, J. U.; Chung, T. S.; Zhao, S.; Vazquez-Guardado, A.; Yang, D. S.; Li, K.; Avila, R.; Phillips, J. K.; Quezada, M. J.; Jang, H.; Kwak, S. S.; Won, S. M.; Kwon, K.; Jeong, H.; Bandodkar, A. J.; Han, M.; Zhao, H.; Osher, G. R.; Wang, H.; Lee, K.; Zhang, Y.; Huang, Y.; Finan, J. D.; Rogers, J. A. Three-Dimensional, Multifunctional Neural Interfaces for Cortical Spheroids and Engineered Assembloids. *Sci. Adv.* **2021**. https://doi.org/10.1126/sciadv.abf9153.

(115) Passaro, A. P.; Stice, S. L. Electrophysiological Analysis of Brain Organoids: Current Approaches and Advancements. *Front. Neurosci.* **2021**, *0*. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.622137.

(116) Regalia, G.; Coelli, S.; Biffi, E.; Ferrigno, G.; Pedrocchi, A. A Framework for the Comparative Assessment of Neuronal Spike Sorting Algorithms towards More Accurate Off-Line and On-Line Microelectrode Arrays Data Analysis. *Comput. Intell. Neurosci.* **2016**, *2016*, 1–19. https://doi.org/10.1155/2016/8416237.

(117) Coluccio, M. L.; Perozziello, G.; Malara, N.; Parrotta, E.; Zhang, P.; Gentile, F.; Limongi, T.; Raj, P. M.; Cuda, G.; Candeloro, P.; Di Fabrizio, E. Microfluidic Platforms for Cell Cultures and Investigations. *Microelectron. Eng.* **2019**, *208*, 14–28. https://doi.org/10.1016/j.mee.2019.01.004.

(118) Vives, J.; Batlle-Morera, L. The Challenge of Developing Human 3D Organoids into Medicines. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11* (1), 72. https://doi.org/10.1186/s13287-020-1586-1.

(119) Eklund, S. E.; Snider, R. M.; Wikswo, J.; Baudenbacher, F.; Prokop, A.; Cliffel, D. E. Multianalyte Microphysiometry as a Tool in Metabolomics and Systems Biology. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *587* (2), 333–339. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.11.024.

(120) Vollmer, A. P.; Probstein, R. F.; Gilbert, R.; Thorsen, T. Development of an Integrated Microfluidic Platform for Dynamic Oxygen Sensing and Delivery in a Flowing Medium. *Lab. Chip* **2005**, *5* (10), 1059–1066. https://doi.org/10.1039/B508097E.

(121) Weltin, A.; Slotwinski, K.; Kieninger, J.; Moser, I.; Jobst, G.; Wego, M.; Ehret, R.; Urban, G. A. Cell Culture Monitoring for Drug Screening and Cancer Research: A Transparent, Microfluidic, Multi-Sensor Microsystem. *Lab Chip* **2014**, *14* (1), 138–146. https://doi.org/10.1039/C3LC50759A.

(122) Ungerböck, B.; Charwat, V.; Ertl, P.; Mayr, T. Microfluidic Oxygen Imaging Using Integrated Optical Sensor Layers and a Color Camera. *Lab. Chip* **2013**, *13* (8), 1593–1601. https://doi.org/10.1039/C3LC41315B.

(123) Zhan, W.; Seong, G. H.; Crooks, R. M. Hydrogel-Based Microreactors as a Functional Component of Microfluidic Systems. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (18), 4647–4652. https://doi.org/10.1021/ac020340y.

(124) Cheng, Y.; Xiong, P.; Yun, C. S.; Strouse, G. F.; Zheng, J. P.; Yang, R. S.; Wang, Z. L. Mechanism and Optimization of PH Sensing Using SnO2 Nanobelt Field Effect Transistors. *Nano Lett.* **2008**, *8* (12), 4179–4184. https://doi.org/10.1021/nl801696b.

(125) Wu, C.-C.; Lin, W.-C.; Fu, S.-Y. The Open Container-Used Microfluidic Chip Using IrOx Ultramicroelectrodes for the in Situ Measurement of Extracellular Acidification. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (10), 4191–4197. https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.04.034.
(126) Marzouk, S. A. M.; Ufer, S.; Buck, R. P.; Johnson, T. A.; Dunlap, L. A.; Cascio, W. E. Electrodeposited Iridium Oxide PH Electrode for Measurement of Extracellular Myocardial Acidosis during Acute Ischemia. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (23), 5054–5061. https://doi.org/10.1021/ac980608e.
(127) Kimmel, D. W.; Dole, W. P.; Cliffel, D. E. Application of Multianalyte Microphysiometry to Characterize Macrophage Metabolic Responses to Oxidized LDL and Effects of an ApoA-1 Mimetic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *431* (2), 181–185. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.140.
(128) Lima, E. A.; Snider, R. M.; Reiserer, R. S.; McKenzie, J. R.; Kimmel, D. W.; Eklund, S. E.; Wikswo, J. P.; Cliffel, D. E. Multichamber Multipotentiostat System for Cellular Microphysiometry. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *204*, 536–543. https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.07.126.
(129) Mestres, P.; Morguet, A. The Bionas Technology for Anticancer Drug Screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **2009**, *4* (7), 785–797. https://doi.org/10.1517/17460440903018840.
(130) Olthuis, W.; Robben, M. A. M.; Bergveld, P.; Bos, M.; van der Linden, W. E. PH Sensor Properties of Electrochemically Grown Iridium Oxide. *Sens. Actuators B Chem.* **1990**, *2* (4), 247–256. https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80150-X.
(131) Hafner, F. Cytosensor Microphysiometer: Technology and Recent Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15* (3–4), 149–158. https://doi.org/10.1016/s0956-5663(00)00069-5.
(132) Hiruta, Y.; Ando, Y.; Citterio, D.; Suzuki, K. A Fast-Response PH Optode Based on a Fluoroionophore Immobilized to a Mesoporous Silica Thin Film. *Anal. Sci.* **2010**, *26* (3), 297–301. https://doi.org/10.2116/analsci.26.297.
(133) Wencel, D.; MacCraith, B. D.; McDonagh, C. High Performance Optical Ratiometric Sol–Gel-Based PH Sensor. *Sens. Actuators B Chem.* **2009**, *139* (1), 208–213. https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.12.066.
(134) Wu, C.-C.; Luk, H.-N.; Lin, Y.-T. T.; Yuan, C.-Y. A Clark-Type Oxygen Chip for in Situ Estimation of the Respiratory Activity of Adhering Cells. *Talanta* **2010**, *81* (1), 228–234. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.062.
(135) Sud, D.; Mehta, G.; Mehta, K.; Linderman, J.; Takayama, S.; Mycek, M.-A. Optical Imaging in Microfluidic Bioreactors Enables Oxygen Monitoring for Continuous Cell Culture. *J. Biomed. Opt.* **2006**, *11* (5), 050504. https://doi.org/10.1117/1.2355665.
(136) Weltin, A.; Hammer, S.; Noor, F.; Kaminski, Y.; Kieninger, J.; Urban, G. A. Accessing 3D Microtissue Metabolism: Lactate and Oxygen Monitoring in Hepatocyte Spheroids. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 941–948. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.094.
(137) Zheng, X. T.; Yang, H. B.; Li, C. M. Optical Detection of Single Cell Lactate Release for Cancer Metabolic Analysis. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (12), 5082–5087. https://doi.org/10.1021/ac100074n.
(138) Ben-Amor, S.; Vanhove, E.; Sékli Belaïdi, F.; Charlot, S.; Colin, D.; Rigoulet, M.; Devin, A.; Sojic, N.; Launay, J.; Temple-Boyer, P.; Arbault, S. Enhanced Detection of Hydrogen Peroxide with Platinized Microelectrode Arrays for Analyses of Mitochondria Activities. *Electrochimica Acta* **2014**, *126*, 171–178. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.11.104.
(139) Funfak, A.; Cao, J.; Wolfbeis, O. S.; Martin, K.; Köhler, J. M. Monitoring Cell Cultivation in Microfluidic Segments by Optical PH Sensing with a Micro Flow-through Fluorometer Using Dye-Doped Polymer Particles. *Microchim. Acta* **2009**, *164* (3), 279–286. https://doi.org/10.1007/s00604-008-0096-0.
(140) Fragoso, A.; Latta, D.; Laboria, N.; Germar, F. von; Hansen-Hagge, T. E.; Kemmner, W.; Gärtner, C.; Klemm, R.; Drese, K. S.; O'Sullivan, C. K. Integrated Microfluidic Platform for the Electrochemical Detection of Breast Cancer Markers in Patient Serum Samples. *Lab. Chip* **2011**, *11* (4), 625–631. https://doi.org/10.1039/C0LC00398K.
(141) Demchenko, A. P. Photobleaching of Organic Fluorophores: Quantitative Characterization, Mechanisms, Protection. *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8* (2), 022001. https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7365.

(142) Uttara, B.; Singh, A. V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, *7* (1), 65–74. https://doi.org/10.2174/157015909787602823.
(143) Ges, I.; Ivanov, B.; Schaffer, D.; Lima, E.; Werdich, A.; Baudenbacher, F. Thin-Film IrO PH Microelectrode for Microfluidic-Based Microsystems. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21* (2), 248–256. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.09.021.
(144) Nasr, B.; Chatterton, R.; Yong, J. H. M.; Jamshidi, P.; D'Abaco, G. M.; Bjorksten, A. R.; Kavehei, O.; Chana, G.; Dottori, M.; Skafidas, E. Self-Organized Nanostructure Modified Microelectrode for Sensitive Electrochemical Glutamate Detection in Stem Cells-Derived Brain Organoids. *Biosensors* **2018**, *8* (1), 14. https://doi.org/10.3390/bios8010014.
(145) Florou, A.; Prodromidis, M.; Karayannis, M.; Tzouwara-karayanni, S. Flow Electrochemical Determination of Ascorbic Acid in Real Samples Using a Glassy Carbon Electrode Modified with a Cellulose Acetate Film Bearing 2,6-Dichlorophenolindophenol. **2000**. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00709-1.
(146) Fog, A.; Buck, R. P. Electronic Semiconducting Oxides as PH Sensors. *Sens. Actuators* **1984**, *5* (2), 137–146. https://doi.org/10.1016/0250-6874(84)80004-9.
(147) Głab, S.; Hulanicki, A.; Edwall, G.; Ingman, F. Metal-Metal Oxide and Metal Oxide Electrodes as PH Sensors. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1989**, *21* (1), 29–47. https://doi.org/10.1080/10408348908048815.
(148) Ges, I. A.; Dzhura, I. A.; Baudenbacher, F. J. On-Chip Acidification Rate Measurements from Single Cardiac Cells Confined in Sub-Nanoliter Volumes. *Biomed. Microdevices* **2008**, *10* (3), 347–354. https://doi.org/10.1007/s10544-007-9142-7.
(149) Bitziou, E.; O'Hare, D.; Patel, B. A. Spatial Changes in Acid Secretion from Isolated Stomach Tissue Using a PH-Histamine Sensing Microarray. *The Analyst* **2010**, *135* (3), 482. https://doi.org/10.1039/b921296e.
(150) Castagnola, V. Implantable Microelectrodes on Soft Substrate with Nanostructured Active Surface for Stimulation and Recording of Brain Activities. These de doctorat, Toulouse 3, 2014.
(151) Lecomte, A. Conception and Characterization of Flexible Microelectrodes for Implantable Neuroprosthetic Development. 161.
(152) Saunier, V. Microélectrodes nanocomposites implantables couplant enregistrement/stimulation neurale et détection électrochimique de neurotransmetteurs. phdthesis, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2021.
(153) Pavlovich, M. *How to build a better organ-on-a-chip*. http://crosstalk.cell.com/blog/how-to-build-a-better-organ-on-a-chip (accessed 2021-07-23).
(154) Kinlen, P. J.; Heider, J. E.; Hubbard, D. E. A Solid-State PH Sensor Based on a Nafion-Coated Iridium Oxide Indicator Electrode and a Polymer-Based Silver Chloride Reference Electrode. *Sens. Actuators B Chem.* **1994**, *22* (1), 13–25. https://doi.org/10.1016/0925-4005(94)01254-7.
(155) Elsen, H. A.; Monson, C. F.; Majda, M. Effects of Electrodeposition Conditions and Protocol on the Properties of Iridium Oxide PH Sensor Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **2009**, *156* (1), F1. https://doi.org/10.1149/1.3001924.
(156) *Optical Sensor Technology*. https://www.presens.de/ (accessed 2022-04-05).
(157) Jang, H.; Lee, J. Iridium Oxide Fabrication and Application: A Review. *J. Energy Chem.* **2020**, *46*, 152–172. https://doi.org/10.1016/j.jechem.2019.10.026.
(158) da Silva, G. C.; Perini, N.; Ticianelli, E. A. Effect of Temperature on the Activities and Stabilities of Hydrothermally Prepared IrOx Nanocatalyst Layers for the Oxygen Evolution Reaction. *Appl. Catal. B Environ.* **2017**, *218*, 287–297. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.06.044.
(159) Geiger, S.; Kasian, O.; Shrestha, B. R.; Mingers, A. M.; Mayrhofer, K. J. J.; Cherevko, S. Activity and Stability of Electrochemically and Thermally Treated Iridium for the Oxygen Evolution Reaction. *J. Electrochem. Soc.* **2016**, *163* (11), F3132–F3138. https://doi.org/10.1149/2.0181611jes.

Chapitre 2

Fabrication de micro-dispositifs d'enregistrement tridimensionnels

2 CHAPITRE. 2 FABRICATION DE MICRO-DISPOSITIFS D'ENREGISTREMENT TRIDIMENSIONNELS

Dans ce chapitre, nous discuterons sur les procédés de microfabrication de la Micro Electrode Array (MEA) et de l'implant flexible qui constitueront le micro-dispositif final en vue des mesures électrophysiologiques de l'organoïde cérébral. Seront ensuite abordés les processus de connexion et de couplage de ces deux dispositifs.

2.1 CONCEPT ET MODELE DU MICRO-DISPOSITIF

Grâce au développement des techniques de microfabrication, la conception des MEA a beaucoup évolué ces quarante dernières années. Les MEAs sont aujourd'hui fabriquées de manière reproductible et s'utilisent aisément avec la plupart des matériaux biologiques. Grâce au grand nombre d'électrodes qu'elles peuvent contenir sur une faible surface, les MEAs permettent d'obtenir des informations précises sur l'activité électrophysiologique d'une culture cellulaire neuronale ou cardiaque avec une très bonne résolution spatio-temporelle[1]. Par ailleurs, les tailles micrométriques des électrodes permettent d'effectuer des mesures électrophysiologiques à l'échelle d'une seule cellule, ce qui rend possible une analyse qualitative des potentiels d'action enregistrés.

Comme évoqué dans le chapitre 1, les MEAs planaires sont des outils utiles pour le suivi fonctionnel des cultures neuronales 2D et 3D[2]. Les mesures extracellulaires s'effectuent de manière non invasive[3] *in vitro* et sur le long terme[4]. Dans les cultures neuronales, les MEAs servent également de support technologique pour évaluer des traitements pharmacologiques[5], comme par exemple dans le cas de l'épilepsie où des traitements précliniques ont pu être modélisés grâce à des cultures neuronales issus de cellules souches humaines sur MEA[6]. Néanmoins, les MEAs planaires présentent des limites de détection dans les cultures 3D. A cause de l'épaisseur du tissu de l'organoïde, les signaux électriques émanant de cellules neuronales éloignées des électrodes sont bruités. Par conséquent, des cellules neuronales peuplant des couches profondes des cultures restent inaccessibles[7], cela contribue à la perte d'informations du réseau neuronal. C'est pourquoi le développement de MEA 3D est un enjeu majeur pour les études fonctionnelles du développement neuronal des cultures 3D.
En tirant profit de notre forte expertise technologique concernant la fabrication d'implants flexibles en polymère[8,9] et de MEA sur verre[10] au sein de l'équipe MEMS, nous avons décidé d'intégrer ces deux systèmes afin de concevoir un micro-dispositif 3D permettant le suivi d'une culture neuronale 3D (Figure II. 1). Ainsi il est possible de suivre l'activité électrophysiologique de l'organoïde dans le plan XY avec la MEA et dans le plan Z avec l'implant. Ayant au cours des précédentes thèses[8–10] déjà développé des prototypes MEA et implants, nous intégrerons leurs procédés de microfabrication pour convenir à une intégration du micro-dispositif pour un suivi électrophysiologique 3D. Dans une première partie nous discuterons des procédés de fabrication des dispositifs MEA et implant. Puis dans un second temps nous discuterons du système d'intégration des deux micro-dispositifs.

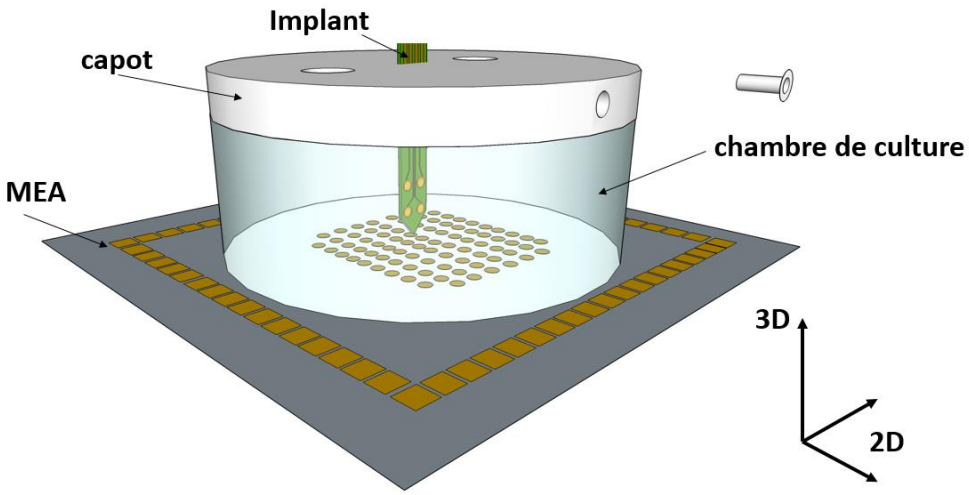


Figure II. 1: Couplage des micro-dispositifs MEA et implant pour le suivi électrophysiologique 3D d'une culture d'organoïde cérébrale. Les mesures électrophysiologiques de la culture sont enregistrées avec les 60 microélectrodes de la MEA (plan XY) et avec les 4 microélectrodes de l'implant (plan Z).

2.2 MICROFABRICATION DU MICRO-DISPOSITIF MEA-IMPLANT

2.2.1 Procédés de fabrication d'une Micro Electrode Array (MEA)

Les MEAs sont des plateformes qui peuvent accueillir dans leurs chambres une culture cellulaire *in vitro* pour mesurer des potentiels d'actions de cellules neuronales ou cardiaques. Elles sont constituées d'un réseau de microélectrodes étalé sur quelques mm^2. Nous décrirons dans cette partie les principales étapes de fabrication du réseau et de la mise en place de la chambre de culture.

Nous utilisons un support en verre pour fabriquer le réseau d'électrodes. Un nombre de 56 microélectrodes d'or au diamètre de 20µm avec une largeur des pistes de 10µm sont fabriquées. La distance inter-électrode est de 200µm et sont pour chacune d'elles connectées à un pad situé aux bords de la MEA, ces pads servent d'interface entre les électrodes et la plateforme d'acquisition (Figure II. 2).

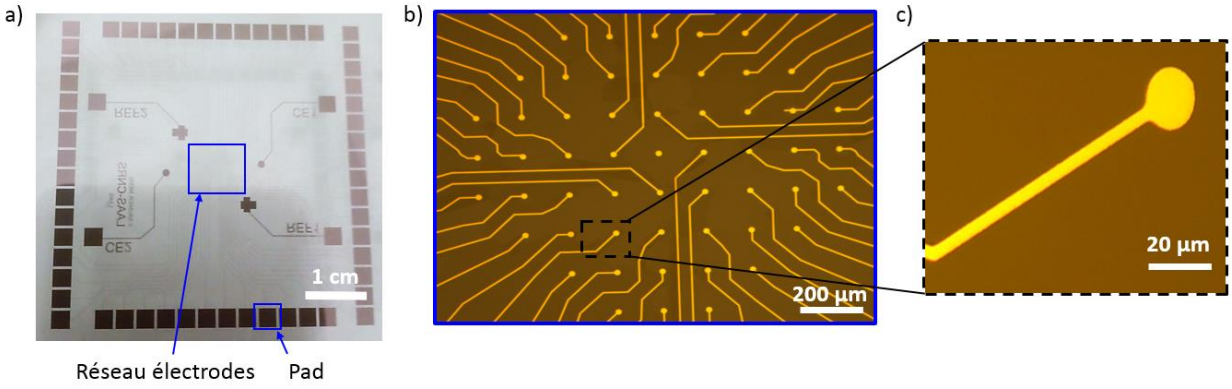


Figure II. 2: (a) Image du dispositif MEA microfabriqué sur verre avec au centre le réseau d'électrodes et aux extrémités les connectiques (pad). (b) Observation au microscope optique sur la zone du réseau d'électrodes. (c) Image agrandis d'une microélectrode (d=20µm).

2.2.1.1 Etapes de fabrication

La microfabrication des MEAs se caractérise par trois principales étapes (Figure II.3). Dans un premier temps, la structuration du réseau d'électrodes et des connectiques (pad) seront dessinés à l'aide d'une première photolithographie. Dans un deuxième temps, une seconde photolithographie est réalisée dans le but de passiver les pistes métalliques et de laisser ouvert les électrodes et les pads. Pour terminer, une découpe de la MEA est réalisée pour être raccordée au système d'acquisition fournit par l'instrument Multi Channel System (MCS).

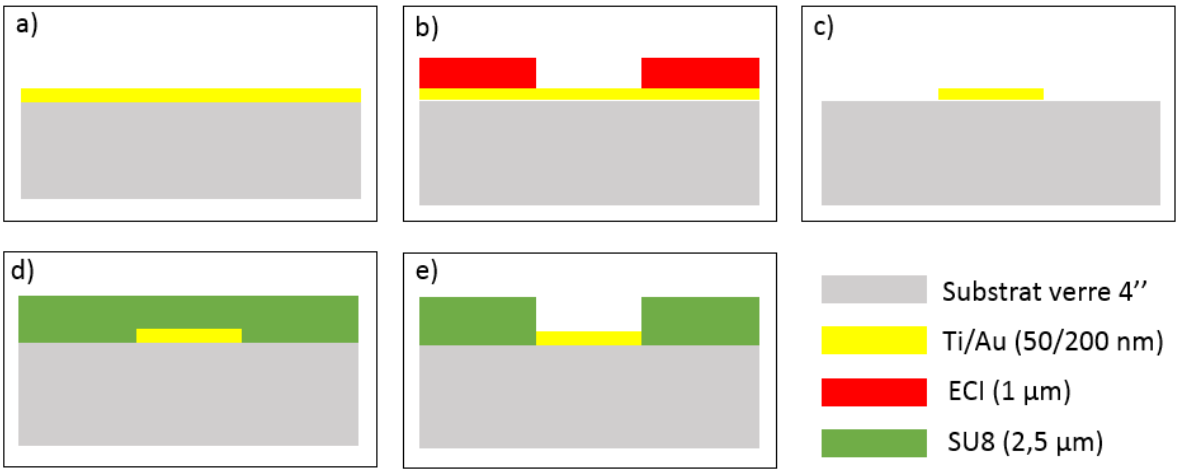


Figure II. 3: Etapes de microfabrication de la MEA: (a) dépôt par PVD d'une bicouche Ti/Au (50/200nm), (b) première étape de photolithographie pour le dessin des motifs avec dépôt d'une résine ECI (1µm d'épaisseur), (c) développement de la résine et gravure chimique de Ti/Au. (d) Deuxième étape de photolithographie pour la passivation de la MEA, (e) ouverture des contacts (électrodes et pads) avec développement de la résine.

Dans un premier temps, un dépôt physique par phase vapeur (PVD) d'une bicouche Ti/Au (50/200nm) est effectué sur un substrat en verre 4 pouces (AF32) (Figure II. 3. a). Ensuite pour structurer les motifs sur le substrat, une photolithographie est réalisée avec l'application d'une résine positive ECI d'épaisseur 1 µm, celle-ci est ensuite insolée avec une puissance de 175 mJ/cm^2 (Süss Microtec) (Figure II. 3. b). Une fois la résine développée au MFCD26, on vérifie au microscope optique que les motifs sont bien dessinés et au profilomètre que les épaisseurs

soient en accord avec l'épaisseur voulue. Les mesures d'épaisseurs sont en moyennes de 1,1± 0,05 µm. Par la suite, une gravure chimique est effectuée dans le but de garder uniquement l'or sur les motifs. Pour ce faire, nous plongeons le substrat dans une solution d'iodure de potassium (KI) pendant 2 minutes pour retirer l'or et dans une solution d'acide fluorhydrique (HF, 5%) pendant quelques secondes pour retirer la couche d'accroche en titane (Figure II. 3. c). Une fois la gravure terminée, nous enlevons la résine ECI présente encore sur les motifs dans un bain d'acétone pendant 2 minutes, puis nous rinçons le substrat à l'eau DI.

Une dernière étape de photolithographie est effectuée pour passiver la MEA avec une résine photosensible négative. Nous avons utilisé la SU8 3005, qui est chimiquement stable et biocompatible, elle est insolée à une puissance de 130 mW/cm^2 (Süss Microtec) (Figure II. 3. d). Cette SU-8, stockée à basse température (4°C), est déposée à 20°C par spin-coating sur le substrat. La SU-8 est ensuite recuite par un « soft-bake » à 95°C pendant 60s, ceci pour évaporer les solvants de la SU-8. Ces conditions de dépôt aboutissent à une épaisseur de couche finale de 2,2± 0,3 µm. Ensuite nous ouvrons les zones de contacts électriques, c'est-à-dire les électrodes et les pads avec l'aide d'un développeur (SU8 developer) pendant 4min (Figure II. 3. e). La dernière étape consiste à réaliser le recuit final « hard-bake » de la couche à 125°C pendant 60 sec en procédant à une montée en température progressive. Ce recuit permet de finaliser la réticulation de la SU-8 et de mieux la stabiliser mécaniquement. A l'aide du microscope à électronique au balayage (MEB), nous observons l'état de surface des microélectrodes d'or pour vérifier si les ouvertures ont bien été réalisées et si elles ne présentent pas de résidus organiques à leurs surfaces. Sur la Figure II. 4, nous pouvons observer que des résidus organiques semblent s'être déposés à la surface de l'électrode bien que la MEA ait été nettoyée plusieurs fois à l'acétone et à l'eau DI. C'est pourquoi, nous verrons par la suite qu'un nettoyage localisé par voie électrochimique peut être utile pour atteindre des zones micrométriques. Toutes les étapes du processus sont décrites en Annexe.

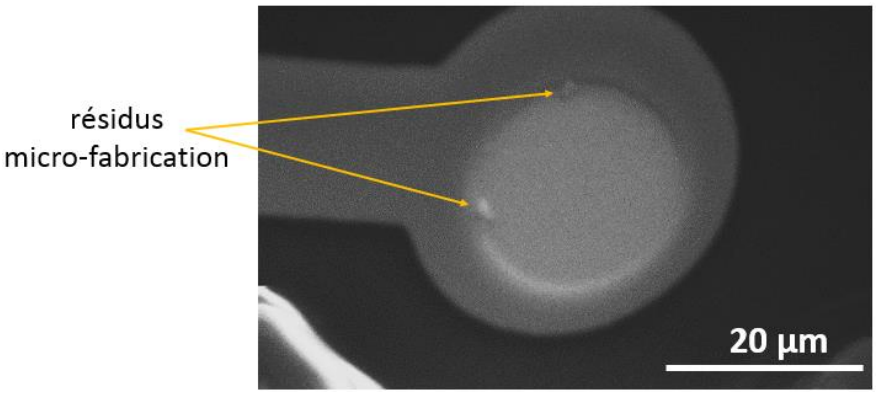


Figure II. 4: Observation au MEB d'une microélectrode d'or après le développement de la résine SU8.

2.2.1.2 Découpe et conditionnement de la MEA

La microfabrication de la MEA se termine par sa découpe au laser afin qu'elle puisse être encastrée dans un boîtier pour les mesures électriques (Figure II. 5). Pour cela, à la surface de la MEA est déposée une résine de découpe pour la protéger des débris de verre générés lors de la découpe. Une fois découpée, la résine est retirée de la surface MEA avec une solution d'acétone puis rincée à l'eau DI. La MEA finale produite regroupe un nombre de 56 microélectrodes, présentant un diamètre équivalent de 20µm.

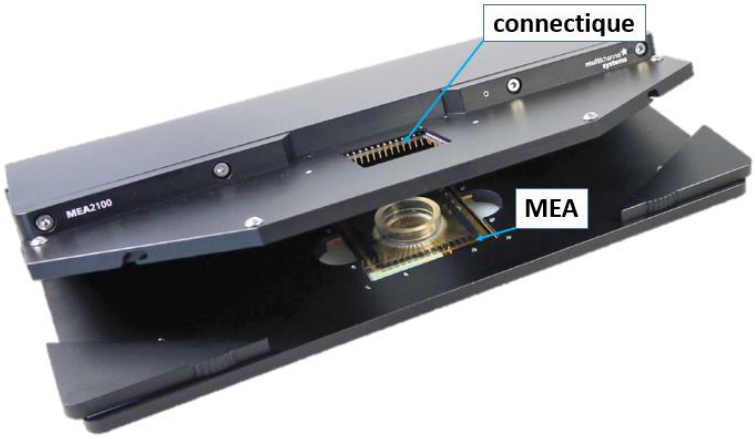


Figure II. 5: Plateforme d'acquisition des mesures électriques de la MEA.

Pour être opérationnelle, un anneau en verre de 2,2 cm de diamètre est fixé au centre de la MEA avec l'aide d'un polymère : le Polydiméthylsiloxane (PDMS) (Figure II. 6). Le PDMS est un polymère flexible très utilisé pour la fabrication et le prototypage de puces microfluidiques. Le PDMS obtenu grâce à un agent réticulant développe des liaisons siloxanes (Figure II. 6. a-b) qui vont permettre de lier l'anneau en verre à la surface de la MEA.

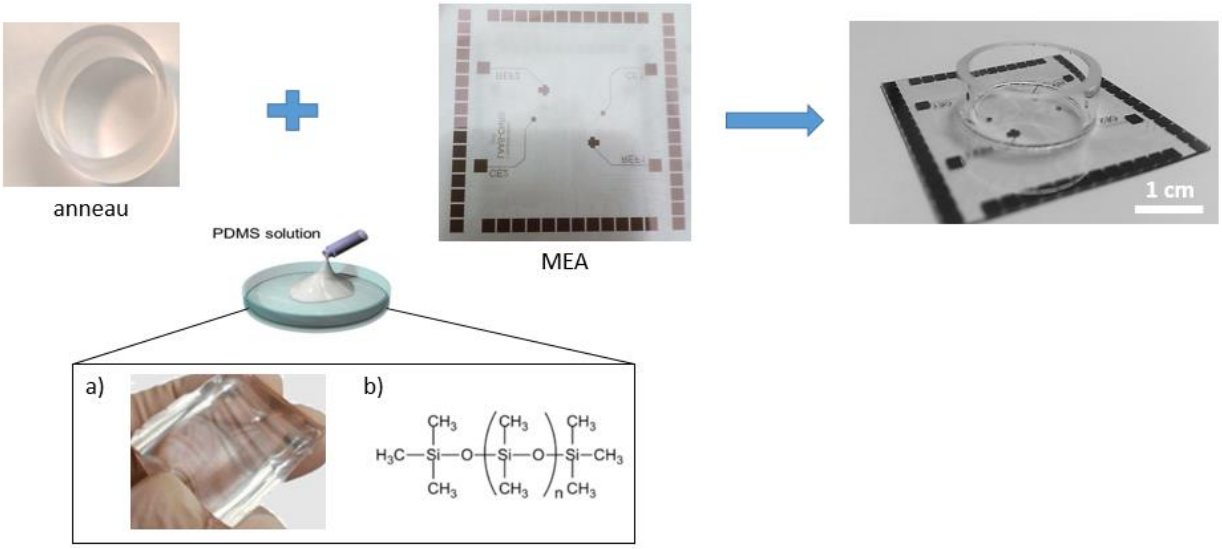


Figure II. 6: Fixation de l'anneau à la surface de la MEA avec l'aide du PDMS : (a) polymère flexible et (b) constitué d'une chaîne de siloxanes.

2.2.2 Procédés de fabrication de l'Implant

2.2.2.1 Choix du matériau

Contrairement à l'électronique traditionnelle à base de silicium, les polymères à couche mince sont flexibles, ce qui est avantageux pour des dispositifs bioélectroniques ciblant les tissus mous et mobiles pour diverses applications, telles que : la surveillance de l'activité électrique des muscles, la mesure des impulsions nerveuses[11], la stimulation cardiaque[12], la stimulation cérébrale[13], la stimulation cochléaire[14]. Pour de telles applications, la flexibilité est nécessaire pour maintenir un bon contact et éviter d'endommager les tissus. Les polymères à couche mince utilisent la photolithographie et d'autres technologies empruntées à l'industrie des semi-conducteurs pour modéliser des électrodes ou d'autres capteurs ou structures sur les surfaces de matériaux tels que le Parylène[15], le polyimide[16], ou le polydiméthylsiloxane[17]. Étant donné que les dispositifs en polymère à couche mince sont basés sur la technologie de microfabrication utilisée pour fabriquer des transistors, ils ont alors une résolution à l'échelle du micron ou supérieure et permettent l'intégration directe de capteurs tels que les transistors[18] ou des capteurs électrochimiques[19].

Un des matériaux les plus utilisés comme polymère à couche mince pour des applications biologiques c'est poly- (para-xylylène) ou son nom commercial le « Parylène C ». Le Parylène est de structure semi-cristalline et aux propriétés hydrophobes, il peut être déposé sous forme de film mince, par dépôt chimique en phase vapeur (CVD). Il est constitué d'un cycle d'hydrocarbure aromatique qui lui permet d'avoir une bonne stabilité thermique et une bonne tenue aux éléments corrosifs. Il existe plusieurs types de Parylène dont leurs différences résident sur leurs structures aromatiques leurs définissant ainsi des propriétés chimiques, mécaniques et électriques propres. Le Parylène C dont sa structure aromatique est composée d'un chlore

(Figure II. 17), procure au polymère : d'une chimie stable, d'une résistance mécanique dont son module de Young est de 2,8 GPa[20], d'une transparence optique et d'une flexibilité[21,22]. Il est également certifié par la pharmacopée américaine comme le polymère le plus biocompatible et qualifié comme ISO 10993.

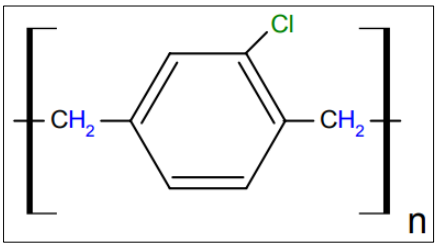


Figure II. 7: Structure chimique du monomère Parylène-C.

Le Parylène C flexible et de quelques micromètres d'épaisseur peut intégrer des microcapteurs électrochimiques comme : des électrodes PEDOT :PSS pour la mesure électrophysiologique d'une activité neuronale d'un cerveau[23] ou comme des électrodes de platine pour la détection de glucose/oxygène d'une culture *in vitro* de neurones[24].

Par ailleurs, au cours des précédentes thèses[8,9], des expériences dédiées aux mesures électrophysiologiques d'un cerveau d'une souris ont été réalisées à l'aide d'un implant flexible en Parylène. Les expériences ont montré des mesures électrophysiologiques assurées sur le long terme, soit six mois de mesures[25]. C'est pourquoi, nous avons choisi le Parylène comme sonde support pour les mesures électrophysiologiques 3D de l'organoïde cérébral. Les implants flexibles microfabriqués au LAAS intègrent quatre microélectrodes encapsulées par deux couches de Parylène. Le Parylène est déposé en trois étapes utilisant un procédé de dépôt en phase vapeur (Comelec C-30-S). Au cours de ce processus, les molécules de Parylène se déposent sur des substrats de silicium préalablement disposés dans une chambre à vide. L'épaisseur du dépôt du Parylène peut être contrôlée suivant la quantité de dimère introduite dans la chambre.

2.2.2.2 Etapes de fabrication

Dans un premier temps, le dimère de Parylène solide sous forme de poudre est placé à l'intérieur du vaporisateur, où il est chauffé (150-175°C) et se transforme en gaz. Ensuite, la vapeur du dimère est entraînée jusqu'au four de pyrolyse qui lui rajoute de la chaleur (650-690°C) et le transforme en vapeur de monomère. Pour terminer, les vapeurs du monomère pénètrent dans une chambre de dépôt à température ambiante où sont prédisposés des substrats de silicium. A forte température, les monomères polymérisent dans toute la chambre et également sur les substrats de silicium, créant ainsi un revêtement de Parylène sur les substrats de silicium (Figure II.8).

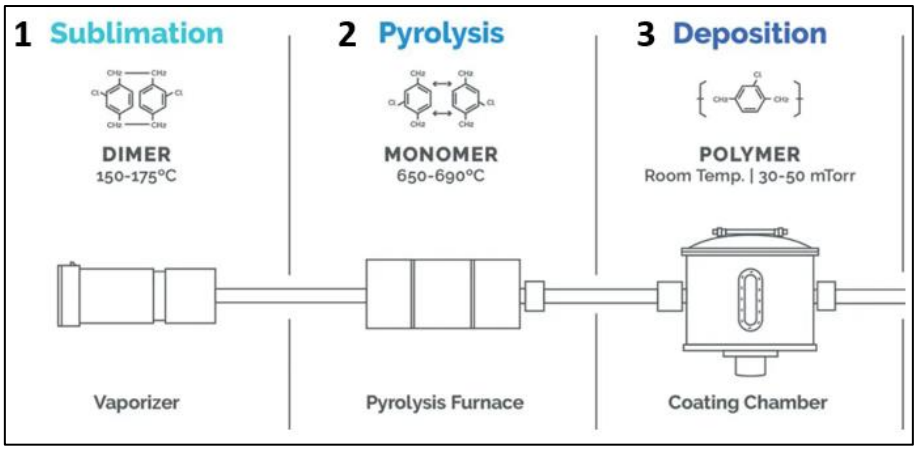


Figure II. 8: Processus de dépôt du Parylène par CVD.

Ce processus de dépôt est répété deux fois, la première couche de 23µm d'épaisseur servant de support à l'implant et la deuxième couche d'épaisseur 1,3µm servant d'encapsulation des microélectrodes. Les étapes de microfabrication de l'implant sont résumées sur la Figure II. 9.

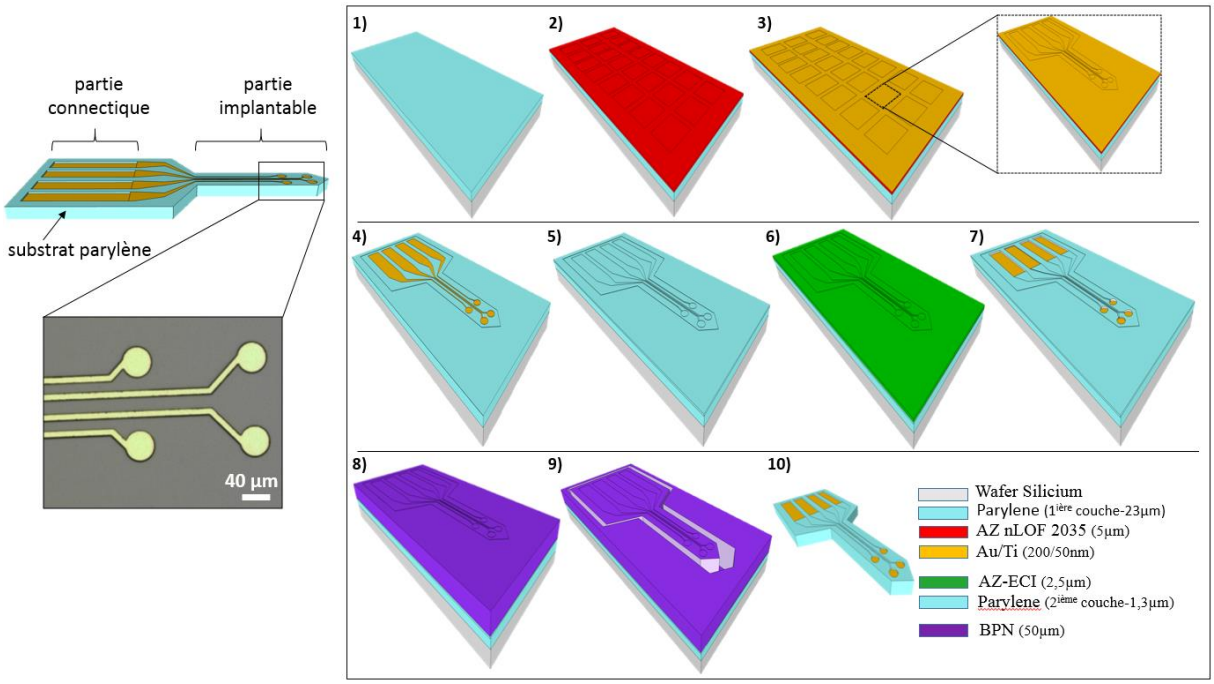


Figure II. 9: Etapes de microfabrication d'un implant en Parylène : (1) dépôt de la 1ière couche de Parylène (e=23µm) sur substrat de silicium. (2) Première étape de photolithographie pour la structuration des motifs avec dépôt d'une résine AZ nLOF (5µm), (3) métallisation de la couche de Parylène avec Au/Ti (200/50nm) par voie PVD, (4) lift off de la résine AZ nLOF. (5) Passivation des pistes métalliques avec le dépôt d'une 2ième couche de Parylène (e=1,3µm). (6) Deuxième étape de photolithographie pour l'ouverture des connectiques avec dépôt d'une résine AZ-ECI (2,5µm), (7) gravure ionique (plasma O_2). (8) Troisième étape de photolithographie pour la libération des implants du substrat avec dépôt d'une résine négative de BPN (50µm), (9) gravure ionique avec un plasma O_2 et C_4F_8, (10) retrait de la résine BPN et rinçage avec eau DI.

Une fois que la première couche de Parylène est déposée sur le substrat de silicium. Une première photolithographie est réalisée pour structurer les microélectrodes et les pistes métalliques. Pour assurer une bonne adhésion avec la résine, le substrat de Parylène est nettoyé

au plasma O_2. Une résine négative AZ NLOF 2035 d'épaisseur 5µm est déposée, insolée puis développée dans un bain MFCD-26. La métallisation du substrat est ensuite réalisée par voie PVD avec Au/Ti (200/50 nm) et un développement est effectué dans un bain d'acétone laissant apparaître après 2 heures de développement, les motifs d'or métallisés.
Une deuxième couche de Parylène d'épaisseur 1,3 µm est déposé par CVD pour assurer la passivation des pistes métalliques. Il a été montré par Meng et al[26], que lorsque le Parylène est traité thermiquement au four, le Parylène atteint un degré de cristallinité élevé lui procurant une bonne adhésion mécanique et une limitation de la pénétration d'eau. Le substrat est donc placé au four à 150°C pendant 16 h sous un flux d'azote. Ensuite une deuxième photolithographie est effectuée pour l'ouverture des connectiques avec l'utilisation d'une résine positive AZ-ECI d'épaisseur 2,5 µm. La résine est ensuite insolée puis développée au MFCD-26. Une vérification au microscope optique est effectuée pour contrôler l'alignement avec les lignes de mire. La gravure ionique (Avisa Technology Omega 201) sous flux O_2 avec une puissance de 500W est lancé pour une durée de 5min30, où les vitesses de gravure pour le Parylène et de la résine AZ-ECI sont respectivement de 220 nm/min et de 340 nm/min. Nous vérifions à l'aide d'un multimètre que les contacts d'or ont bien été dévoilés lors de la gravure. Enfin, nous éliminons le reste résiduel de la résine qui n'a pas été gravé dans un bain d'acétone. Une dernière étape de photolithographie est effectuée pour libérer les implants du substrat avec l'utilisation d'une résine BPN d'épaisseur 50 µm. Une gravure ionique séche est utilisée pour libérer les implants du substrat, où ce dernier est exposé au plasma O_2 pendant 25 minutes avec une vitesse de gravure du Parylène de 0,8 µm/min tandis que celle de la BPN moins rapide est de 0,5 µm/min. Un plasma fluoré (C_4F_8) d'une minute est ajouté durant le processus de gravure afin d'empêcher les résidus de se déposer dans le canal de découpe, ce qui donne un profil de gravure propre et net[9]. L'étape de gravure est également surveillée à l'aide d'une caméra optique introduit près de la chambre de gravure qui indique l'état de gravure du polymère. On plonge ensuite le substrat dans de l'eau DI où on laisse les implants se décoller de la surface du substrat. On récupère ensuite chaque implant pour les plonger dans un bain de NF52 pour retirer la résine résiduelle de BPN qui n'a pas été gravée, pendant environ 7min à 70°C. Les implants sont ensuite rincés à plusieurs reprises dans l'eau DI pour s'assurer qu'aucun résidu de résine ou du développeur ne soient encore présents. Des images au microscope optique sont d'abord réalisées pour vérifier si les implants n'ont pas été abimés lors de leurs processus de fabrication. Avec les images au MEB, nous vérifions que les microélectrodes ont bien été ouvertes et que la couche de passivation est bien réalisée (Figure II. 10). Toutes les étapes du processus sont décrites en Annexe.

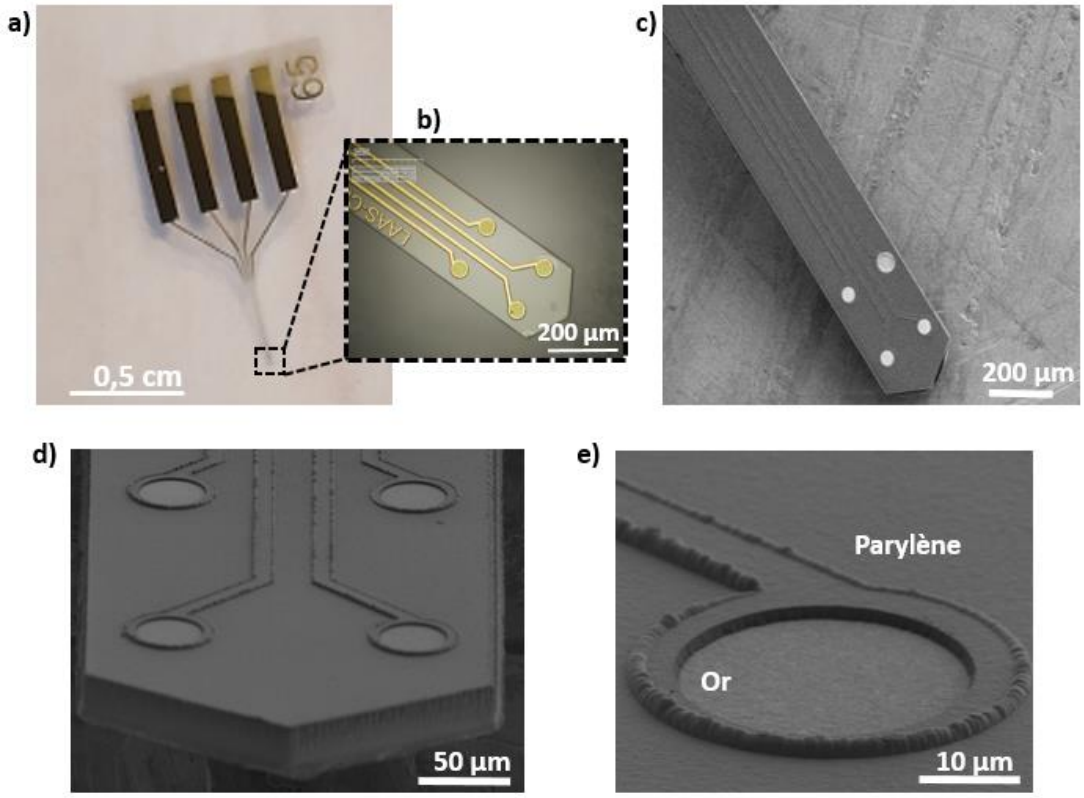


Figure II. 10: (a) Image d'un implant flexible après sa libération du substrat et (b) dans lequel sont intégrés 4 microélectrodes d'or (d=40µm), (c) image MEB de la partie implantable de l'implant. (d) Observations MEB des ouvertures des contacts des 4 microélectrodes d'or de l'implant, (e) agrandissement sur une microélectrode d'or encapsulée par la couche de passivation en Parylène.

2.2.2.3 Mise en place de la connectique électrique filaire

Pour assurer l'implantation des électrodes dans la chambre de culture de la MEA, l'implant sera connecté à un câble flexible en polyester long de 21cm (FFC Flat Flex Jumper Cable). Les implants fonctionnels sont d'abord sélectionnés puis connectés au câble qui possède comme l'implant 4 voies de connexion (Figure II. 11. a). A l'aide d'une colle conductrice à base d'argent (Epo-Tek), nous réalisons la connexion entre le câble et l'implant (Figure II. 11. b). Un instrument (Tencor-3000) et un microscope optique sont utilisés pour la fixation de l'implant sur le câble. Pour ce faire, le câble est fixé à une table de travail tandis que l'implant bouge parallèlement et verticalement jusqu'à sa fixation sur le câble. Pour terminer, l'implant est recouvert d'une colle époxy insolé aux rayons UV pour empêcher la pénétration d'une solution liquide lors des mesures électriques en solution.

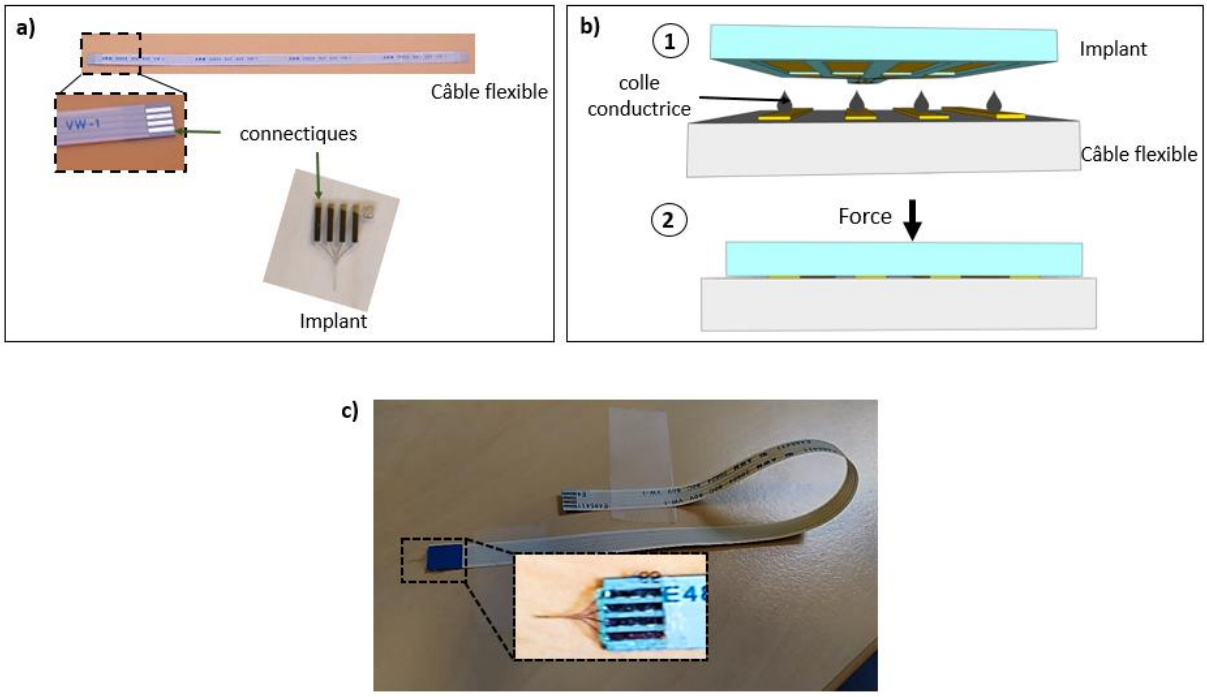


Figure II. 11: Installation de la connectique de l'implant. (a) Avec l'utilisation d'un câble flexible long de 21 cm composé de 4 voies de connexion. (b) Collage de l'implant sur le câble : (1) dépôt d'une colle conductrice à base d'argent sur les 4 connectiques du câble et (2) fixation de l'implant sur le câble avec application d'une force de l'instrument Tencor-3000. (c) Image implant collé sur le câble flexible.

Pour finaliser la préparation de la sonde, les 4 microélectrodes de l'implant sont connectées à un système de connecteur pour transmettre le signal électrique jusqu'au système d'acquisition. Le système peut être soudé ou sertis au câble, cela dépend de l'utilisation de l'implant car par exemple la soudure est plus appropriée pour les applications de transmission du signal électrophysiologique du fil à la carte d'acquisition. Tandis que le connecteur sertis permet de manipuler l'implant pour des simples caractérisations électriques (CV, EIS, etc.). Pour le système de soudure (Figure II. 12. a), 6 broches (PCB Headers) sont soudées au câble, dont 4 broches sont reliées aux 4 électrodes de l'implant et les 2 autres sont soudées ensemble pour jouer le rôle de masse électrique. Pour le système sertis (Figure II. 12. b), il n'y a pas de masse, le câble est emboité dans un boîtier contenant les 4 connecteurs (XH Connector).

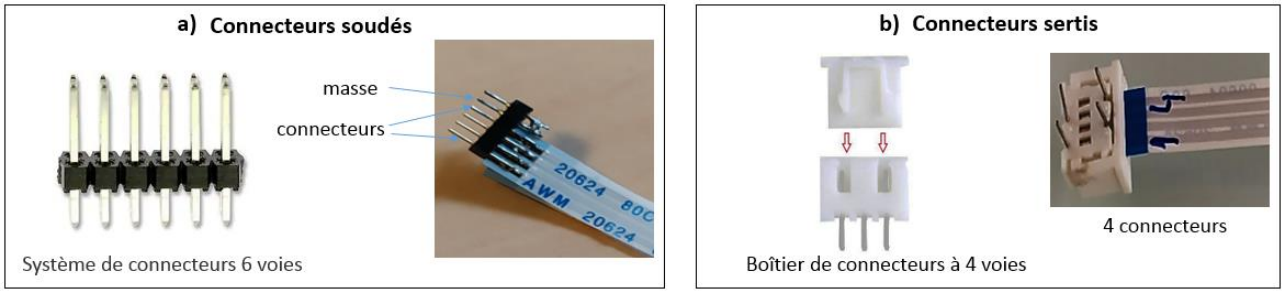


Figure II. 12: Préparation de la sonde pour les mesures électriques, (a) par soudure d'un système de connecteurs à 6 voies avec le câble flexible ou par (b) emboitement du câble flexible dans un boîtier de connecteurs à 4 voies.

Une fois les connectiques établies pour l'ensemble des micro-dispositifs fabriqués, des caractérisations électrochimiques sont réalisées sur les électrodes. Ces caractérisations

permettent à la fois de nettoyer leurs surfaces et de déterminer leurs propriétés physico-chimiques.

2.3 CARACTERISATIONS ELECTROCHIMIQUES DES MICROELECTRODES DE LA MEA ET DE L'IMPLANT

Les microélectrodes d'or sont caractérisées électrochimiquement par Voltammétrie Cyclique (CV) et par Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (EIS). Ce sont des techniques intéressantes qui nous tiennent informés des caractéristiques physico-chimiques des surfaces des microélectrodes d'or.

2.3.1 Montage électrochimique

La CV et l'EIS sont tracées à l'aide du logiciel EC-Lab et qui est connecté au potentiostat VMP3 Biologic. Ce potentiostat est connecté à un système à trois électrodes et varie le potentiel aux bornes de la microélectrode d'or. L'électrode de travail ou « Working Electrode (WE) » est connectée à une contre électrode en platine « Counter Electrode (CE) » par lequel passe un courant. Le potentiel aux bornes de la WE est contrôlé par une électrode de référence en Ag/AgCl (Réf). Ce système à trois électrodes beigne dans une solution d'acide sulfurique H_2SO_4 (0,5M) (Figure II. 13).

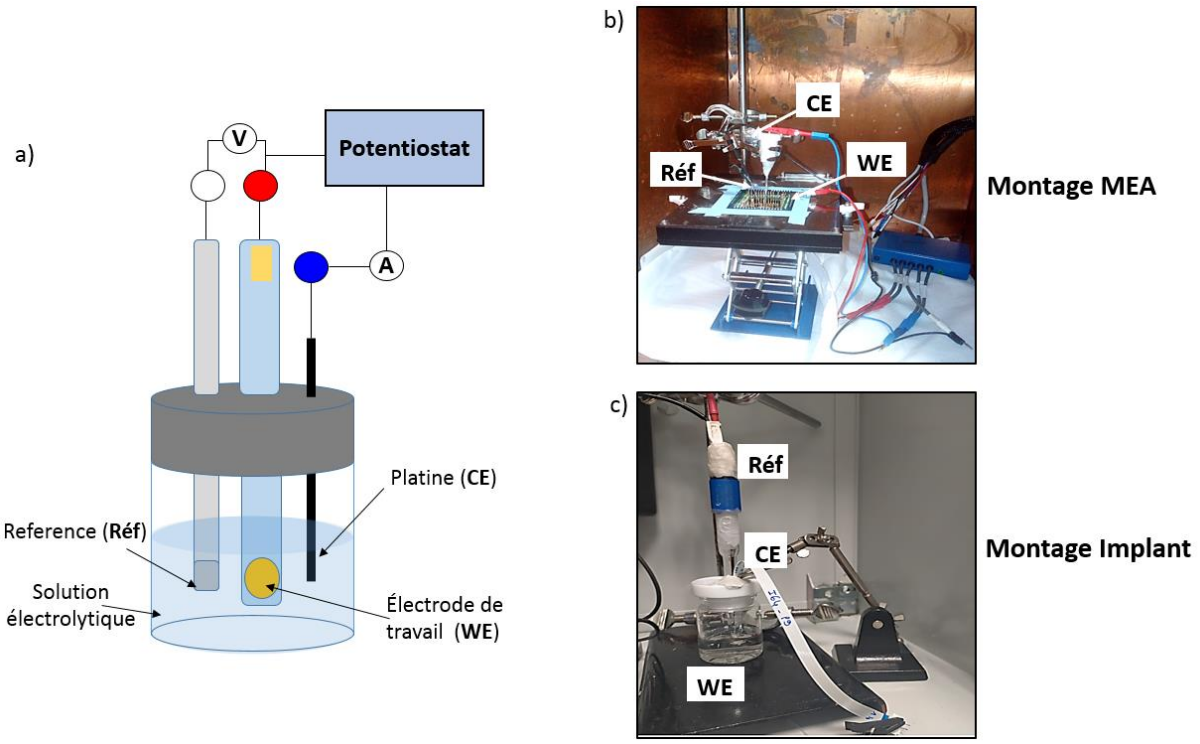


Figure II. 13: Montage du système de mesure électrochimique pour la MEA et l'implant : (a) système à trois électrodes connectées à un potentiostat : référence (Réf), microélectrode d'or comme WE et platine comme CE. Images du montage électrochimique avec (b) la MEA et (c) l'implant.

2.3.2 Voltammétrie Cyclique (CV)

2.3.2.1 Principe d'une mesure par CV

La méthode utilise une électrode de référence, une électrode de travail (WE), et une contre électrode (CE). Un électrolyte support est habituellement ajouté à la solution afin d'assurer une conductivité suffisante. Le potentiel est mesuré entre l'électrode de référence et la WE et le courant est mesuré entre la WE et la CE. Le potentiel mesuré ici, présente la particularité d'être modifié linéairement avec le temps (Figure II. 14).

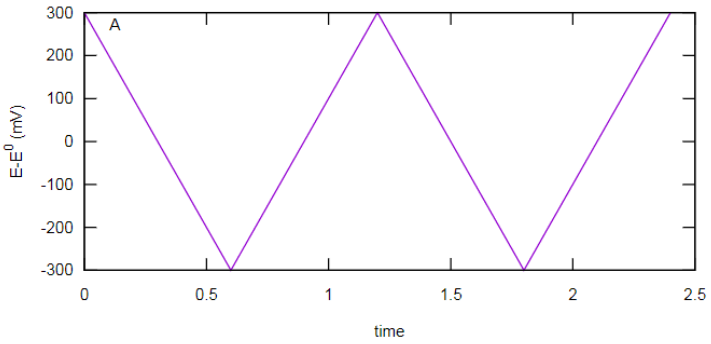


Figure II. 14: Forme du potentiel en voltampérométrie cyclique.

Lorsqu'un courant d'électrolyse traverse la WE et la CE via un potentiostat, alors il est produit un pic de courant pour tous les analytes qui peuvent être réduits dans l'intervalle de potentiel du balayage. Le courant s'accroît lorsque le potentiel atteint le potentiel de réduction de l'analyte, puis chute lorsque la concentration de l'analyte est en baisse. Ces données sont tracées comme l'intensité (i) fonction du potentiel (E) (Figure II. 15).

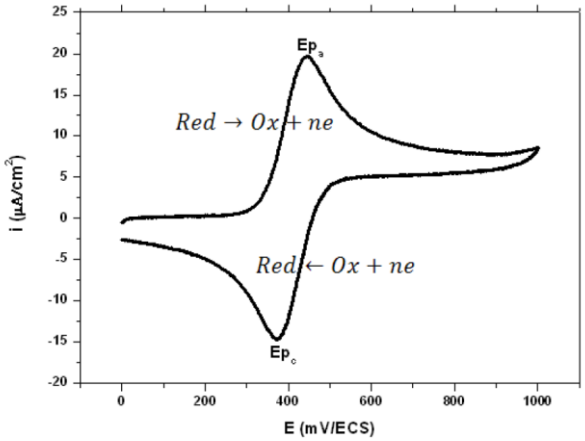


Figure II. 15: Représentation d'un voltamogramme ou d'une CV.

Le courant d'électrolyse (I) correspondant au transfert électronique qui permet la réduction des ions métalliques à la surface de l'électrode. Il correspond à la somme de deux courants distincts : le courant faradique (If) et le courant capacitif (Ic) avec I = If + Ic. C'est le courant faradique qui résulte des réactions d'oxydo-réduction à l'interface électrode/solution, de ce fait If permet de renseigner *in situ* la nature des oxydes formés lors de l'électrolyse.

2.3.2.2 CV des microélectrodes d'or

Le potentiostat balaye le potentiel aux bornes de la microélectrode de travail entre -0,55 V et 1,45 V vs Ag/AgCl à une vitesse de balayage de 200 mV/s et sur 20 cycles. Les CV des microélectrodes d'or de la MEA et de l'implant sont tracées en courant (I) en fonction du potentiel (E) (Figure II. 16). Elles montrent au cycle « aller » à partir de 0,8 V, la formation des oxydes à la surface de l'or. Puis au cycle « retour » à 0,6 V, la réduction de ces oxydes. Ce sont ces pics caractéristiques et le courant mesuré qui nous informent des caractéristiques surfaciques de la microélectrode d'or. Pendant les cycles de nettoyage, des résidus organiques présents à la surface de l'électrode d'or sont dissous dans la solution électrolytique, cela libère la surface de l'électrode et son courant augmente. Après plusieurs cycles de nettoyage, la surface d'or montre des courants qui stabilisent.

Le courant de réduction de l'or à 0,55V, est respectivement égal à -50nA et -110nA pour la MEA et l'implant. Ces courants sont proportionnels aux surfaces des électrodes, comme la surface de l'implant (1256 μm^2) est plus grande que celle de la MEA (314 μm^2) alors les courants de la microélectrode de l'implant seront plus élevés que ceux de la MEA.

Les CV d'or de la MEA et de l'implant montrent toute deux une signature caractéristique de l'or, néanmoins les pics d'oxydation de la MEA et de l'implant sont différents. C'est parce que l'or métallique déposé par PVD est de structure polycristalline et en fonction des procédés de fabrication des micro-dispositifs MEA et implant, l'or peut subir des transformations des phases cristallines et montrer par conséquent lors des mesures par CV, des phases cristallines qui croient plus que d'autres.

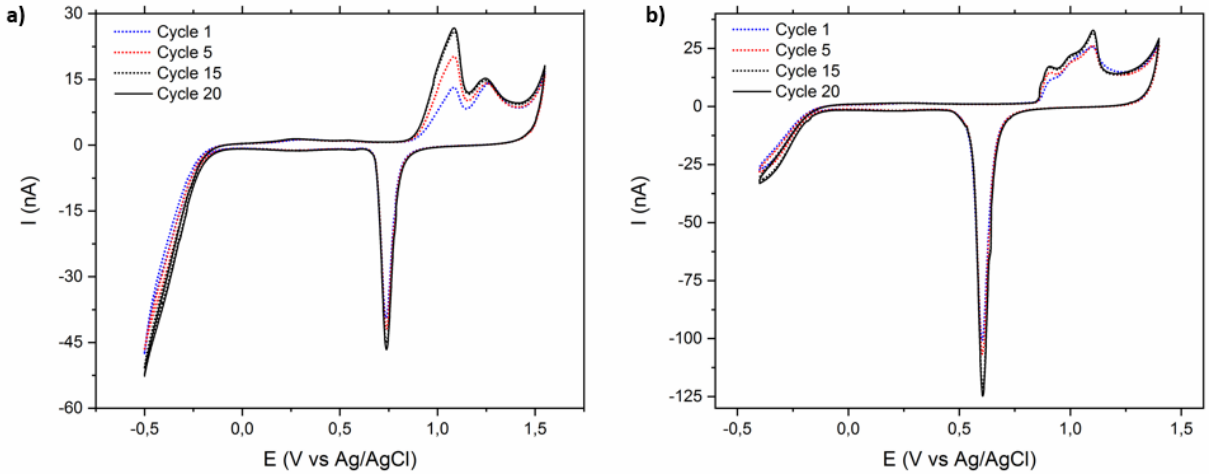


Figure II. 16: CV de microélectrodes d'or cyclés 20 fois dans un milieu H_2SO_4 (0,5M) à v=200mV/s sur [-0,5-1,5] V vs Ag/AgCl pour (a) une microélectrode d'or MEA (d=20 µm) et pour (b) une microélectrode d'or de l'implant (d=40µm).

2.3.3 Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (EIS)

Enfin, la mesure par Spectroscopie d'Impédance Electrochimique ou EIS, nous permettra d'évaluer l'impédance de la microélectrode à toute fréquence. Les valeurs des impédances des

microélectrodes sont importantes pour les mesures des activités électriques du réseau neuronal du milieu biologique, car plus celle-ci est faible et plus le signal électrique enregistré est de meilleure qualité, cette partie sera détaillée dans le chapitre 3 consacré aux mesures électrophysiologiques. Dans notre cas de figure, l'analyse de l'impédance est un contrôle parallèle à la CV qui nous permet de vérifier la fonctionnalité de la microélectrode d'or, comme par exemple si celle-ci est bien passivée ou bien ouverte.

Le principe de la mesure EIS est résumé en fiche Annexe.

Il a été observé par Riaz et al[27] que la réponse de l'impédance dépendait de la surface de l'électrode utilisée, plus celle-ci était faible et plus son impédance augmentait. Cette proportionnalité est vérifiée dans les équations II. 1 et II. 2, où la surface de l'électrode (A) est proportionnelle aux composantes qui modélisent le processus de diffusion par spectroscopie, à savoir : la capacité de la double couche électrique (Cdl) et la résistance de transfert de charge (Rct).

$$C_{dl} = \varepsilon_0 . \varepsilon_R \frac{\mathrm{A}}{d}$$

Equation II. 1 : Représentation de de la double couche électrique (Cdl) en fonction de ε0 permittivité du vide, εR permittivité relative, A la surface de l'électrode et d l'épaisseur de la double couche.

$$R_{ct} = \frac{\mathrm{K}}{n^2 . c . A}$$

Equation II. 2: Représentation de la résistance de transfert de charge (Rct) en fonction de d'une constante K, n le nombre d'électrons échangés, c la concentration d'espèces oxydés et A la surface de l'électrode.

En effectuant un balayage fréquentiel sinusoïdal à tension constante sur [10 Hz-10 kHz] à travers les circuits électriques de la MEA et de l'implant, on relève des valeurs d'impédance |Z| (kOhm) en fonction de la fréquence (kHz). Pour une analyse qualitative, nous, nous intéresserons à l'impédance mesurée à une fréquence de 1 kHz qui est habituellement une fréquence utilisée à des fins de comparaison car les potentiels d'action ont une bande de fréquence caractéristique centrée sur cette fréquence[28]. Sur la Figure II. 17, les impédances des électrodes d'or de la MEA et de l'implant sont respectivement égales à 310 kOhm et de 110 kOhm. L'impédance est plus faible pour l'électrode d'or de l'implant en raison de sa surface qui est plus grande que la surface de la MEA.

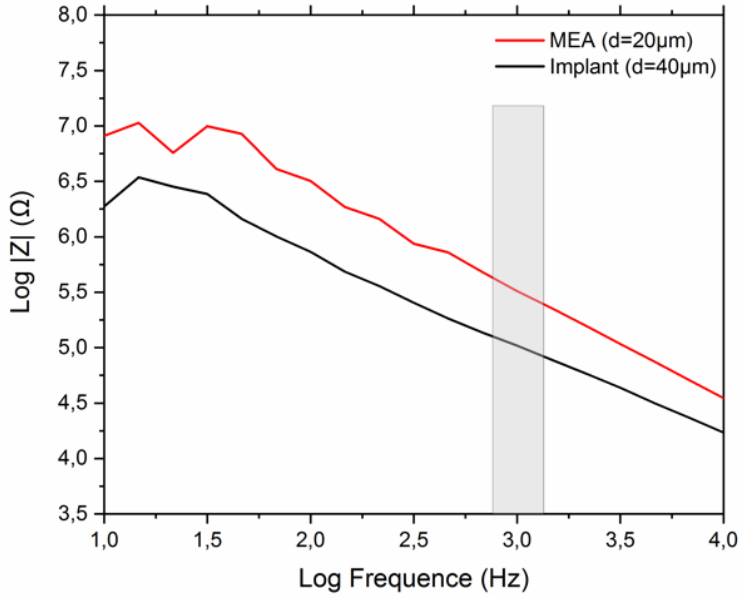


Figure II. 17: Réponse EIS (kOhm) sur une plage de fréquence de 10 Hz-10kHz dans une solution de H_2SO_4 vs Ag/AgCl pour une microélectrode d'or de l'implant (d=40µm) et d'une microélectrode d'or du réseau MEA (d=20µm).

Lorsque les microélectrodes d'or du micro-dispositif MEA-implant ont toute été contrôlées par CV et EIS, ils peuvent être prêt à l'emploi pour les mesures électrophysiologiques de l'organoïde cérébral.

2.4 COUPLAGE DES MICRO-DISPOSITIFS MEA ET IMPLANT

Comme discuté dans le chapitre 1, il y a un grand intérêt et un réel besoin pour le suivi fonctionnel de la culture 3D des organoïdes cérébraux. Un micro-dispositif 3D est mis en place grâce au couplage implant et MEA, où la MEA enregistrera l'activité extracellulaire des neurones sur la composante XY et l'implant sur la composante Z. Un schéma du micro-dispositif est illustré sur la figure ci-dessous (Figure II. 18). L'implant est intégré au sein de la chambre MEA et fixé à l'aide d'un couvercle. Le développement de la culture neuronale est maintenu dans la chambre MEA. Cette plateforme dédiée aux mesures électrophysiologiques 3D a pour avantage de pré-positionner l'implant sur la MEA avant le démarrage d'une culture neuronale, ce qui est pertinent puisque que la culture ne subira dans ce cas aucun stress lié à l'insertion de l'implant.

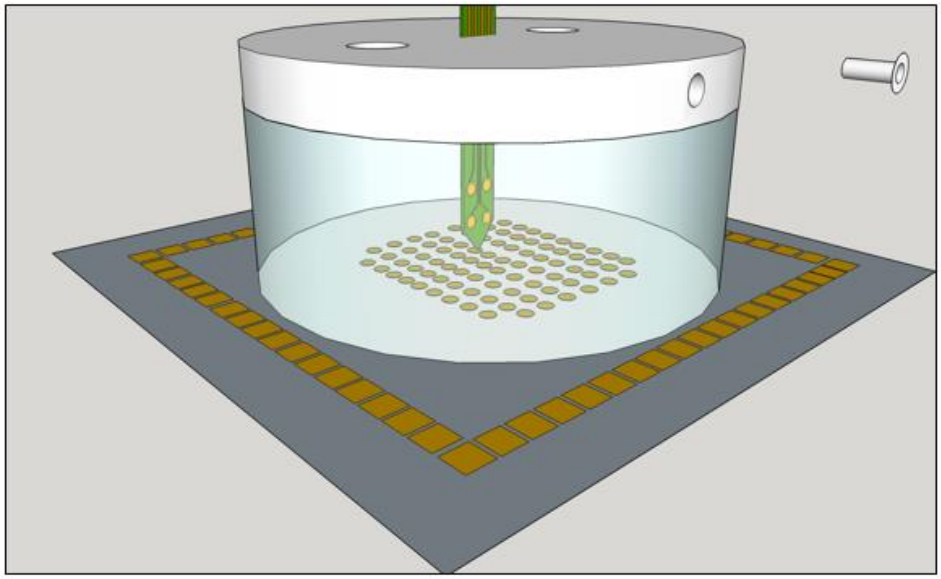


Figure II. 18: Concept de plate-forme 3D pour la surveillance électrophysiologique de l'organoïde cérébral.

Concernant les mesures électrophysiologiques des cultures neuronales 3D, la startup Synaxys avec laquelle nous collaborons a préétabli un protocole de culture sur des MEAs commerciales (MCS) et dans lesquelles elle a recueillis des mesures électrophysiologiques 2D. Afin de garantir une conformité aux précédentes mesures électrophysiologiques réalisées, nous avons décidé dans un premier temps d'utiliser une MEA commerciale et dans laquelle nous intégrerons l'implant fabriqué au LAAS. Les MEAs commerciales présentent 60 microélectrodes en or et dont le diamètre est de 100 µm.

2.4.1 Fabrication du capot

Pour fixer l'implant à la MEA planaire, un capot a été dessiné puis fabriqué par impression 3D pour assurer une double fonctionnalité à la plateforme. D'abord celle de couvrir la chambre de culture neuronale, puis celle de fixer l'implant au centre de la culture. Une imprimante 3D (Multi Fab DWS J29+) a permis de fabriquer un capot filté qui contient 4 ouvertures principales (Figure II. 19), le premier étant pour la fixation de l'implant, les deux autres pour la fixation d'une électrode de référence (fil Ag/AgCl) et d'une CE (fil de Platine) et la quatrième pour l'administration de nutriments dans le milieu de culture. Il y a par ailleurs une double cavité présente sur le chapeau qui permet d'embarquer une vis pour la fixation de l'implant.

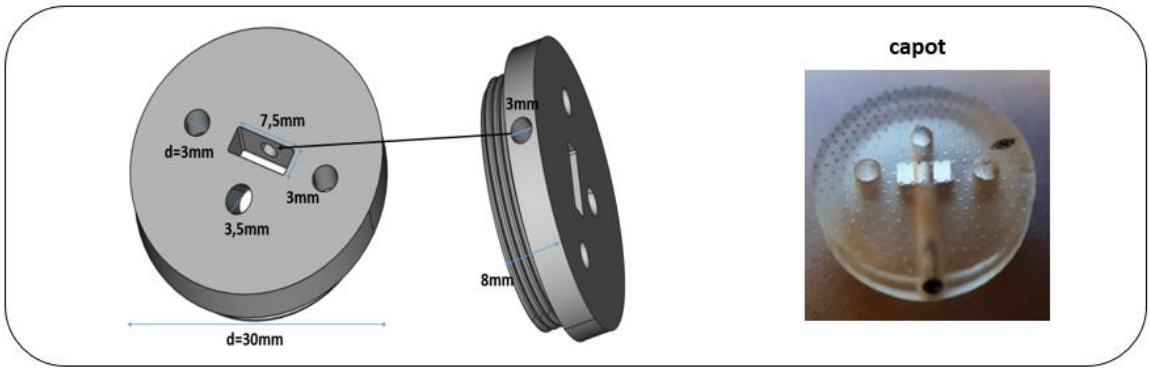


Figure II. 19: Images du dimensionnement du capot (CATIA) et de son impression 3D. Capot filté imprimé en 3D et contenant 4 principales ouvertures pour la fixation de : l'implant (au centre), l'électrode de référence et CE(à gauche et à droite de l'implant) et d'une micropipette (l'administration des nutriments).

2.4.2 Mise en place de la chambre sur la MEA

La chambre positionnée sur la MEA servira en premier lieu à accueillir le milieu de culture et à fixer l'implant pour établir des mesures électrophysiologiques dans les 3D. Pour cela, nous avons dans un premier temps collé un anneau filté en PDMS (MCS MEA Plastic rings with thread) à la surface de la MEA avec du PDMS (Figure II. 20). Puis pour figer l'anneau, la MEA a été placée dans un four à 60°C (1h). Enfin, le capot et l'anneau sont fixés ensemble pour accueillir l'implant et démarrer les mesures électrophysiologiques.

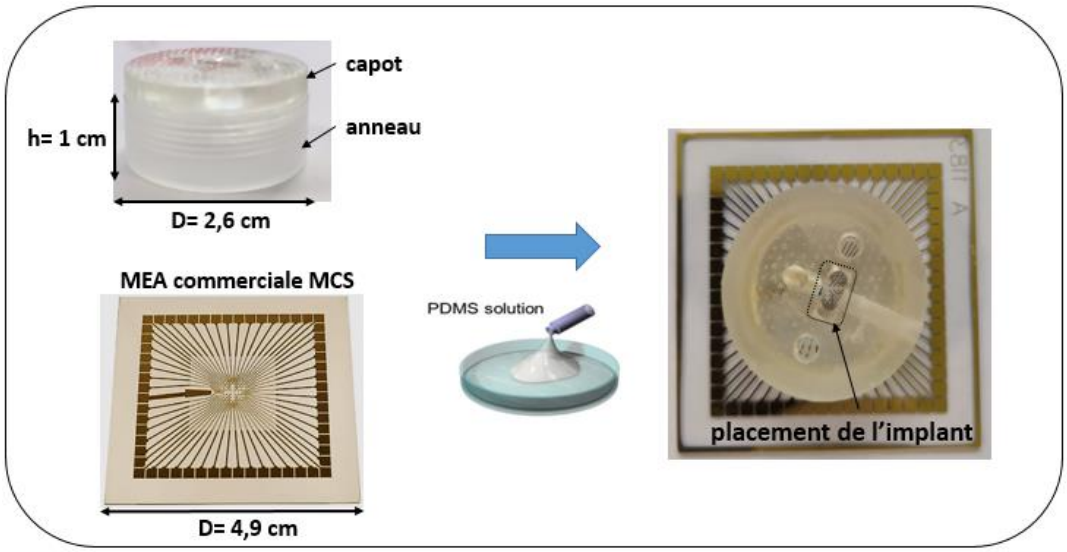


Figure II. 20: Mise en place de la chambre MEA pour la fixation de l'implant. Anneau en PDMS de diamètre 2,6 cm et de hauteur 1cm est fixé avec du PDMS sur la surface de la MEA.

2.4.3 Fixation et positionnement de l'implant sur la MEA

Le positionnement de l'implant par rapport au réseau d'électrodes planaires (MEA) est perpendiculaire (Figure II. 21). Au vu du faible volume de la culture neuronale 3Dqui est évaluée à 300µm d'épaisseur, les électrodes de l'implant doivent être complétement immergées

dans la chambre de culture. Avec l'aide d'un microscope optique, il a été possible de géo localiser l'implant autour de la chambre MEA, ainsi nous avons fixé une inter distance entre la MEA et l'implant de 30-50 µm. Il nous a été possible de localiser les 4 électrodes de la MEA les plus proches à l'implant afin de nous renseigner plus tard lors des mesures électrophysiologiques de la cartographie du réseau neuronal.

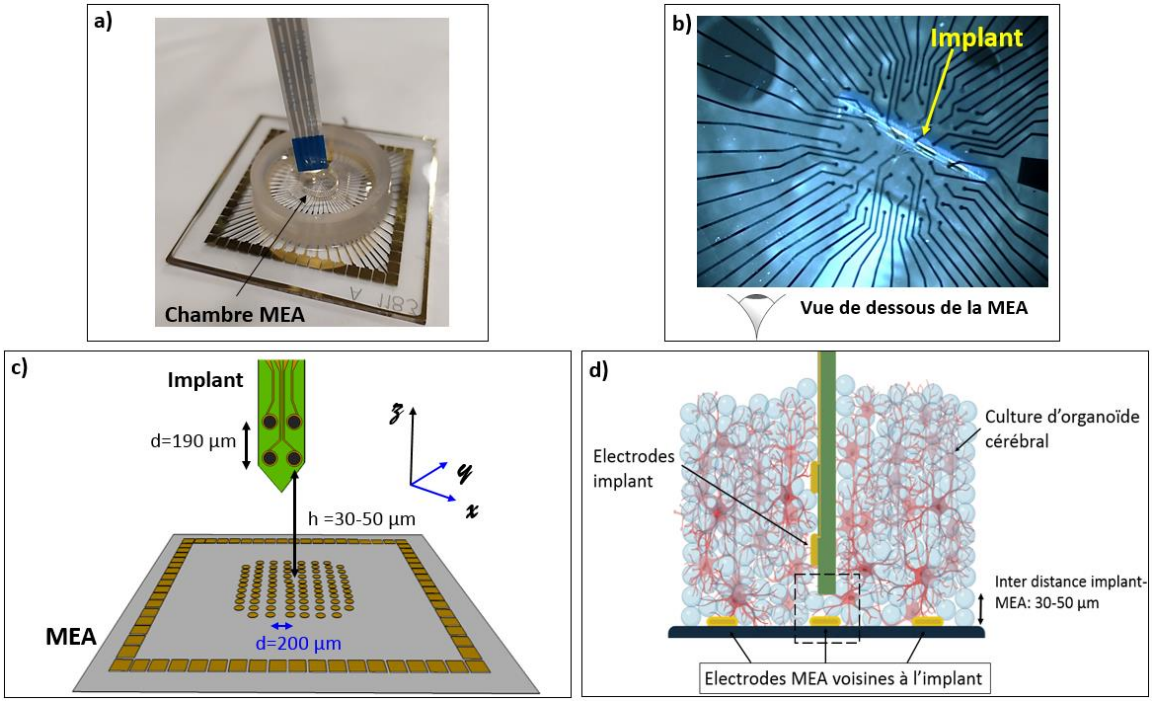


Figure II. 21: (a) Positionnement de l'implant dans la chambre MEA. (b) Image au microscope optique du positionnement de l'implant par rapport au réseau d'électrodes planaires de la MEA (vue du dessous de la MEA). (c) Schéma distances inter électrodes MEA-implant. (d) Image en coupe de la culture neuronale 3D avec le positionnement des électrodes de l'implant et de la MEA.

2.5 CONCLUSION

Avec les MEAs planaires, les mesures électrophysiologiques sont uniquement mesurées dans les deux dimensions de la culture neuronale 3D, or l'information 3D n'est pas prise en compte. C'est pourquoi, nous avons discuté dans ce chapitre d'une approche de couplage de deux micro-dispositifs déjà développés au LAAS qui consiste à coupler un implant et une MEA planaire. Le principe de microfabrication et de la mise en place des connectiques des micro-dispositifs ont été discutés dans ce chapitre. Par soucis de reproductibilité des mesures électrophysiologiques des cultures neuronales 3D établies par la start-up Synaxys, nous avons préféré poursuivre des mesures avec des MEAs commerciales. Un anneau a été fixé à la surface de la MEA commerciale et dans le lequel un capot a été dimensionné. Celui-ci a permis de fixer et de situer l'implant autour d'une zone d'électrodes planaires pour pouvoir établir une cartographie des mesures électrophysiologiques en 3D :

- Plan 2D (XY) : avec le réseau d'électrodes planaires de la MEA constituée de 60 microélectrodes (d=100 µm) et réparties sur une surface de 0.3 cm^2.
- Plan 3D (Z) : avec les 4 microélectrodes de l'implant (d=40µm) insérées perpendiculairement à la MEA.

2.6 RÉFÉRENCES

(1) Yuan, X.; Schröter, M.; Obien, M. E. J.; Fiscella, M.; Gong, W.; Kikuchi, T.; Odawara, A.; Noji, S.; Suzuki, I.; Takahashi, J.; Hierlemann, A.; Frey, U. Versatile Live-Cell Activity Analysis Platform for Characterization of Neuronal Dynamics at Single-Cell and Network Level. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 4854. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18620-4.

(2) Obien, M. E. J.; Deligkaris, K.; Bullmann, T.; Bakkum, D. J.; Frey, U. Revealing Neuronal Function through Microelectrode Array Recordings. *Front. Neurosci.* **2015**, *0*. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00423.

(3) Trujillo, C. A.; Gao, R.; Negraes, P. D.; Gu, J.; Buchanan, J.; Preissl, S.; Wang, A.; Wu, W.; Haddad, G. G.; Chaim, I. A.; Domissy, A.; Vandenberghe, M.; Devor, A.; Yeo, G. W.; Voytek, B.; Muotri, A. R. Complex Oscillatory Waves Emerging from Cortical Organoids Model Early Human Brain Network Development. *Cell Stem Cell* **2019**, *0* (0). https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.002.

(4) Spira, M. E.; Hai, A. Multi-Electrode Array Technologies for Neuroscience and Cardiology. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8* (2), 83–94. https://doi.org/10.1038/nnano.2012.265.

(5) Novellino, A.; Scelfo, B.; Palosaari, T.; Price, A.; Sobanski, T.; Shafer, T. J.; Johnstone, A. F. M.; Gross, G. W.; Gramowski, A.; Schroeder, O.; Jügelt, K.; Chiappalone, M.; Benfenati, F.; Martinoia, S.; Tedesco, M. T.; Defranchi, E.; D'Angelo, P.; Whelan, M. Development of Micro-Electrode Array Based Tests for Neurotoxicity: Assessment of Interlaboratory Reproducibility with Neuroactive Chemicals. *Front. Neuroengineering* **2011**, *0*. https://doi.org/10.3389/fneng.2011.00004.

(6) Autar, K.; Guo, X.; Rumsey, J. W.; Long, C. J.; Akanda, N.; Jackson, M.; Narasimhan, N. S.; Caneus, J.; Morgan, D.; Hickman, J. J. A Functional HiPSC-Cortical Neuron Differentiation and Maturation Model and Its Application to Neurological Disorders. *Stem Cell Rep.* **2022**, *17* (1), 96–109. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.11.009.

(7) Forro, C.; Caron, D.; Angotzi, G. N.; Gallo, V.; Berdondini, L.; Santoro, F.; Palazzolo, G.; Panuccio, G. Electrophysiology Read-Out Tools for Brain-on-Chip Biotechnology. *Micromachines* **2021**, *12* (2), 124. https://doi.org/10.3390/mi12020124.

(8) Castagnola, V. Implantable Microelectrodes on Soft Substrate with Nanostructured Active Surface for Stimulation and Recording of Brain Activities. These de doctorat, Toulouse 3, 2014.

(9) Lecomte, A. Conception and Characterization of Flexible Microelectrodes for Implantable Neuroprosthetic Development. 161.

(10) Saunier, V. Microélectrodes nanocomposites implantables couplant enregistrement/stimulation neurale et détection électrochimique de neurotransmetteurs. phdthesis, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2021.

(11) Rodger, D. C.; Fong, A. J.; Li, W.; Ameri, H.; Lavrov, I.; Zhong, H.; Saati, S.; Menon, P.; Meng, E.; Burdick, J. W.; Roy, R. R.; Edgerton, V. R.; Weiland, J. D.; Humayun, M. S.; Tai, Y. C. High-Density Flexible Parylene-Based Multielectrode Arrays for Retinal and Spinal Cord Stimulation. In *TRANSDUCERS 2007 - 2007 International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference*; 2007; pp 1385–1388. https://doi.org/10.1109/SENSOR.2007.4300401.

(12) Viventi, J.; Kim, D.-H.; Moss, J. D.; Kim, Y.-S.; Blanco, J. A.; Annetta, N.; Hicks, A.; Xiao, J.; Huang, Y.; Callans, D. J.; Rogers, J. A.; Litt, B. A Conformal, Bio-Interfaced Class of Silicon Electronics for Mapping Cardiac Electrophysiology. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2* (24). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000738.

(13) Kim, B. J.; Kuo, J. T. W.; Hara, S. A.; Lee, C. D.; Yu, L.; Gutierrez, C. A.; Hoang, T. Q.; Pikov, V.; Meng, E. 3D Parylene Sheath Neural Probe for Chronic Recordings. *J. Neural Eng.* **2013**, *10* (4), 045002. https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/4/045002.

(14) Johnson, A. C.; Wise, K. D. A Self-Curling Monolithically-Backed Active High-Density Cochlear Electrode Array. In *2012 IEEE 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*; 2012; pp 914–917. https://doi.org/10.1109/MEMSYS.2012.6170334.

(15) T.W. Kuo, J.; J. Kim, B.; A. Hara, S.; D. Lee, C.; A. Gutierrez, C.; Q. Hoang, T.; Meng, E. Novel Flexible Parylene Neural Probe with 3D Sheath Structure for Enhancing Tissue Integration. *Lab. Chip* **2013**, *13* (4), 554–561. https://doi.org/10.1039/C2LC40935F.

(16) Kisban, S.; Moser, D.; Rubehn, B.; Stieglitz, T.; Paul, O.; Ruther, P. Fatigue Testing of Polyimide-Based Micro Implants. In *4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering*; Vander Sloten, J., Verdonck, P., Nyssen, M., Haueisen, J., Eds.; Magjarevic, R., Nagel, J. H., Series Eds.; IFMBE Proceedings; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; Vol. 22, pp 1594–1597. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89208-3_379.

(17) Guo, L.; Ma, M.; Zhang, N.; Langer, R.; Anderson, D. G. Stretchable Polymeric Multielectrode Array for Conformal Neural Interfacing. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (9), 1427–1433. https://doi.org/10.1002/adma.201304140.

(18) Nomura, K.; Ohta, H.; Takagi, A.; Kamiya, T.; Hirano, M.; Hosono, H. Room-Temperature Fabrication of Transparent Flexible Thin-Film Transistors Using Amorphous Oxide Semiconductors. *Nature* **2004**, *432* (7016), 488–492. https://doi.org/10.1038/nature03090.

(19) Kozai, T. D. Y.; Jaquins-Gerstl, A. S.; Vazquez, A. L.; Michael, A. C.; Cui, X. T. Brain Tissue Responses to Neural Implants Impact Signal Sensitivity and Intervention Strategies. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (1), 48–67. https://doi.org/10.1021/cn500256e.

(20) Parylene Properties. *VSi Parylene*.

(21) Kim, B. J.; Meng, E. Review of Polymer MEMS Micromachining. *J. Micromechanics Microengineering* **2016**, *26* (1), 013001. https://doi.org/10.1088/0960-1317/26/1/013001.

(22) Senkevich, J. J.; Desu, S. B. Morphology of Poly(Chloro-p-Xylylene) CVD Thin Films. *Polymer* **1999**, *40* (21), 5751–5759. https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00793-9.

(23) Castagnola, V.; Descamps, E.; Lecestre, A.; Dahan, L.; Remaud, J.; Nowak, L. G.; Bergaud, C. Parylene-Based Flexible Neural Probes with PEDOT Coated Surface for Brain Stimulation and Recording. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 450–457. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.004.

(24) Li, C.; Ahn, C. H.; Shutter, L. A.; Narayan, R. K. Toward Real-Time Continuous Brain Glucose and Oxygen Monitoring with a Smart Catheter. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25* (1), 173–178. https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.06.032.

(25) Lecomte, A.; Degache, A.; Descamps, E.; Dahan, L.; Bergaud, C. In Vitro and in Vivo Biostability Assessment of Chronically-Implanted Parylene C Neural Sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *251*, 1001–1008. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.057.

(26) Ortigoza-Diaz, J.; Scholten, K.; Meng, E. Characterization and Modification of Adhesion in Dry and Wet Environments in Thin-Film Parylene Systems. *J. Microelectromechanical Syst.* **2018**, *27* (5), 874–885. https://doi.org/10.1109/JMEMS.2018.2854636.

(27) Ahmed, R.; Reifsnider, K. Study of Influence of Electrode Geometry on Impedance Spectroscopy; American Society of Mechanical Engineers Digital Collection, 2010; pp 167–175. https://doi.org/10.1115/FuelCell2010-33209.

(28) Cui, X.; Martin, D. C. Electrochemical Deposition and Characterization of Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) on Neural Microelectrode Arrays. *Sens. Actuators B Chem.* **2003**, *89* (1), 92–102. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(02)00448-3.

Chapitre 3

Mesures électrophysiologies d’une culture hippocampe 3D sur MEA

3 CHAPITRE. 3 MESURES ELECTROPHYSIOLOGIES D'UNE CULTURE HIPPOCAMPE 3D SUR MEA

Dans ce chapitre, le micro-dispositif MEA-implant a fait l'objet d'une étude sur l'activité extracellulaire d'un réseau neuronal issu d'une culture cellulaire 3D d'un hippocampe de rat. Cette étude a été réalisée sur une période de 7 semaines de culture avec l'acquisition des potentiels d'action en spontanés et en stimulés. Une dernière partie présente une analyse comparative sur la qualité des signaux enregistrés d'une culture neuronale 3D avec des électrodes d'or et des électrodes nanostructurées avec un polymère conducteur (PEDOT : PSS).

3.1 INTRODUCTION

Avec le développement des microtechnologies[1,2], notamment avec les plateformes microfluidiques cela a permis d'apporter des suivis standardisés des cultures cellulaires ou d'organes *in vitro* et de se rapprocher des conditions physiologiques retrouvés *in vivo*. Par ailleurs, l'intégration de divers capteurs sur ces plateformes a contribué à cette standardisation en permettant de renseigner sur la structure et la viabilité et l'état physiologique des organes sur puces. Parmi les plateformes, on compte les MicroElectrodesArrays (MEAs), fabriquées à grande échelle grâce aux techniques conventionnelles de la microélectronique, où des matrices de microélectrodes sont positionnées au contact du tissu nerveux afin de recueillir l'activité électrique en un grand nombre d'endroits simultanément. Le développement de ces systèmes multiélectrodes est crucial à la fois pour la recherche fondamentale en Neurosciences, mais également pour la mise au point de nouvelles interfaces entre l'électronique et le tissu nerveux. Depuis plus de 30 ans, les MEAs ont permis d'étudier la formation de réseaux neuronaux[3], leurs communications[4] et ont également servi de plateforme pour l'étude de nouveaux médicaments sur des pathologies neurologiques[5]. Elles fournissent des pistes pour mieux comprendre les maladies neurologiques ou neurodégénératives tels que l'épilepsie et l'autisme afin de mieux modéliser ces syndromes et ainsi trouver de nouveaux traitements.

Les MEAs se composent d'un réseau de microélectrodes intégré dans une petite surface (mm^2) et au-dessus duquel des cellules neuronales peuvent être cultivées[6] (Figure III. 1). La réduction des dimensions permise par les techniques de microfabrication (photolithographie, gravure, etc.) a également entrainé l'évolution de ces capteurs dédiés à cette approche.

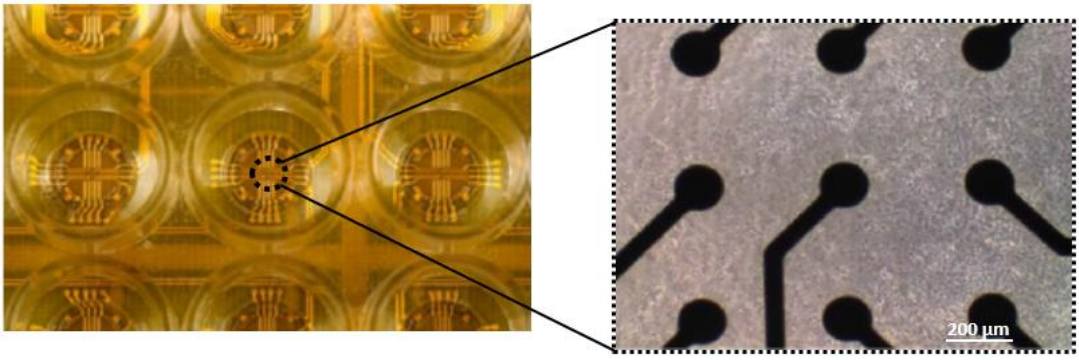


Figure III. 1: Des puits de réseaux de 16 microélectrodes chacun et dans lesquelles des cellules neuronales sont cultivées (à gauche). Schéma du réseau de microélectrodes[6](100µm) (à droite).

Les MEAs permettent des enregistrements extracellulaires simultanés de potentiels d'action à partir de plusieurs endroits du réseau neuronal en présence ou en absence de stimulation. Ainsi les cultures peuvent être exposées à des médicaments pour mesurer leurs influences sur les neurones et apporter en temps réel et sur le long terme des données pour décrivant l'état du réseau neuronal. Par exemple, l'équipe de Odawara et al.[7] ont mesuré à l'aide d'une culture neuronale de rat *in vitro* couplée à une MEA, l'activité spontanée du réseau sur plus de 3 mois d'enregistrement (Figure III. 2). Ils ont administré une drogue, la Bicuculline, pour observer le comportement de la culture sur le long terme. La Bicuculline a un effet excitateur sur la culture. Sur la Figure III. 2 sont représentées 64 microélectrodes répondant à l'administration de la Bicuculline aux jours 37 et 92 DIV (Day *In Vitro*). Celles-ci répondent au nombre de 11 au jour 37 et 26 au jour 92. La culture au jour 92 est donc plus active qu'au jour 37. La culture indique qu'elle est pharmacologiquement plus sensible à la Bicuculline sur le long-terme.

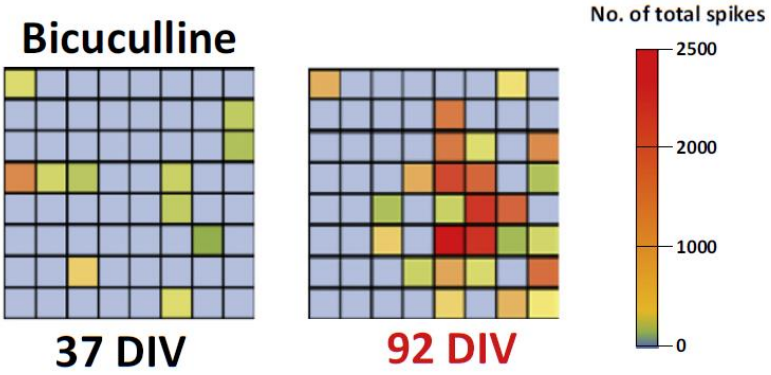


*Figure III. 2: Effets du médicament de Bicuculline sur une culture d'astrocytes de rat in vitro aux jours 37 et 92 (**D**ay **I**n **V**itro) et observé sur MEA. Les 64 électrodes (8x8) colorées détectent des potentiels d'action, les électrodes en rouge détectent le plus d'activité et en vert le moins d'activité.*

Divers prototypes de MEAs planaires (2D) sont employés dans les mesures extracellulaires des cultures neuronales d'organoïdes ou tissus, elles sont le plus souvent commercialisées par Multi Channel System (MCS GmbH), NeuroNexus ou Axion biosystems. Elles peuvent être fabriquées sur silicium, verre ou polymère. De nombreuses équipes en neuroscience cherchent à comprendre avec les mesures des activités extracellulaires neuronales, la croissance des organoïdes cérébraux[8,9].

Cependant, une des limitations importantes des systèmes MEA planaire (2D) actuels vient du fait que l'échantillonnage spatial des points de mesure est limité à une ligne ou à un plan. En

effet, aucun système ne permet encore un échantillonnage 3D des activités électriques neuronales. Pourtant, de nombreuses études montrent que l'information est réellement portée par une architecture 3D des organoïdes. Cette information varie, par exemple d'un point à un autre de la surface du système biologique, mais également dans la profondeur du tissu entre les différentes couches cellulaires. Parvenir à développer des systèmes d'enregistrement 3D de l'activité électrique constitue donc certainement un verrou actuel majeur en neurosciences.

Dans ce contexte, certaines équipes de recherche tentent de s'en affranchir en améliorant la résolution spatiale avec l'intégration d'une multitude de microelectrodes[10] (Tableau III. 1). D'autres essaient de jouer sur la flexibilité du substrat pour étendre et enrober l'organoïde avec un maillage d'electrodes[11]. A ce jour, seulement deux équipes se sont intéressées à développer des MEAs capables de mesurer des activités extracellulaires dans les trois composantes du plan de l'organoïde. Chacune d'elles a établi une stratégie pour mesurer ces activités 3D : l'équipe de Soscia et al.[12] s'est penchée sur la courbure mécanique de sondes en polyimide, tandis que l'équipe de Shin et al.[13] a proposé de superposer des sondes en silicium. Bien que ces techniques semblent répondre à une problématique majeure à laquelle font face les neurobiologistes, à savoir enregistrer l'activité neuronale en 3D, il convient d'énoncer quelques inconvénients de ces systèmes développés. Soscia et al.[12] présentent 80 microélectrodes intégrées à des sondes en polyimide qui ont été mécaniquement courbées pour mesurer l'activité neuronale en 3D sur 45 jours de mesure. Mais seulement 70 microélectrodes continuent de répondre après les 45 jours de mesure. Ils n'expliquent pas pourquoi certaines électrodes ne répondent plus, il semblerait que le système de courbure puisse affecter la fonctionnalité des électrodes. Shin et al.[13] ont présenté des sondes de silicium empilées comportant au total 63 microélectrodes. Une cartographie détaillée de la structure 3D du réseau neuronal a bien été établi après 14 jours de mesures. Malgré ces résultats probants, la durée des mesures est courte et ne permet pas de conclure si le système de mesure est viable à long terme pour l'organoïde. Le substrat utilisé pour la culture de l'organoïde est du silicium qui peut freiner la prolifération cellulaire[14].

Support MEA	Mesures **2D**	Mesures **3D**	Nombre d'électrodes	Cartographie du réseau	Type de milieu	Durée de la mesure	Réf
Electrodes platine (d=30µm) sur verre	✓	✗	64	✗	iPS humain (cortex)	6 mois	Trujillo et al[8]
Electrodes piliers en or (h=110µm) sur verre	✓	✗	60	✗	Tranche de cerveau de rat (hippocampe)	1 jour	Spanu et al[9]
Electrodes platine (d=18µm) sur C-MOS	✓	✗	19 584	✓	Cellules neuronales d'embryon de rat	18 jours	Yuan et al[10]
Electrodes or (d=10µm) sur maille en parylène	✓	✗	9	✓	iPS humain (cortex)	8 jours	Park et al[11]
Electrodes platine (d=50µm) sur sondes polyimide courbés	✓	✓	80	✓	iPS humain (cerveau)	45 jours	Soscia et al[12]
Electrodes platine (d=60µm) sur sondes silicium	✓	✓	63	✓	iPS humain (moelle épinière)	14 jours	Shin et al[13]

Tableau III. 1: Caractéristiques des MEAs utilisées pour le suivi des cultures 3D cérébrales.

Nous avons opté pour une autre stratégie qui consiste à coupler une MEA planaire et un implant pour enregistrer des activités extracellulaires 3D de la culture neuronale 3D. Contrairement aux deux précédentes méthodes appliquées par Shin et al.[13] et Park et al.[11], nous avons étudié la

culture neuronale 3D sur le long terme, soit sur 36 semaines. Nous traiterons dans ce chapitre des signaux enregistrés avec les microélectrodes de la MEA planaire (2D) et de l'implant (3D) avec leurs possibles corrélations.

3.2 METHODES D'ENREGISTREMENT

Lorsqu'une impulsion électrique se propage à proximité d'un neurone, un champ électrique de faible intensité est généré autour de la membrane cellulaire (Figure III. 3). Une microélectrode peut détecter les changements du champ extracellulaire, elle va dans ce cas-là détecter à plus ou moins grande distance de la membrane ce champ généré. Selon la taille des électrodes on obtiendra un enregistrement d'un neurone unique (5-30 µm) ou d'un ensemble de neurones (30-100µm).

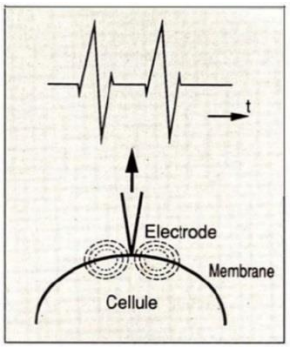


Figure III. 3: Mesure extracellulaire de champs de potentiels à partir d'une électrode.

Le champ extracellulaire généré est un potentiel d'action ou une séquence dense de potentiels d'action est définie comme un burst[15]. La Figure III. 4 montre un exemple de d'enregistrement extracellulaire, l'axe vertical représente l'amplitude du signal enregistré qui est rapporté en µV et l'axe horizontal représente la durée d'enregistrement qui peut varier de quelques millisecondes à quelques minutes. Comme le montre la Figure III. 4, l'amplitude de crête à crête représente le signal extracellulaire ou le bruit[15] est défini à l'aide d'un programme Matlab conçu par l'équipe « NeuroMEA » et avec la valeur seuil du bruit fixée à 5,5 SD.

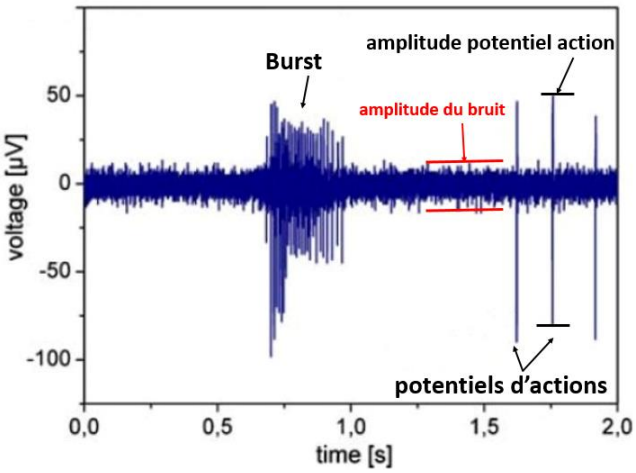


Figure III. 4: Un exemple d'enregistrement spontané d'une activité neuronale à partir d'une microélectrode. Illustration de potentiels d'action, d'un burst et du bruit de mesure sur 2s d'enregistrement.

Le signal extracellulaire est de plus faible amplitude que le signal intracellulaire, il peut varier de quelques dizaines de µV[15] à quelques mV[16] selon le type des électrodes, le type de neurones et leur distance aux électrodes.

3.2.1 Mesure du bruit

Contrairement aux mesures intracellulaires où l'amplitude est élevée et le signal peu bruité, les mesures extracellulaires sont quant à elles de très faibles d'amplitudes (10-100µV) car le signal provient de variations du champ électrique externe lors de la transmission d'un potentiel d'action. Le bruit est quant à lui de l'ordre d'une centaine de µV, ce qui peut rendre la détection de l'activité neuronale difficile. Pour mieux maitriser le bruit, il en faut connaître la source. Il existe trois sources de bruit omniprésentes :

- L'électronique de mesure (les instruments : d'amplification, filtre, conversion analogique du signal)
- La microélectrode de mesure (taille, impédance)
- L'échantillon de tissu nerveux (mouvement du fluide, température, conductivité…)
- Le bruit mécanique de l'environnement de mesure

Le bruit biologique n'est pas maîtrisable, il dépend de l'état du tissu nerveux. Quant au bruit de l'électronique de mesure, il dépend des appareils de mesures et peut être réduit dans une certaine mesure mais cela suppose l'utilisation de composants électroniques plus coûteux. Néanmoins le bruit provenant de la microélectrode peut être maîtrisée, il est lié à l'impédance d'interface entre la microélectrode et le tissu nerveux. L'impédance doit être la plus faible possible de manière à réduire le bruit[17]. Ainsi, afin d'améliorer la qualité du signal enregistré, des microélectrodes sont fonctionnalisées pour augmenter leurs surfaces et diminuer leurs impédances. En effet, en raison de leurs faibles diamètres (10-50µm), les microélectrodes présentent de fortes impédances, ce qui réduit significativement la qualité du signal en réduisant significativement le rapport Signal/Bruit (Signal To Noise ou SNR)[18,19].

3.2.2 Détection des potentiels d'actions (PA)

Avec le bruit de l'électronique et le signal bioélectrique de faible amplitude (quelques pico volt), il est très critique d'extraire le signal bioélectrique. C'est pourquoi un amplificateur est intégré sur l'instrument de mesure des MEAs. Néanmoins cela rajoute du bruit électronique au bruit omniprésent issu du milieu biologique, il est donc plus difficile d'extraire le signal électrique neuronal. Des filtres sont alors configurés dans le système électronique de mesure des MEAs et permettent de sélectionner le domaine de fréquence qui nous intéresse. Pour détecter des potentiels d'actions (PA) issus du réseau de culture neuronale, une fenêtre de fréquence est généralement choisie[20].

Comme l'illustre la Figure III. 5, un traitement du signal est nécessaire afin d'identifier les types de neurones en activité. Pour cela, le signal brut (Raw Data) est d'abord filtré suivant le domaine de fréquence qui nous intéresse, dans ce cas-là il est situé sur [300-3000] Hz. Après le filtrage, un seuillage dans cette bande fréquentielle est effectué. Celle-ci consiste à déterminer une

amplitude de seuil permettant de détecter fidèlement les PA. Sa valeur est fonction du bruit enregistré (Raw Data) et ce bruit est de type Gaussien. Le seuillage ou la valeur seuil V_{seuil} est proportionnel à l'écart type du bruit gaussien, c'est-à-dire $V_{seuil} = k * \sigma$, où k est une constante typiquement entre 3 et 5 et σ est l'écart type du bruit. Cette valeur seuil est automatiquement calculée par les logiciels conçus pour la détection et la sélection des PA. Le choix de la valeur seuil est important, un seuil trop faible peut conduire à un nombre élevé de détections ne correspondant pas à des potentiels d'action alors qu'au contraire avec un seuil trop élevé des potentiels d'action pourraient ne pas être pris en compte.

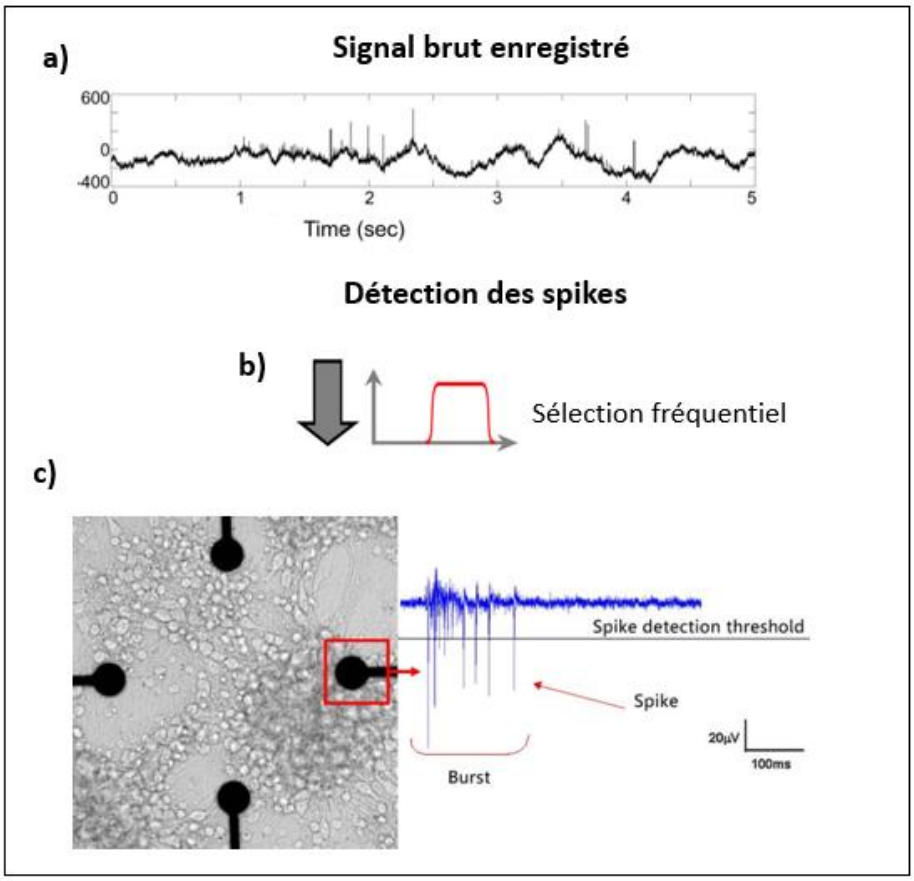


Figure III. 5: Étapes pour la détection des PA : (a) à partir du signal brut enregistré, (b) un filtre passe-bande est appliqué [300 Hz - 3000 Hz], (c) les pics sont détectés à l'aide un seuil d'amplitude appliquée aux données filtrées[21].

3.2.3 Caractéristiques des microélectrodes

Aujourd'hui les neuroscientifiques ont besoin de suivre l'activité d'un neurone individuel pour avoir une bonne résolution spatio-temporelle. Pour cela il est nécessaire d'utiliser des électrodes de faibles dimensions, de quelques dizaines micromètres à quelques centaines de micromètres, ce qui réduit la surface électrochimique effective et par conséquent affecte les performances d'enregistrement en augmentant l'impédance. L'impédance est définie comme la résistance aux courants alternatifs à l'interface électrode-milieu, plus l'impédance est importante, plus le signal enregistré est bruité ce qui dégrade la qualité du signal[22]. Pour cela, il est possible de diminuer les impédances des microélectrodes en augmentant la surface effective de l'électrode en utilisant des techniques de nanostructuration. Par exemple en rendant la surface rugueuse ou

poreuse, la microélectrode présente une plus grande surface active ce qui modifie ses propriétés électriques. Ainsi l'amplitude du signal récupéré ou le rapport signal sur bruit (SNR) peut être amélioré par l'ajustement de ce paramètre.

C'est ce que Seker et al.[18] ont montré en prenant des microélectrodes d'or de diamètre de 32µm pour mesurer l'activité extracellulaire d'une culture de tranche de cerveau. Le niveau de bruit était significativement élevé pour les électrodes standard et les activités extracellulaires des neurones étaient noyées dans le bruit (Figure III. 6). Pour diminuer le bruit et enregistrer tous les signaux électriques, ils ont structuré les électrodes de manière poreuse, ce qui a permis d'augmenter leurs surfaces actives et de diminuer leurs impédances. Le bruit évalué avec une électrode structurée est de 5,5µV tandis que pour une électrode standard Au, il est de 8,3µV.

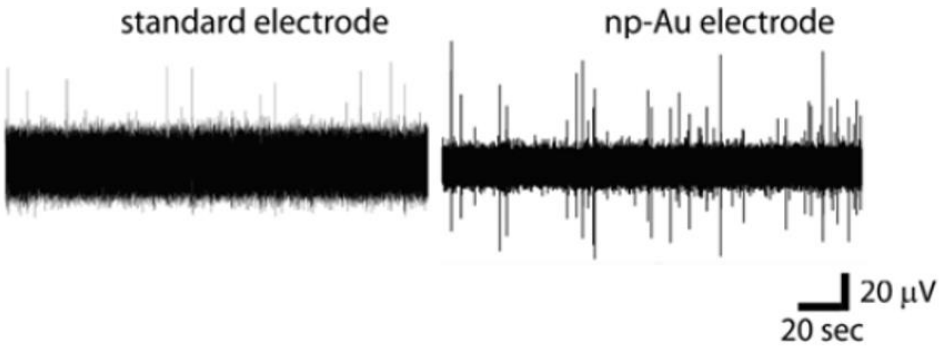


Figure III. 6: Enregistrements de l'activité spontanée d'une culture de tranche de cerveau. A gauche, enregistrement avec une électrode standard en or et à droite enregistrement avec une électrode poreuse en or : np-Au.

Des microélectrodes planaires de 10-30µm non traitées en or ou platine, présentent par exemple des impédances élevées autour 2 MΩ à 1 kHz[19]. À ce jour, des microélectrodes constituées de piliers d'or[23] (Figure III. 7. a), de platine poreux[24], ou de nanotubes de carbone[25] (Figure III. 7. b) ont été conçues pour maximiser la surface et diminuer l'impédance des électrodes jusqu'à 25-100 kΩ[19,26].

D'autres matériaux peuvent être utilisés comme revêtements d'électrodes, comme les polymères conducteurs : le polypyrrole (PPy)[27] ou le poly (3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDOT:PSS)[28] (Figure III. 7. c). Il est possible par dépôt électrochimique de polymères conducteurs, de nanostructurer les surfaces des microélectrodes de manière poreuse et rugueuse. Leurs surfaces actives sont significativement augmentées, ce qui diminue leurs impédances et augmente leurs capacités de stockage de charge ou CSC (Charge Storage Capacity) (Figure III. 7. g). La CSC est calculée en intégrant la courbe courant/temps d'un balayage de potentiel par voltammétrie cyclique et permet d'évaluer la quantité totale de charges disponibles pour la stimulation. L'augmentation de la CSC augmente la capacité d'injection de charges d'une électrode en prévenant les réactions indésirables à l'interface électrode-tissu lors des stimulations[29].

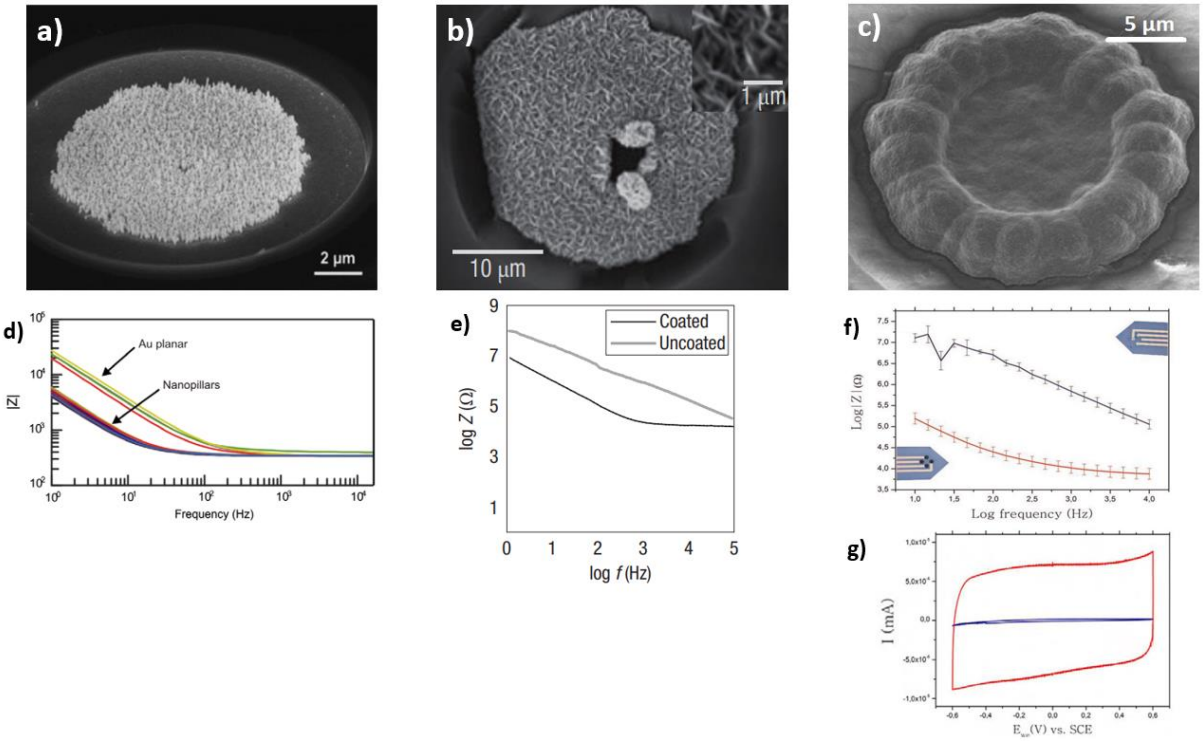


Figure III. 7: (a) Image MEB d'une microélectrode d'or modifiée avec des nano piliers d'or (h= 400 nm). (b) Image MEB d'une électrode (d=20µm) revêtues de nanotubes de carbone (CNT). (c) Image MEB d'une électrode fonctionnalisée avec un bio polymère de EDOT : PSS. (d) mesure d'impédance électrochimique dans une solution NaCl de l'électrode avec les nano piliers d'or et d'une électrode d'or planaire (0,35 cm²)[23]. (e) Mesure d'impédance électrochimique dans une solution NaCl montrant que le revêtement CNT a entraîné une diminution de l'impédance sur toutes les fréquences [1-11] kHz[25]. (f) Mesure d'impédance électrochimique dans une solution NaCl d'une électrode d'or nue (d=10µm) (bleu) et d'une électrode modifiée avec du PEDOT:PSS (rouge)[30].(g) CV entre -0,6 et 0,6 V vs Ag/AgCl, v=50mV/s dans milieu NaCl de électrode or nue (bleu) et de l'électrode modifiée avec PEDOT:PSS (rouge).

3.2.4 Fonctionnalisation des électrodes avec du PEDOT : PSS

Dans notre micro-dispositif composé d'une MEA commerciale (Multi Channel System) et d'un implant microfabriqué au LAAS, nous avons choisi de fonctionnaliser uniquement les électrodes de l'implant avec du PEDOT :PSS ce qui permet d'améliorer le rapport signal sur bruit comme l'ont montré des résultats obtenus dans le cadre de la thèse de Valentina Castagnola[30,31]. Les électrodes de la MEA commerciale n'ont pas été modifiées car la start-up Synaxys utilise depuis de nombreuses années des MEAs commerciales avec des microélectrodes d'or (d=100µm) non modifiées pour les mesures électrophysiologiques sur des cultures neuronales 3D. Nous serons ainsi en mesure de comparer les mesures obtenues avec la MEA non modifiée couplée avec notre micro-dispositif 3D avec des résultats précédemment obtenus par Synaxys.

Sur la Figure III. 8. b-c, on peut voir que le signal enregistré avec l'électrode d'or présente un bruit très important de 200µV lié à des interférences à 50 Hz masquant les potentiels d'action. Le bruit est réduit à 30µV pour des électrodes modifiées avec du PEDOT :PSS ce qui permet d'observer clairement les PA d'une centaine de µV. Dans les études réalisées également sur l'hippocampe de souris par A. Lecomte, il a été montré que le PEDOT :PSS assurait une stabilité des mesures électrophysiologiques sur le long terme jusqu'à 6 mois[32].

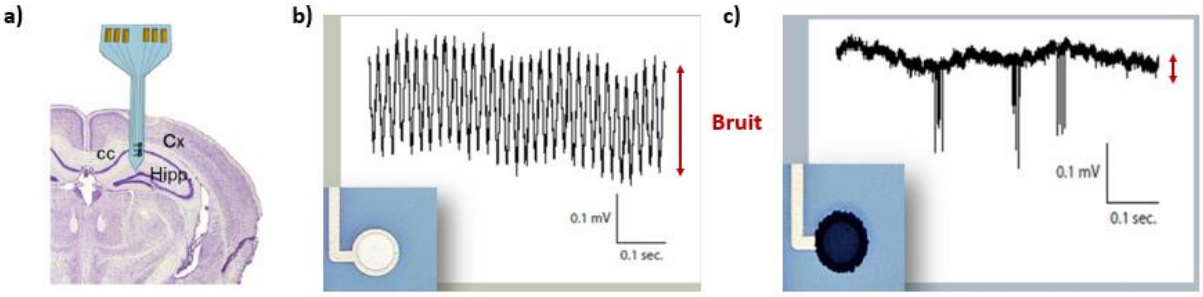


Figure III. 8: (a) Insertion d'un implant dans l'hippocampe d'une souris. Composé de microélectrodes d'or et de PEDOT:PSS. (b) Mesure du signal électrophysiologique avec électrodes (b) or, (c) PEDOT:PSS.

Le PEDOT : PSS est un polymère conducteur de la famille des polythiophènes. Il polymérise à partir du monomère EDOT (3,4-éthylènedioxythiophène) par voie chimique ou électrochimique (Figure III. 9). La synthèse chimique permet de réaliser des structures complexes mais il est relativement difficile de l'utiliser sur des électrodes métalliques. L'électrodéposition permet un dépôt direct sur l'électrode et les paramètres de dépôt (tension, temps de cycle) permettent le contrôle de l'épaisseur et de la rugosité du dépôt[33]. C'est un matériau stable dans le temps et biocompatible, ce qui est un élément important pour l'analyse de milieux biologiques[34]. L'avantage du PEDOT : PSS réside dans le fait qu'il restructure la géométrie de l'électrode en augmentant sa surface active ce qui diminue par conséquent l'impédance de l'électrode. Il possède également une grande capacité de stockage de charge (80mC/cm^2) ce qui lui permet d'avoir une bonne capacité d'injection de charge pour les stimulations électriques[28].

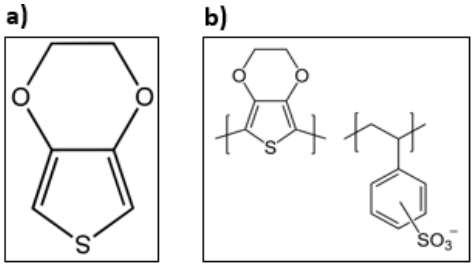


Figure III. 9: Figure : (a) Monomère d'EDOT ; (b) Polymère PEDOT : PSS.

3.2.4.1 Protocole de dépôt du PEDOT : PSS

Nous avons choisi la polymérisation du EDOT : PSS par voie électrochimique puisque qu'elle permet une déposition rapide et contrôlée du PEDOT : PSS sur les microélectrodes d'or de l'implant.

La polymérisation de l'EDOT implique l'utilisation de solutions non aqueuses, car le monomère présente une faible solubilité dans l'eau. Une méthode pour améliorer la solubilité de l'EDOT en solution consiste à utiliser du poly(styrènesulfonate) de sodium (NaPSS), il agit ainsi comme un contre-ion (ou dopant) sur l'EDOT, favorisant ainsi son électro-neutralité et sa dispersion en solution[35]. Les concentrations respectives de la solution EDOT:NaPSS sont de 10mM et 0,7%(w/v). L'électro-polymérisation permet de faire croître un film de polymère sur la microélectrode d'or de l'implant par oxydation électrochimique du monomère. Elle peut être effectuée suivant trois grandes méthodes électrochimiques : des méthodes à courant/potentiel

imposé (galvanostatique/ potentiostatique) et des méthodes de cyclages (CV) où le potentiel varie autour du potentiel d'oxydation du monomère. Des morphologies très différentes ont été obtenues selon le protocole de dépôt utilisé, comme par méthode galvanostatique et potentiostatique, le film PEDOT:PSS déposé est plat alors que le dépôt par CV la morphologie du PEDOT:PSS est sous forme d'un chou-fleur[36]. Le dépôt par CV à faible vitesse de balayage procure une meilleure homogénéité du dépôt, une grande stabilité dans le temps ainsi qu'une faible impédance[33].

Le dépôt PEDOT:PSS est donc réalisé par CV entre -0,7V et 1V vs Ag/AgCl à une faible vitesse de balayage de 10mV/s, sur deux cycles. Le premier cycle permet d'initier la polymérisation ce qui se traduit par une augmentation du courant autour de 0,6V-1V, c'est à ces potentiels que l'oxydation de l'EDOT s'amorce. Au cours du deuxième cycle apparaît le pic de réduction du PEDOT:PSS à -0,55V (Figure III. 10).

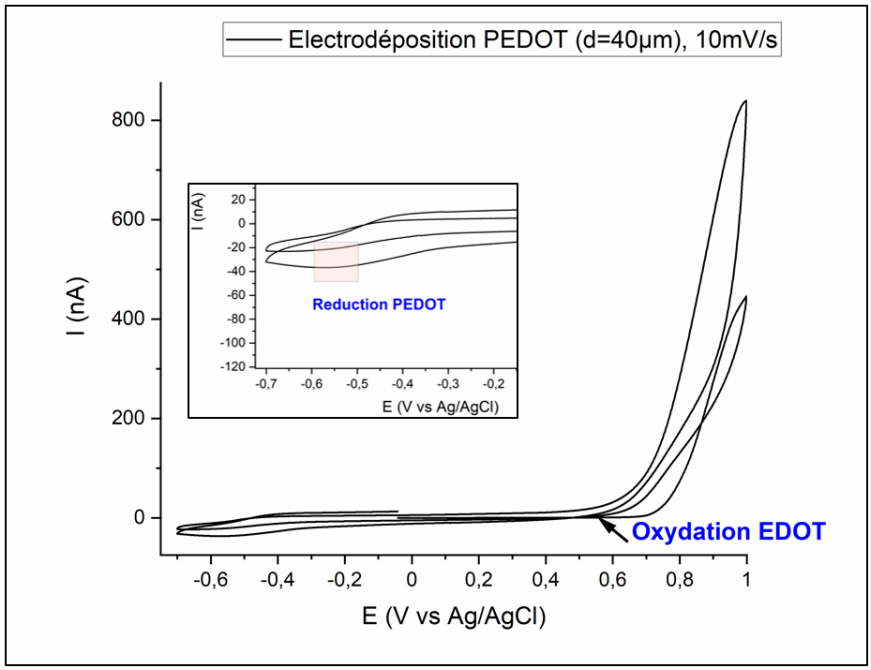


Figure III. 10: Electrodéposition du PEDOT:PSS sur électrode d'or d'implant (d=40µm) par CV à v=10mV/s vs Ag/AgCl.

La morphologie du revêtement PEDOT : PSS sur l'électrode d'or de l'implant est observée au microscope optique et au microscopie électronique à balayage (MEB). Les images MEB confirment une morphologie sous forme de chou-fleur du PEDOT:PSS déposé (Figure III. 11).

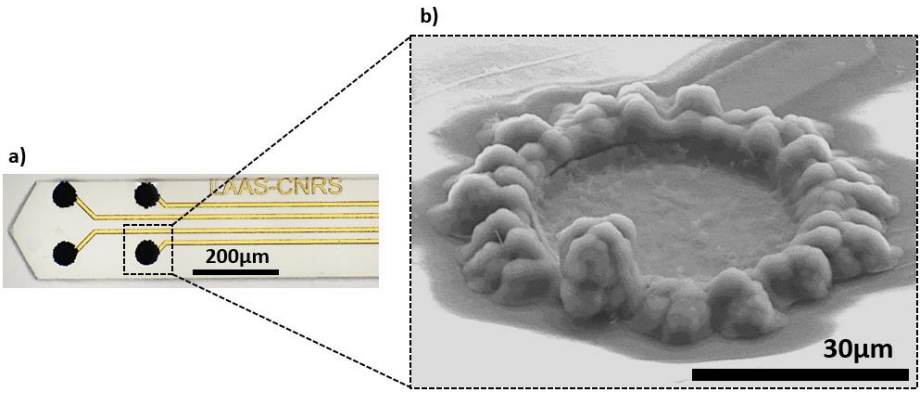


Figure III. 11: Electrodéposition du PEDOT:PSS sur les quatre microélectrodes d'or de l'implant : (a) Image optique et (b) image MEB.

3.2.4.2 Caractérisations électrochimiques

La CV caractéristique du PEDOT : PSS est réalisée entre -0,6 et 0,6 V vs Ag/AgCl dans une solution de PBS à v=50 mV/s, elle est comparée dans les mêmes conditions à la CV caractéristique de l'or. On peut observer qu'après le dépôt PEDOT:PSS, la capacité de stockage de charge ou CSC (Charge Storage Capacity) a augmenté. La CSC est calculée par intégration de la charge cathodique de la CV du PEDOT:PSS à faible vitesse de balayage (Equation III. 1).

$$CSC = \frac{1}{\nu A}\int_{E_c}^{E_a} |i|\, dE\, (C/cm^2)$$

Equation III. 1: CSC calculée à partir du courant mesuré (|i|) sur une plage de potentiel de[E_a,,E_c]. La CSC est fonction de la surface de la microélectrode A et la vitesse de balayage v.

La CSC de la microélectrode d'or nu est évaluée à 2,5mC/cm^2 et celle du PEDOT:PSS à 80mC/cm^2 (Figure III. 12. a). Cette amélioration est due à une plus grande surface de revêtement du PEDOT :PSS. C'est pourquoi le PEDOT :PSS est un matériau intéressant pour les stimulations de tissus neuronaux, car on peut injecter un grand nombre de charges sans déclencher de réactions faradiques qui pourraient endommager les tissus. Les mesures d'impédance confirment la modification de surface de l'électrode avec la diminution de l'impédance après électrodéposition de PEDOT:PSS sur l'or (Figure III. 12. b). Pour ce faire, une électrode d'or a été plongée en milieu PBS pour mesurer l'impédance Z sur une fréquence variant de 10 Hz à 10 kHz, puis une seconde mesure d'impédance est faite avec l'électrode de PEDOT:PSS. L'impédance moyenne à 1 kHz pour la microélectrode en or non modifiée est de 110 kOhm, tandis qu'après le dépôt électrochimique du PEDOT:PSS, l'impédance moyenne décroit à 15 kOhm. Comme mentionné dans le chapitre 2, la réponse de l'impédance dépend de la surface de l'électrode utilisée[37], plus celle-ci est faible et plus son impédance augmente. L'angle de phase du PEDOT:PSS augmente rapidement (Figure III. 12.c), passant de de 90° à 45° entre 10Hz et 2kHz puis à 15° à 10kHz tandis que l'angle de phase de l'or nu est environ égal à 90°. L'évolution de la phase de l'impédance pour la microélectrode modifiée suggère une augmentation de la surface active de l'électrode. Ces résultats montrent que le PEDOT :PSS agit comme matériau capacitif pour des fréquences inférieures à 2 kHz et comme matériau plus résistif pour des fréquences supérieures à 2 kHz[38].

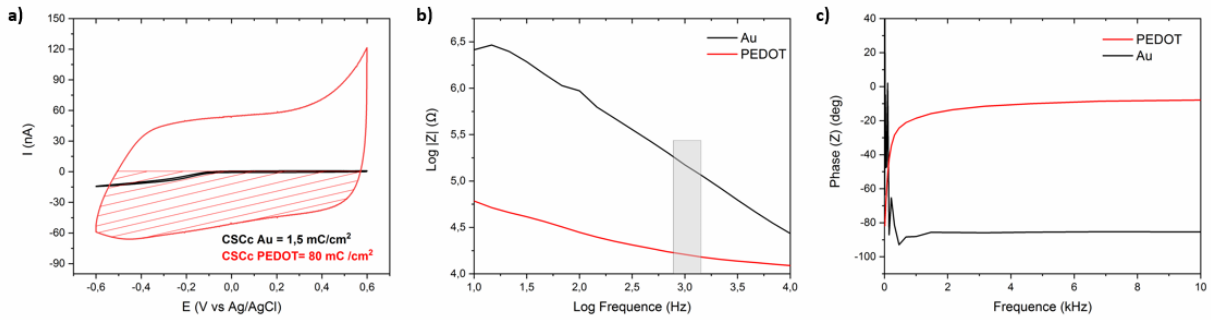


Figure III. 12: Caractérisations électrochimiques d'une microélectrode MEA (d=40µm) avant et après traitement PEDOT:PSS dans un milieu PBS : (a) CV sur microélectrode traitée (rouge) et non traitée au PEDOT:PSS (noir) entre -0,6 et 0,6 V vs Ag/AgCl, v=50mV/s. (b) Mesures EIS sur microélectrode traitée (rouge) et non traitée au PEDOT:PSS (noir) dans une gamme de fréquences de 100 Hz à 10 kHz. (c) Mesures de phase obtenues par mesure EIS sur microélectrode traitée (rouge) et non traitée (noir) sur une gamme de fréquences de 100Hz-10kHz en H_2SO_4 (0,5M).

En raison de sa faible impédance, l'électrode PEDOT:PSS nous fournira un rapport signal/bruit (SNR) supérieur pour la détection de l'activité neuronale.

3.3 DEROULEMENT DE L'ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITE ELECTROPHYSIOLOGIQUE D'UNE CULTURE NEURONALE 3D AVEC LE MICRO-DISPOSITIF 3D

3.3.1 La croissance d'une culture hippocampe 3D in vitro sur MEA

Dans la culture cellulaire 3D, des matériaux sont utilisés pour échafauder des structures 3D d'une culture neuronale. En effet, comme évoqué dans le chapitre 1, il existe des supports matrice notamment des matrigel ou des hydrogels qui assurent des interactions cellulaires 3D. D'autres méthodes, comme l'assemblage de billes de silice, peuvent être utilisées pour assurer une architecture 3D des cultures neuronales. C'est d'ailleurs cette méthode qu'emploie la start-up Synaxys[39] qui, à partir de cellules d'embryons de rats (ECS), développe des cultures cellulaires d'hippocampe en trois dimensions. A vrai dire, la culture d'un organoïde cérébral est définie comme un modèle de cerveau in vitro représentant toutes les zones cérébrales qui le constituent (l'hippocampe, le cortex, le cerveau antérieur et le cortex préfrontal). En revanche, Synaxys ne développe qu'une zone unique du cerveau : l'hippocampe. Bien qu'ils existent différents modèles de cultures cellulaires neuronales 3D dans la littérature, ces modèles sont souvent nommés à tort comme des organoïdes cérébraux.

Pour fournir un système d'échafaudage 3D à la culture neuronale, des billes de silice de 45µm de diamètre sont disposées sur trois niveaux, elles sont fonctionnalisées avec de la poly-L-Lysine (PLL) pour fournir une meilleure adhésion et maturation des cellules neuronales (Figure III. 13). Dans un premier niveau, des cellules neuronales sont cultivées dans un support en verre de la chambre MEA. Ensuite dans un 2ième niveau, des billes de silice sont introduites, elles sont fonctionnalisées avec de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) pour guider la croissance axonale[40] dans un système 3D. Les axones sont marqués avec des anticorps Tuj-1 (rouge) et smi-312 (bleu) (Figure III. 13. b-c), ils croissent à une vitesse de 50 µm/jour. Enfin, dans un 3ième niveau, des billes dans lesquelles se trouvent des cellules neuronales marquées avec la protéine Green Fluorescent Protein (GFP) sont introduites. Elles ont été marquées pour observer à l'aide du microscope confocal la croissance 3D dendritique (Figure III. 13. d).

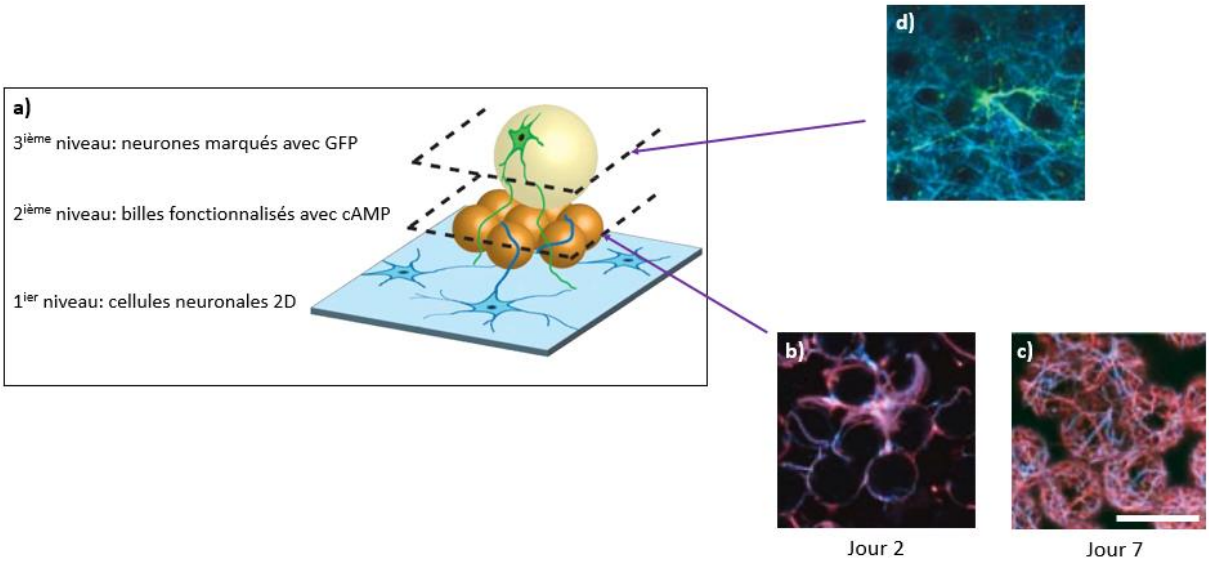


Figure III. 13: Schéma du concept de la croissance neuronale guidée par assemblement 3D de micro billes. (a) Sur le 1ier niveau, des neurones 2D sont cultivées sur verre. Sur le 2ième niveau, des micro billes de silice (d=45µm) sont fonctionnalisées avec cAMP pour guider la croissance axonale (bleu). Enfin sur le 3ième niveau, des micro billes de silice à la surface desquelles des neurones marquées avec du GFP (vert) sont positionnées pour observer la croissance des dendrites (vert) depuis la 1ier niveau jusqu'au 3ième niveau. Images produites par microscopie confocale (b) d'une croissance axonale sur billes et marquées avec smi-312 (bleu) et Tuj-1(rouge) au 2ième jour après l'introduction des billes, (c) forte densité axonale au 7ième jour après l'introduction des billes. (d) Croissance dendritique à travers les billes de silice marquées avec GFP (vert)[39]. Barre d'échelle :100 µm.

A l'aide de cette méthode, il est possible de guider l'ensemble des neurones qui s'y développent pour aboutir à une architecture 3D de la culture neuronale. L'utilisation des billes a montré que les cellules neuronales ne subissaient pas de stress mécanique, ce qui favorisait leurs développements et leurs maturations sur le long terme. L'étude fait part d'un volume neuronale de 75,000 cellules/mm^3 qui s'approche de la moyenne mesurée dans le cortex d'un rat[41] qui est de 91,000 cellules/mm^3.

3.3.2 Les neurones d'embryons de rats

L'étude réalisée au cours de ces travaux vise à étudier des neurones primaires d'embryons de rats. Ces cellules primaires proviennent directement d'un tissu cérébral et doivent être prélevées à chaque culture. Grâce à la collaboration établie avec le Dr. S. Pautot de la société Synaxys (Toulouse), nous avons pu bénéficier de leur expertise dans le domaine des cultures primaires de neurones. La dissection s'effectue dans le laboratoire Synaxys, où les neurones issus de l'hippocampe embryonnaire du rat sont récupérés. Cette dissection s'établit au 18ème jour de vie embryonnaire avec l'aide d'une loupe binoculaire. A ce stade de développement, la préparation contient majoritairement des progéniteurs neuronaux et des jeunes neurones (99% environ).

Afin de respecter les conditions physiologiques du milieu, la culture neuronale baigne dans un milieu Neurobasal (1X-ThermoFisher)[42] qui satisfait les exigences particulières de la croissance des cellules neuronales embryonnaires. Pour terminer, la culture est placée et maintenue à 37°C avec 5% de CO_2 dans un incubateur.

3.3.3 Mise en place de la culture neuronale dans le micro-dispositif MEA-implant

Comme déjà discuté dans le chapitre 2, la MEA 2D et l'implant sont intégrés ensemble par l'intermédiaire d'un capot qui à la fois recouvre la chambre MEA et fixe l'implant (Figure III. 14). Il est important de marquer le positionnement de l'implant sur la MEA pour qu'on puisse établir une cartographique de l'activité neuronale lors des mesures électrophysiologiques.

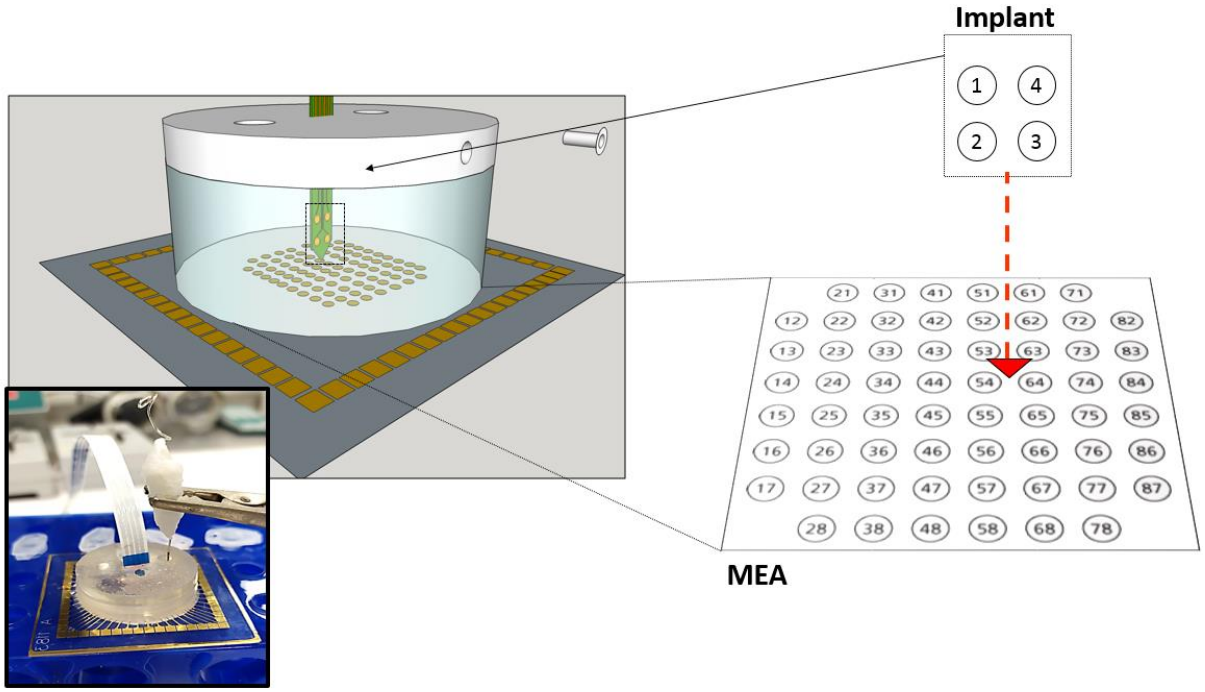


Figure III. 14: Assemblage du micro-dispositif MEA-implant. (a) Chambre de culture des neurones sur MEA, (b) implant, (c) schéma de l'implant fixé à la chambre MEA à l'aide d'un chapeau préalablement vissé à la chambre. (d) Positionnement de l'implant sur MEA à l'aide du microscope optique, (e) positionnement de l'implant en rouge autour des électrodes 53, 63, 54 et 64.

Une fois le micro-dispositif prêt, via des ouvertures ménagées dans le capot, seront introduits la culture d'hippocampe puis les micro billes. Une croissance 3D de la culture neuronale s'établira dans tout le volume de la chambre et recouvrira les électrodes de la MEA et de l'implant (Figure III. 15).

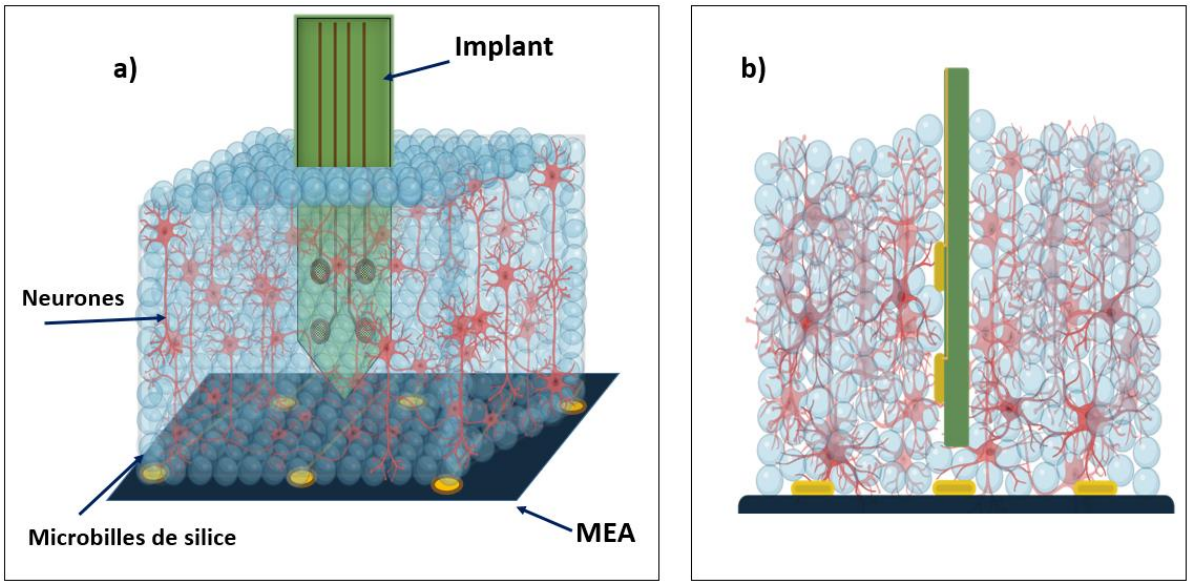


Figure III. 15: (a) Assemblage de la culture neuronale 3D dans le micro-dispositif MEA-implant. (b) Image en coupe de l'assemblage et du micro-dispositif.

Grâce à des observations par MEB, nous avons pu visualiser après plus de 10 semaines de culture comment la culture 3D d'hippocampe de rat interagissait avec l'implant. Sur la Figure III. 16, on observe l'état du réseau neuronal à la surface de l'implant, soit sur le long de l'axe Z. Il est possible d'apercevoir la croissance axonale depuis l'électrode PEDOT :PSS (Figure III. 16. a) qui peut se prolonger jusqu'à la face arrière de l'implant (Figure III. 16. c). Il est également visible depuis la surface de l'implant, une connectivité des neurones sous la forme d'un amas de fils entremêlés (Figure III. 16. b).

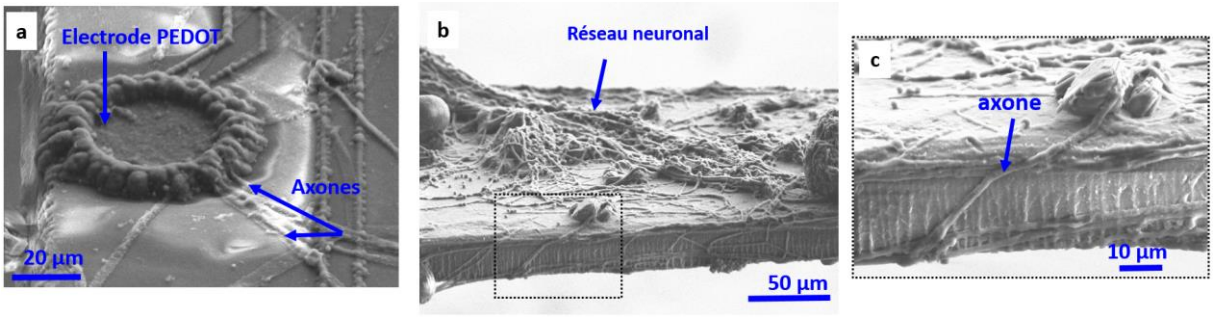


Figure III. 16: Etat du réseau neuronal sur l'implant après son extraction de la culture hippocampe de rat. (a) Croissance d'un axone le long de l'électrode PEDOT:PSS, (b) un amas de neurones connectés à la surface de l'implant qui se prolongent (c) jusqu'à la face arrière de l'implant.

3.3.4 Acquisition des données extracellulaires du micro-dispositif

La plateforme MEA-implant est un système autonome compact et portable pour les enregistrements extracellulaires (Figure III. 17). Elle se compose de deux systèmes de mesure, l'une est dédiée aux mesures électrophysiologiques à partir de la MEA planaire et l'autre aux mesures électrophysiologiques à partir de l'implant. Les deux systèmes sont composés d'une interface d'acquisition, d'un amplificateur et d'un convertisseur de signal. Un générateur de stimuli est uniquement intégré au système de mesure MEA. Les connectiques électriques entre les électrodes du réseau MEA et du système d'acquisition s'établissent de manière filaire (60

pins connectent les 60 électrodes de diamètre égal à 100 µm), alors que les connexions entre les 4 électrodes (diamètre égal à 40 µm) de l'implant et du système d'acquisition s'établissent de manière non filaire, avec l'aide d'un petit transmetteur wifi. Il y a à l'interface du système d'acquisition de la MEA, une entrée qui permet de relier le système d'acquisition de l'implant et de fournir des enregistrements synchronisés. Le système de synchronisation des données consiste à horodater les événements enregistrés par le micro-dispositif MEA-implant avec l'aide du logiciel MCS, autrement dit il y a un système de marquage qui indique le moment où l'événement s'est produit. Ainsi les événements seront triés en fonction de cet horodatage et seront traités afin de synchroniser les PA émanant des deux systèmes MEA et implant. Deux ordinateurs enregistrent les événements, l'un pour la MEA et le deuxième pour l'implant. Pour assurer des mesures synchronisées avec les deux ordinateurs, un son audio est délivré de leurs parts en début de mesure. La deuxième particularité de ce système d'acquisition est qu'il présente un système de stimulation. La stimulation est uniquement praticable à partir des 60 microélectrodes de la MEA et un suivi électrophysiologique en parallèle est possible avec l'ensemble des électrodes du système MEA-implant.

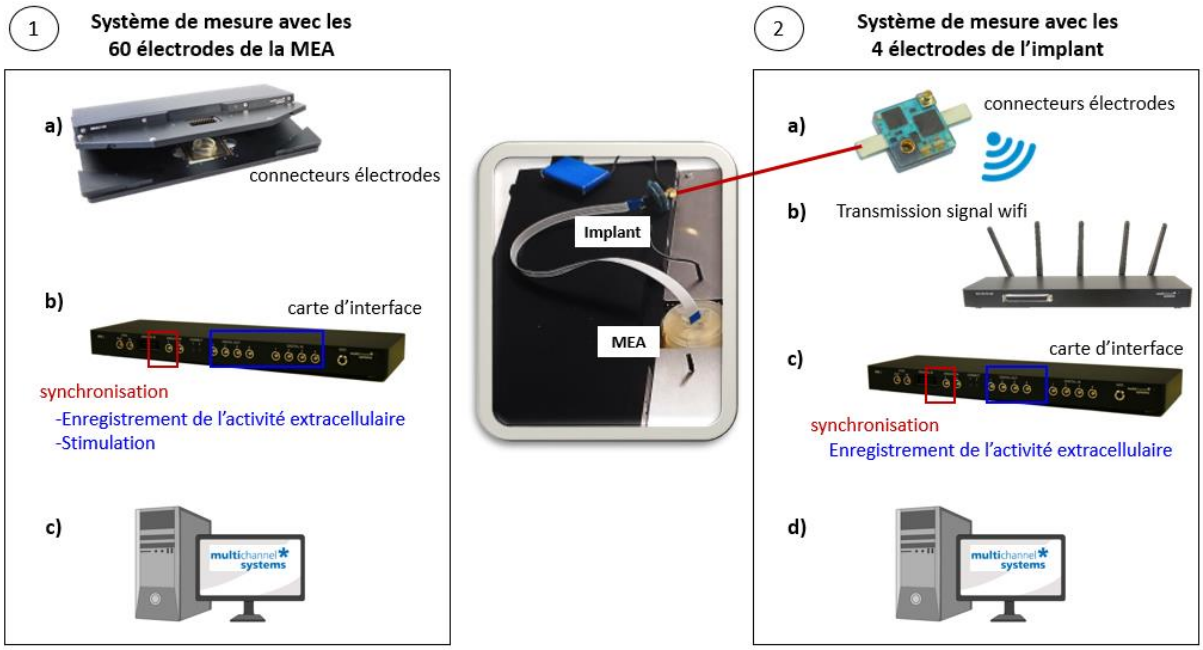


Figure III. 17: Enregistrements extracellulaires du micro-dispositif MEA-implant à partir de deux systèmes de mesure et de manière synchrone. (1) Système de mesure avec la MEA : (a) connecteurs des électrodes MEA connectés à (b) l'interface d'acquisition et relié à (c) l'ordinateur qui traitera les PA à partir du logiciel MCS. (2) Système de mesure avec l'implant : (a) connecteurs électrodes implant transmettant signal par wifi à (b) un transmetteur qui est relié à (c) l'interface d'acquisition et (d) à l'ordinateur qui traitera les PA à partir du logiciel MCS.

3.4 ANALYSE DES RESULTATS

L'analyse de l'activité neuronale de la culture 3D s'est déroulée sur 48 jours. Dans un premier temps, nous avons cherché à mesurer l'activité spontanée du réseau neuronal de la culture neuronale dans les trois dimensions, à savoir sur le plan XY avec la MEA et sur le plan Z avec l'implant. Dans un deuxième temps, nous avons stimulé électriquement certaines électrodes de la MEA afin d'évaluer les réponses aux stimuli qui nous permettront de cartographier le réseau

neuronal. Les stimulations ont été réalisées à plusieurs temps de façon périodique afin d'établir une cartographie temporelle du réseau.

3.4.1 Détection de l'activité spontanée de la culture neuronale 3D avec le micro-dispositif

Les MEAs planaires utilisent par défaut le logiciel MC-Rack pour les enregistrements des activités extracellulaires neuronales. Cependant durant les 18 premiers jours (DIV 18) de culture, nous étions dans la preuve de concept avec des enregistrements des activités extracellulaires du micro dispositif MEA-implant et nous avons utilisé deux logiciels en parallèle. L'un dédié à mesurer l'activité extracellulaire de la MEA planaire avec le logiciel MC-Rack et l'autre dédié à mesurer l'activité extracellulaire de l'implant avec Multi Channel Experimenter (MCE), le logiciel MCE étant une version évoluée de MC-Rack dans lequel se trouve en plus un système de mesure par wifi. L'utilisation des deux logiciels implique d'établir des traitements des données pour synchroniser les événements enregistrés. Nous avons alors traité en parallèle les données enregistrées afin d'établir une synchronisation des évènements des deux micro-dispositifs : MEA et implant.

C'est à partir du DIV 34 (**D**ay **I**n **V**itro) que les données extracellulaires de la MEA et de l'implant ont été enregistrées de manière synchronisée avec un système d'horodatage sous un logiciel unique : MCE. Les mesures se sont effectuées sur 7 semaines de culture. L'activité neuronale se renforce pendant les deux premières semaines de culture, nous avons donc commencé à enregistrer les premières réponses du réseau neuronal 3D à **DIV**18 (**D**ay ***I**n **V**itro*). La durée totale de l'enregistrement est fixée à 10 minutes d'enregistrement pour enregistrer suffisamment d'évènements pour permettre une analyse statistique tout en minimisant le temps que l'échantillon passe en dehors de l'incubateur. Les évènements synaptiques ou PA sont détectés par une méthode de détection par seuil avec les logiciels MC-Rack pour la MEA et Multi Channel Analyzer pour l'implant (Figure III. 18).

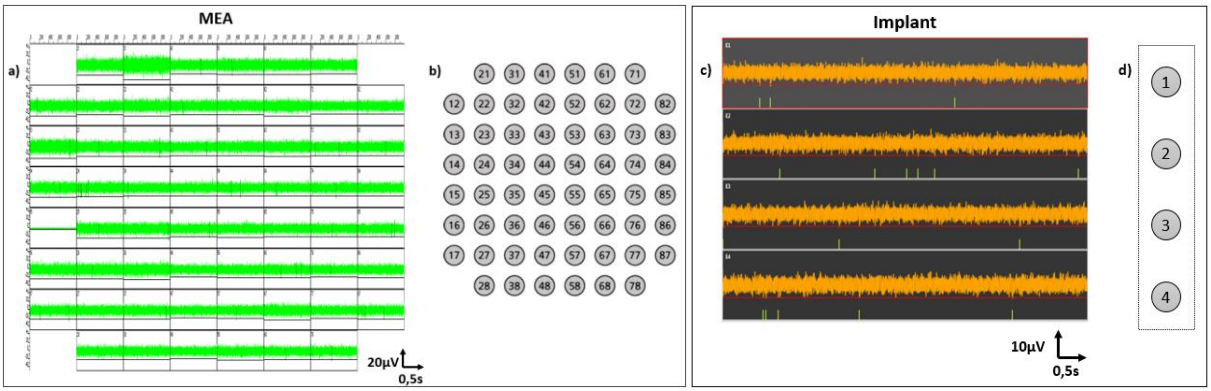


Figure III. 18: Enregistrement d'une activité spontanée de la culture 3D d'hippocampe de rat à DIV 18, avec (a) les 60 microélectrodes de la MEA et (c) les 4 électrodes de l'implant. Représentations schématiques du positionnement des électrodes : (b) MEA et (d) implant.

La méthode de ligne de base ou valeur seuil est déterminée à partir du bruit gaussien de l'électrode explicitée dans le paragraphe (3.2.2 Détection des PA). Cette ligne de base détecte

les variations d'amplitudes supérieures à la valeur seuil qui est égale à **-4 ∗ σ**, (σ : écart type calculé en fonction du bruit de l'électrode). Un exemple est visible sur la Figure III. 18 où chacune des électrodes de la MEA et de l'implant détectent des réponses de l'activité spontanée du réseau neuronal 3D à DIV18. Si l'on regarde par exemple la fenêtre d'une électrode de la MEA, la n°24 (Figure III. 19), apparaissent alors des PA baignant dans le bruit de l'électrode (vert). Ces PA ne sont détectés que si leurs amplitudes dépassent la valeur seuil (trait noir).

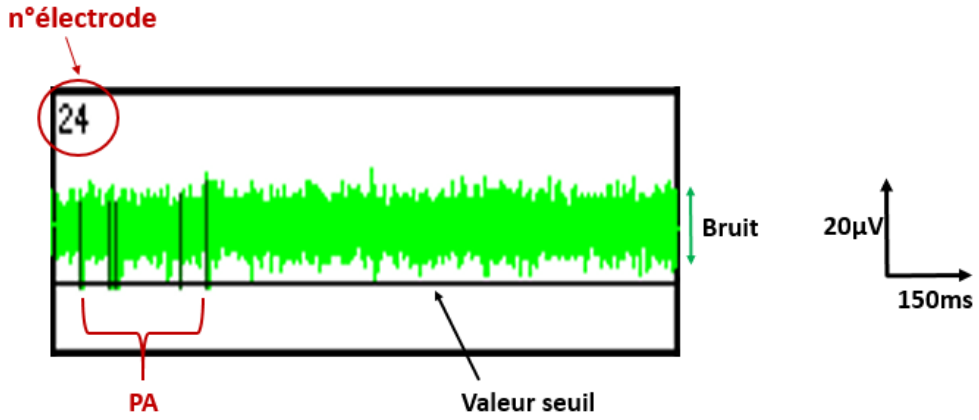


Figure III. 19: Sur l'électrode 24, un train de PA (noir) sont détectés à partir de la valeur seuil (trait noir).

Pour mieux visualiser l'activité spontanée du réseau neuronal 3D avec notre micro-dispositif, nous décidons de représenter uniquement les activités de 4 électrodes MEA: 21, 53, 54 et 77, où deux électrodes seront proches de l'implant (53 et 54) et deux autres électrodes éloignées (21 et 77) (Figure III. 20).

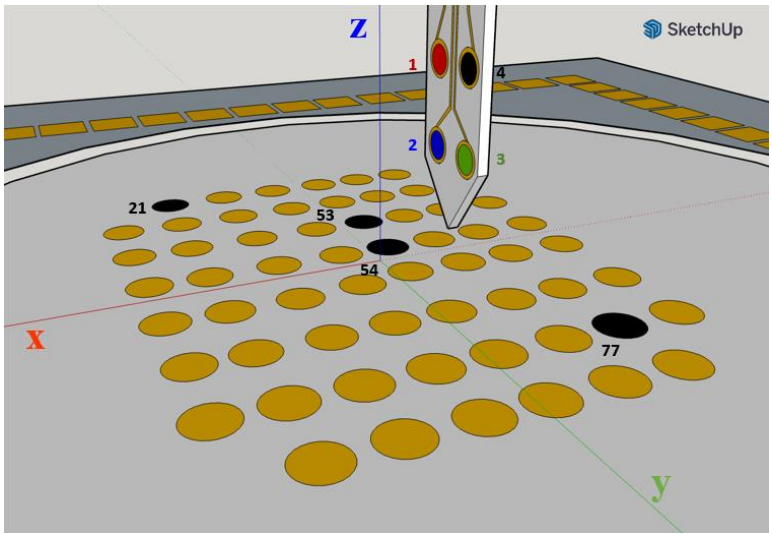


Figure III. 20: Représentation de la localisation des 4 électrodes de la MEA : 21, 53, 54 et 77 face aux 4 électrodes de l'implant.

3.4.1.1 Détection spontanée des PA

Nous représentons sur la figure ci-dessous (Figure III. 21), un extrait de 10 secondes d'enregistrement à DIV 18 du signal brut filtré [300Hz-3000Hz] des 4 électrodes MEA (à gauche) et des 4 électrodes implant (à droite). Dans le signal global enregistré, des PA d'un

groupe de neurones sont détectés et représentés schématiquement par ce qui est défini dans la littérature comme « spike raster plot ». Comme discuté précédemment, ces PA sont détectés à partir d'une valeur seuil calculée. On peut tout d'abord noter que la valeur du signal enregistré par l'implant n'est pas la même que celle enregistrée par la MEA, c'est parce que les tailles des électrodes de la MEA (d=100µm) sont 2,5 fois plus grande que les électrodes de l'implant (d=40µm). Par conséquent les électrodes de la MEA collecteront beaucoup plus de signal émanant d'une population de neurones plus grande que les électrodes de l'implant ; comme ces électrodes captent une somme de signaux émanant de neurones qui se trouvent à des distances variables et que l'intensité du champ électrique est inversement proportionnelle à la distance, on ne peut donc détecter avec certitude que les PA de plus forte amplitude.

En termes d'activité sur l'enregistrement effectué sur [325 s-335 s], l'implant et la MEA n'enregistrent pas la même densité d'activité. En effet, on peut observer sur la Figure III. 21 que le nombre de PA détectés par les électrodes de l'implant est plus élevé que ceux détectés par les 4 électrodes de la MEA. On note également que les 4 électrodes de la MEA montrent des périodes blanches plus longues, c'est-à-dire des périodes où il n'y a pas d'activité. Les fréquences d'activités spontanées mesurées avec le micro-dispositif 3D sont en accord avec les mesures électrophysiologiques effectuées sur des modèles de culture neuronales 2D et 3D[8,13,43]. Ces premières informations nous permettent de conclure qu'il y a bien un réseau dynamique établi sur le plan 3D de la culture neuronale.

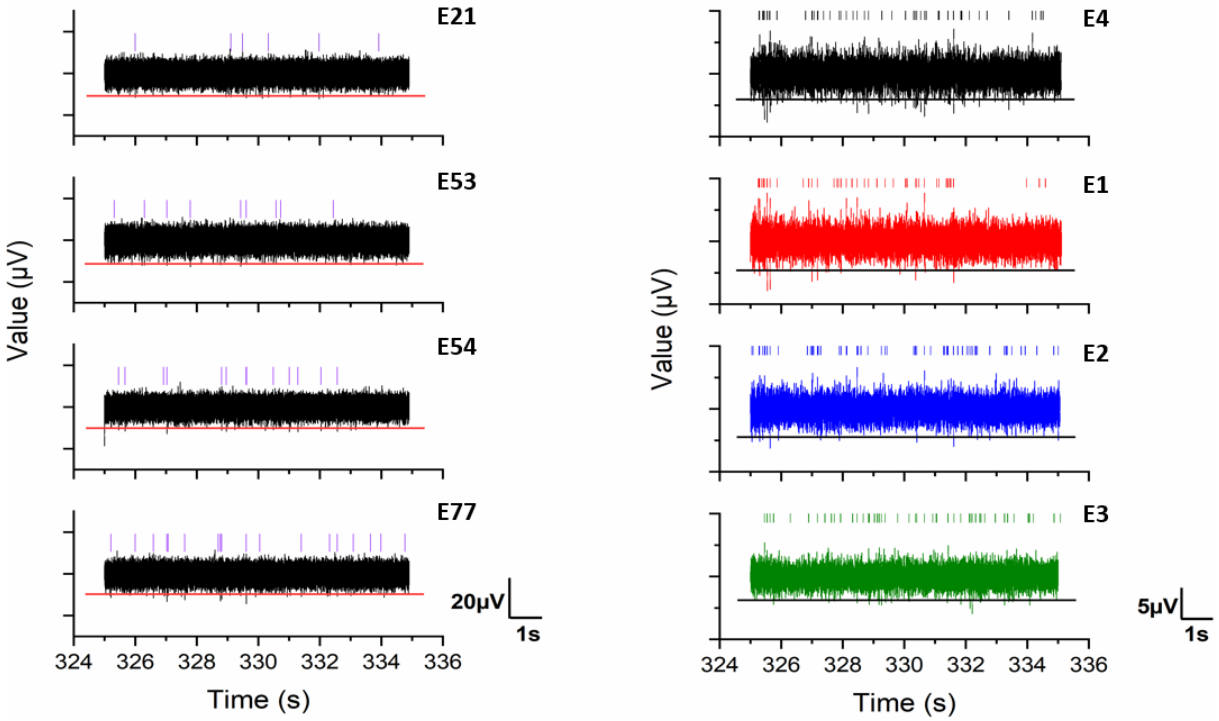


Figure III. 21: Activité spontanée d'une culture 3D d'hippocampe de rat à DIV 18 sur un extrait de 10 s d'enregistrement. Représentation des PA détectés sur cette période-là à partir du seuil de détection définis à -4 (valeur fixée par MCS). A gauche les PA détectés par les 4 électrodes de la MEA et à droite les PA détectés par les 4 électrodes de l'implant.

3.4.1.2 Fréquence des PA détectés

Pour avoir une meilleure compréhension sur le mode de fonctionnement du réseau 3D des neurones, nous avons évalué la fréquence des PA détectés avec le micro-dispositif MEA-implant. La fréquence des PA est mesurée sur 10 minutes d'enregistrement à DIV 18 par les électrodes de l'implant et de la MEA (Figure III. 22). On peut noter que, à seuil de détection équivalent, la fréquence des PA détectés avec les électrodes de l'implant est plus élevée que celle relevée par l'ensemble des électrodes de la MEA, soit une fréquence de [0,5 ; 1,3] Hz pour l'implant et de [0,2 ;0,8] Hz pour la MEA.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux 4 électrodes de la MEA étudiées précédemment, à savoir E21, E53, E54 et E77 dont deux d'entre elles sont proches de l'implant (E53 et E54) (Figure III. 22. b). On note que les fréquences des PA détectés par les électrodes E53 et E54 sont plus élevées (0,5Hz et 0,8Hz) que celles relevées par les électrodes E77 et E21 (0,2Hz et 0,3Hz). Ceci traduit une diversité spatiale de l'activité du réseau. Par exemple, au moment où a été réalisé la mesure, on observe une fréquence des PA plus importante sur la zone basse de l'implant avec les électrodes E2 (0,8Hz) et E3 (1,3Hz), alors que les électrodes situées vers le haut de l'implant E1 (0,6Hz) et E4 (0,5Hz) présentent une fréquence plus faible. Ces observations semblent montrer que le réseau 3D formé n'est pas homogène. En effet, les mesures ont été réalisées à DIV 18 lorsque le réseau 3D n'est pas encore à maturité.

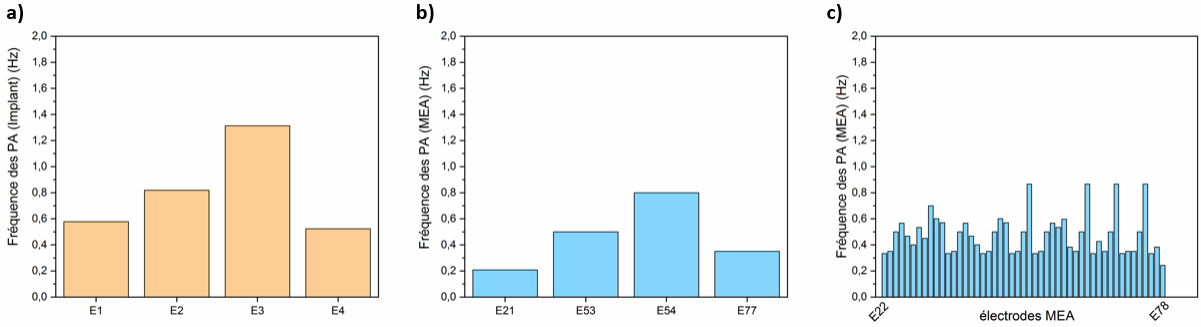


Figure III. 22: Fréquence des PA détectés (Hz) sur 10 minutes d'enregistrement d'une culture 3D d'hippocampe de rat à DIV 18 avec : (a) les électrodes de l'implant : E1, E2, E3 et E4 ; (b) les électrodes MEA :E21, E53, E54 et E77 et (c) avec l'ensemble des 60 électrodes de la MEA.

3.4.1.3 Analyse des PA détectés

Il est possible avec le logiciel de MCS de tracer la forme des PA. Celle-ci est souvent analysée en électrophysiologie pour identifier le type de neurone, car chaque neurone possède une signature extracellulaire. En effet, l'axone et ses ramifications dendritiques contiennent des récepteurs et des canaux ioniques spécifiques qui varient selon le type de neurone, ce qui va influencer la forme et l'amplitude du potentiel extracellulaire. Sur la Figure III. 23 sont représentés différents types d'activité de types : neurone moteur (rouge), neurone inhibiteur (vert) ou bien axonal (bleu). En effet, la forme des signatures extracellulaires varie suite à une hyperpolarisation plus longue ou plus courte. On ajoutera que la position de l'électrode de mesure affecte également la forme du potentiel extracellulaire[44].

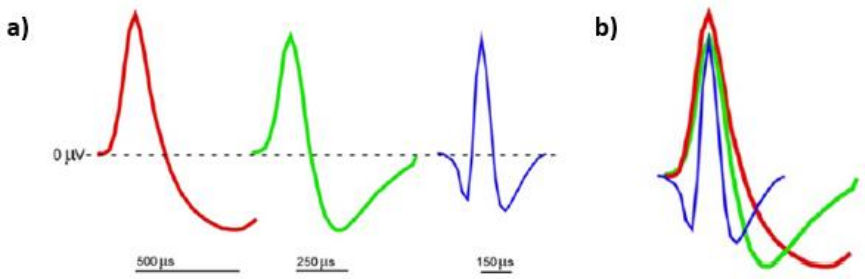


Figure III. 23: La signature extracellulaire d'un potentiel d'action varie selon le type de neurone. (a) Neurone moteur possède une plus grande largeur avec une hyperpolarisation de plus longue durée (courbe rouge) comparé au neurone inhibiteur (courbe verte). L'activité axonale est illustrée en bleu. (b) Superposition des différents types d'activités[45].

La principale difficulté réside dans l'identification des différentes formes de PA lorsque plusieurs neurones sont visibles sur une même électrode. En général, l'identification des PA est vérifiée soit manuellement par un expert ou soit avec des algorithmes qui analysent les caractéristiques telles que la largeur du PA, l'amplitude crête-à-crête du PA ou encore les pentes du PA[46–48]. Pour notre part, nous avons identifié quelques formes de PA appartenant à certains groupes de neurones. Au vu du nombre de PA détectés par l'implant et la MEA, nous n'établirons pas une analyse comparative entre les formes des PA car cela nécessite un algorithme. Nous avons donc tracé la forme des PA détectés à DIV18 par les 4 électrodes de l'implant et les 4 électrodes de la MEA.

Sur la Figure III. 24. a, sont représentés les PA détectés par les 4 électrodes de l'implant sur un enregistrement de 10s. Nous avons décidé de représenter des PA détectés par l'implant à diffèrent temps de l'enregistrement : t1=327s, t2=330,7s et t3=334,8s. On peut observer sur la Figure III. 24. b, que pour l'ensemble des PA détectés, la durée du PA est en moyenne égale à 2ms. Si l'on observe la forme des PA détectés par E2 aux différents temps, on remarquera que la polarisation et la dépolarisation des PA ne sont pas les mêmes ce qui signifie que ces PA appartiennent à différents groupes de neurones.

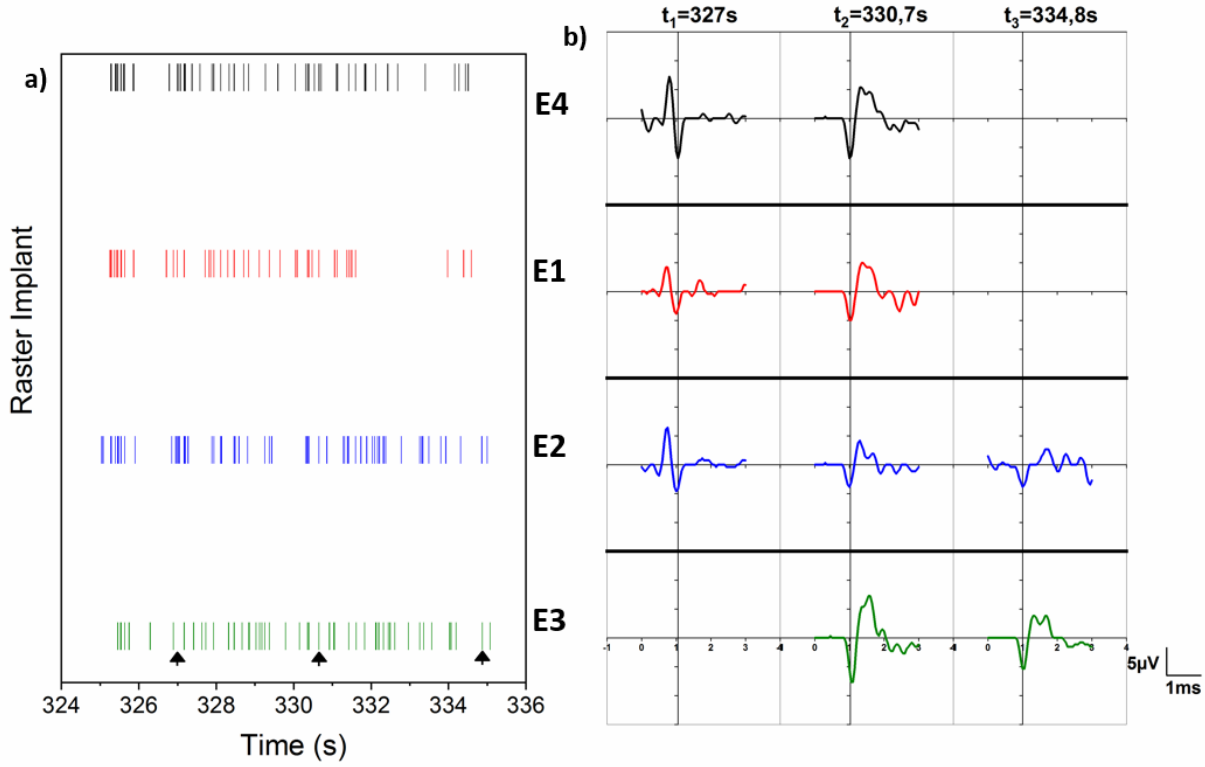
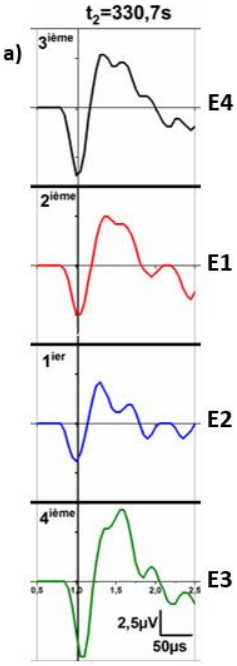


Figure III. 24: Activité spontanée d'une culture 3D d'hippocampe de rat à DIV 18 enregistrée avec les 4 électrodes de l'implant : électrodes du haut (E1 et E4) et les électrodes du bas (E2 et E3). (a) Raster plot des PA détectés sur 10 s de mesure avec l'implant, (b) Détail des PA détectés à trois temps répartis dans les 10 s d'enregistrement ; colonne 1 (t_1=327s); colonne 2(t_2=330,7s) colonne 3 (t_3=334,8s).

On notera qu'il y a des évènements synchronisés au même moment et sur différentes électrodes, comme c'est le cas pour le temps t2=330,7 s, où des PA de mêmes formes sont mesurés sur l'ensemble des électrodes de l'implant. En fonction de la localisation du neurone, son activité ne sera pas détectée sur toutes les électrodes, comme c'est le cas à t3 où seulement E2 et E3 répondent à l'activité du neurone. Ces électrodes sont d'ailleurs situées dans la zone basse de l'implant, le neurone transmet alors son signal sur les axes XY du plan. Il est également intéressant d'analyser le temps de transmission du signal neuronal à travers les électrodes. Prenons l'exemple des PA détectés à t2=330,7s correspondant à un même type de neurones (Figure III. 25), nous constatons qu'il existe un délai de transmission du signal du neurone à travers les électrodes de l'implant. Ainsi on pourra observer que la transmission du signal s'établit dans cet ordre : E2, E1, E3 et E4 (Figure III. 25.b-c) soit un délai de transmission du signal de 85 µs entre la première (E2) et la dernière (E4) électrode. Preuve est que l'axone se développe bien sur les 4 électrodes appartenant aux trois axes du plan (XY et Z). Montrant qu'il y a un délai de diffusion du PA sur les ramifications d'un même neurone dans l'espace.



b)

Ordre sortie du PA	Délai de transmission du PA (µs)
E2	t_0
E1	21
E3	41
E4	85

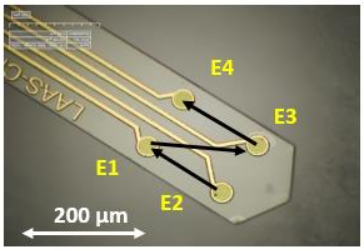


Figure III. 25: (a) Transmission du signal d'un neurone unique à travers les 4 électrodes de l'implant à t2=330,7s d'une culture à DIV 18. (b) Tableau qualifiant l'ordre de sortie des PA pour chacune des électrodes. (c) Image microscope optique des positionnements des électrodes sur l'implant.

Les observations sont quasi similaires pour les électrodes de la MEA (Figure III. 26). Nous avons tracé la forme des PA détectés par 4 électrodes de la MEA : E21, E53, E54 et E77. Les PA détectés sur la MEA rendent compte du développement du réseau sur le plan XY. Comme le diamètre des électrodes de la MEA est de 100 µm, les PA détectés peuvent appartenir à un ou plusieurs neurones. Il sera donc plus difficile ici d'établir une analyse des formes des PA. Les formes des PA détectés par les 4 électrodes aux temps : t1, t2 et t3 semblent montrer qu'il y a plusieurs groupes de neurones qui interagissent sur le plan XY. Sur la Figure III. 26.b, à t1=327s, les électrodes E21, E53 et E54 répondent ensemble de manière synchronisée à une activité d'un ou plusieurs neurones. La réponse du réseau n'est pas quasi systématique sur toutes les électrodes, comme on peut le voir sur l'électrode E77. D'ailleurs, l'observation visuelle sur l'ensemble des électrodes de la MEA montre qu'il y a des zones plus actives que d'autres pour des raisons inconnues dont seul des tests de pharmacologie ou des tests de stimulation électrique permettraient d'expliquer.

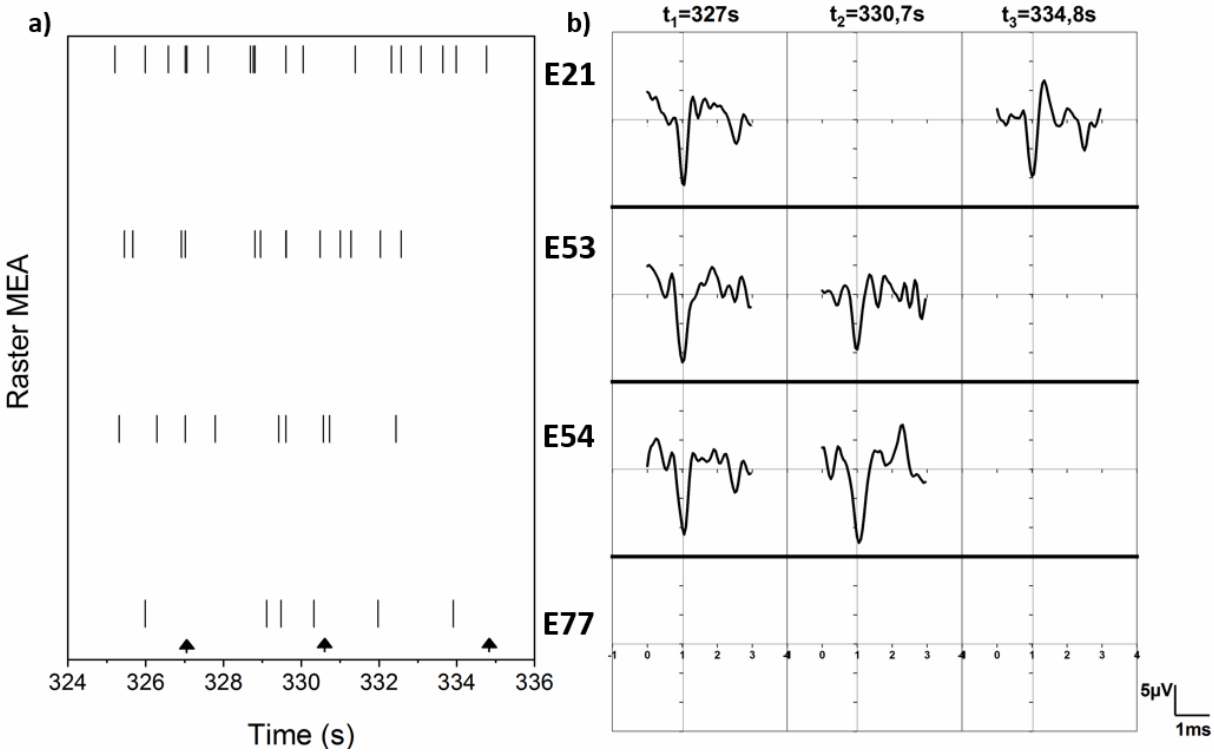


Figure III. 26: Activité spontanée d'une culture 3D d'hippocampe de rat à DIV 18 enregistrée avec les 4 électrodes de la MEA : E21, E53, E54 et E77. (a) Schéma de la transmission du signal d'un neurone à travers les 4 électrodes de l'implant à t_2=330,7s. (b) Raster plot des PA détectés sur 10 s de mesure avec la MEA. (f) Détail des PA détectés à trois temps répartis dans les 10 s d'enregistrement; colonne 1 (t_1=327s); colonne 2(t_2=330,7s) colonne 3 (t_3=334,8s). (c) Schéma de la transmission du signal de neurones à travers les électrodes 21, 53 et 54 à t_1=327s.

3.4.1.4 Conclusion

La mesure de l'activité spontanée de la culture à DIV18 avec l'aide du micro-dispositif 3D nous a permis de montrer qu'il y avait en effet un réseau dynamique qui s'établissait dans le plan 2D avec la MEA et 3D avec l'implant. Cela montre bien qu'il y a une existence d'une croissance neuronale dans les trois dimensions qui est impossible d'observer avec les MEA 2D[8,49]. L'analyse de la forme des PA permet d'identifier les différents types de neurone qui sont en activité. Dans le cas de l'implant, un PA spécifique a pu être enregistré sur plusieurs électrodes montrant un délai de transmission du signal pour chacune d'elles ce qui confirme bien l'activité dynamique d'un neurone dans une dimension 3D.

3.4.2 Suivi de la croissance neuronale dans l'espace et dans le temps

L'un des principaux objectifs de notre étude est de comprendre la dynamique des réseaux à l'aide de culture cellulaire neuronale 3D, autrement dit sur comment les synapses se transmettent de proche en proche les informations dans une configuration 3D. Afin d'étudier l'évolution du signal hippocampale dans l'espace, il est nécessaire de suivre le développement de l'activité bioélectrique du réseau. L'activité électrique du réseau peut être mesurée en mode spontanée ou bien en mode stimulé.

3.4.2.1 Mesure de l'activité spontanée

Dans la Figure III. 27, sont représentés les fréquences des PA (Hz) sur les 10 minutes d'enregistrement avec le micro-dispositif MEA-implant. Cette fréquence est mesurée à trois temps de la culture : DIV 18, DIV 34 et DIV 48.

Chaque carré représenté affiche une électrode appartenant à la MEA ou à l'implant. Le positionnement de l'implant dans le réseau MEA est marqué par un rectangle rouge, il est localisé à proximité des électrodes 53 et 54.

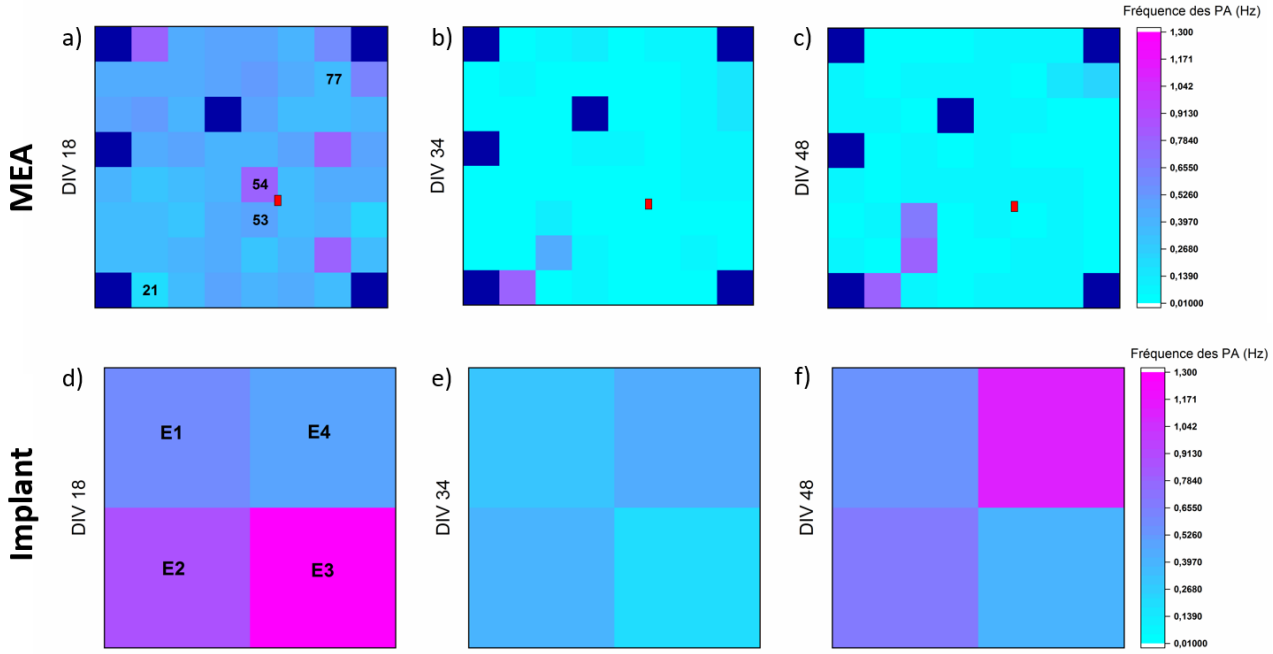


Figure III. 27: Mesure de l'activité spontanée du réseau hippocampe de rat avec le micro-dispositif MEA-implant et en fonction du temps : (a, d) DIV 18, (b, e) DIV 34 et (c, f) DIV 48. (a, b, c) Carte des électrodes MEA avec la localisation de l'implant (rectangle rouge) à proximité des électrodes 53 et 54. (d, e, f) Carte des électrodes de l'implant avec E1, E4 : les électrodes du haut et E2, E3 : les électrodes du bas.

A DIV 18, l'activité spontanée du réseau exprimée sur la MEA semble montrer une activité moyennement dynamique à certains endroits alors que sur l'implant, l'activité est plus dynamique. A DIV 34 et DIV48, l'activité du réseau diminue à la surface de la MEA, a contrario l'implant montre une activité dynamique. Ces observations nous permettent de valider qu'une activité du réseau s'est établie dans une configuration 2D et 3D. La dynamique du réseau semble être plus prononcée au cours du temps à proximité de l'implant. Il est impossible d'interpréter les raisons du dynamisme du réseau dans la configuration 3D plutôt que dans le 2D. La pharmacologie peut être un outil pour comprendre la croissance préférentielle du réseau avec l'utilisation de drogues chimiques. Elles permettraient en effet d'activer ou de bloquer certains groupes de neurones et ainsi d'identifier les zones de spécialisation.

3.4.2.2 Mesure de l'activité après stimulation électrique

Spécifiquement, un neurone est stimulé ou activé lorsque sa membrane neuronale est dépolarisée au-delà du seuil de déclenchement d'un potentiel d'action. Pour réaliser une stimulation extracellulaire, il faut apporter des charges négatives à proximité de la membrane neuronale. La stimulation s'établira à partir des électrodes de la MEA, MCS propose un générateur de stimulation électrique permettant de générer jusqu'à 4 voies de stimulation simultanées en tension à 1 V. Les électrodes de l'implant ne seront cependant pas stimulées du fait de l'absence du générateur de stimulation dans le système d'acquisition à l'implant.

Deux notions importantes doivent être prises en compte pour définir le choix des paramètres des stimuli et des électrodes de stimulation : l'amplitude, la fréquence et la durée du stimulus. Ces paramètres doivent réunir une charge « minimale » nécessaire à l'activation du neurone. Afin de garantir des temps nécessaires à la membrane du neurone pour se re-polariser, il est important d'apporter des temps de pause entre chaque stimulation. C'est pourquoi, dans notre protocole de stimulation qui dure 60 ms, nous introduirons des temps de pause de 10 ms entre chaque stimulation (Figure III. 28). Nous choisissons de stimuler 3 fois la même électrode afin d'établir une meilleure statistique des réponses enregistrées.

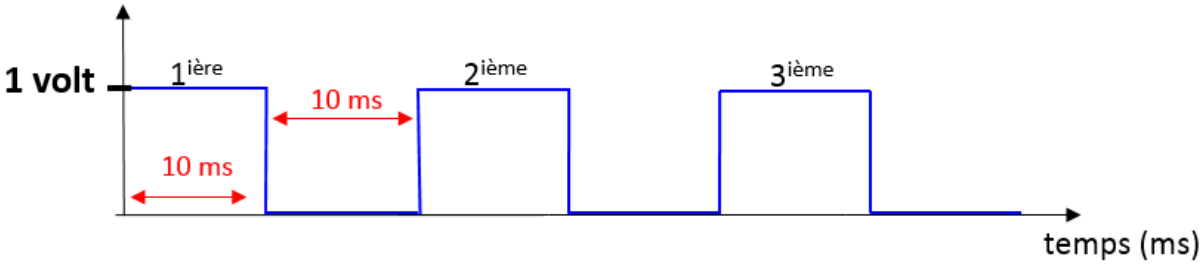


Figure III. 28: Protocole de stimulation en tension : à 1V sur une électrode MEA. Un train de 3 stimulations séparées chacune de 10 ms est appliqué à chaque électrode stimulé.

Pour évaluer la situation du réseau de l'hippocampe de rat dans le temps et afin de connaître son évolution spatiale, nous avons stimulé des électrodes de la MEA. Trois électrodes appartenant à la MEA : E53, E71 et E46 ont été stimulées aux DIV 28, DIV 34 et DIV 48, ces électrodes ont été choisies en fonction de leurs positionnements par rapport à l'implant, deux d'entre elles sont éloignées (E71 et E46) et une est à proximité de l'implant (E53). Le principe de la mesure de l'activité stimulée consiste à quantifier le nombre de fois auxquelles les électrodes du micro-dispositif (MEA et implant) ont répondu après les trois stimuli envoyés successivement aux électrodes E53, E71 et E46.

Sur la Figure III. 29 est affichée la réponse du réseau neuronal après la stimulation de l'électrode E53. Une zone active du réseau est visible sur la carte MEA, elle concerne les électrodes limitrophes à E53, cette activité est également ressentie par l'implant. Cela nous montre qu'il existe un groupe de neurones qui se développe dans cette zone : 2D et 3D. A DIV 34 et DIV 48, on remarque qu'à des zones précédemment actives il y a une baisse de l'activité et de manière concomitante avec la MEA et l'implant.

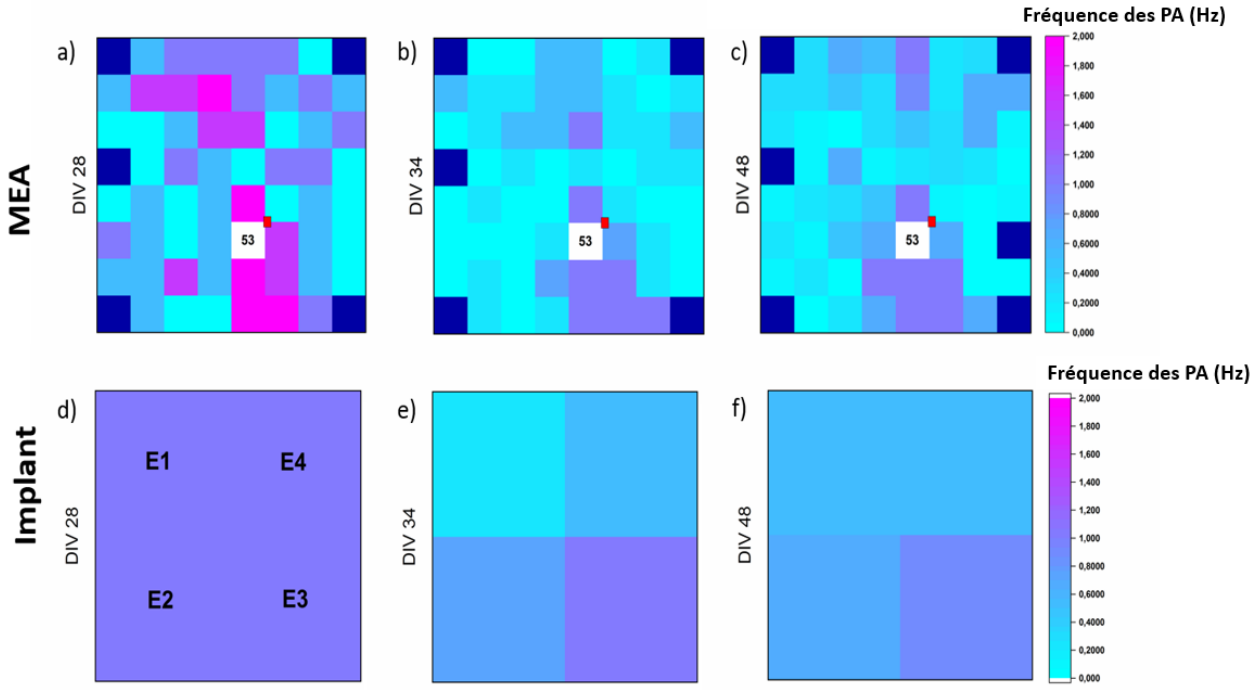


Figure III. 29: Mesure de la réponse de l'activité du réseau hippocampe de rat sur le micro-dispositif MEA-implant après stimulation de l'électrode E53 et en fonction du temps : (a, d) DIV 28, (b, e) DIV 34 et (c, f) DIV 48. (a, b, c) Carte des électrodes MEA avec la localisation de l'implant (rectangle rouge) à proximité de l'électrode 53. (d, e, f) Carte des électrodes de l'implant avec E1, E4 : les électrodes du haut et E2, E3 : les électrodes du bas.

Nous continuons sur la stimulation avec cette fois-ci l'électrode E71 qui est stimulée dans les mêmes conditions que la E53. Sur la Figure III. 30 la stimulation de E71 montre une réponse du réseau bien plus dynamique que celle du réseau stimulé avec l'électrode E53. Des zones éloignées de l'électrode stimulée montrent des réponses dynamiques du réseau, cela nous montre bien que la croissance neuronale s'étend sur toute la surface de la MEA. En revanche, sur l'implant à DIV 28 il semble que le ou les neurones stimulés en E71 n'ai pas encore fait de connexions proche de l'implant. Il faudra attendre DIV 34 pour commencer à observer des réponses de l'implant. Cela peut nous montrer que le réseau évolue dans le temps au gré de la croissance de ses neurones.

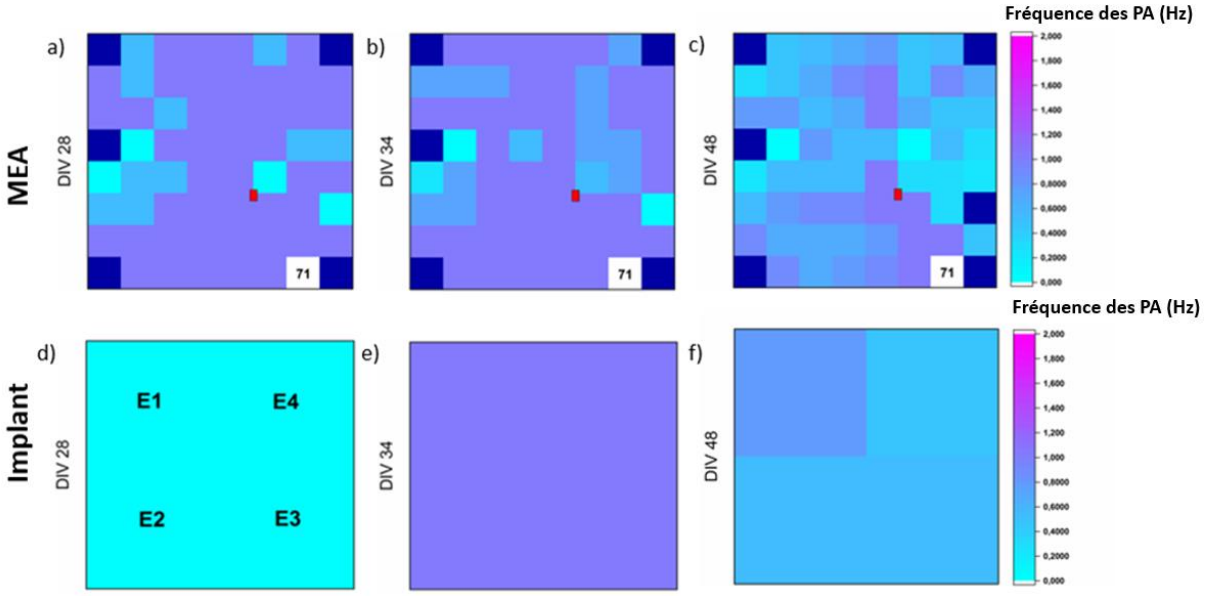


Figure III. 30: Mesure de la réponse de l'activité du réseau hippocampe de rat sur le micro-dispositif MEA-implant après stimulation de l'électrode E71 et en fonction du temps : (a, d) DIV 28, (b, e) DIV 34 et (c, f) DIV 48. (a, b, c) Carte des électrodes MEA avec la localisation de l'implant (rectangle rouge). (d, e, f) Carte des électrodes de l'implant avec E1, E4 : les électrodes du haut et E2, E3 : les électrodes du bas.

Pour terminer, nous avons stimulé une dernière électrode, la E46 et suite à cette stimulation des réponses sont observées aussi bien en surface (MEA) que sur l'implant (Figure III. 31). On pourra remarquer que les électrodes MEA ayant répondu à la stimulation aux DIV 28, DIV 34 et DIV 48 sont quasiment les mêmes. Il semble que suite aux stimulations répétées de la E46, le réseau établisse des connexions préférentielles, c'est comme une forme d'apprentissage du réseau. Sur l'implant, les électrodes les plus basses c'est-à-dire la E2 et E3 semblent elles aussi répondre préférentiellement à la stimulation de E46 plutôt que les électrodes hautes.

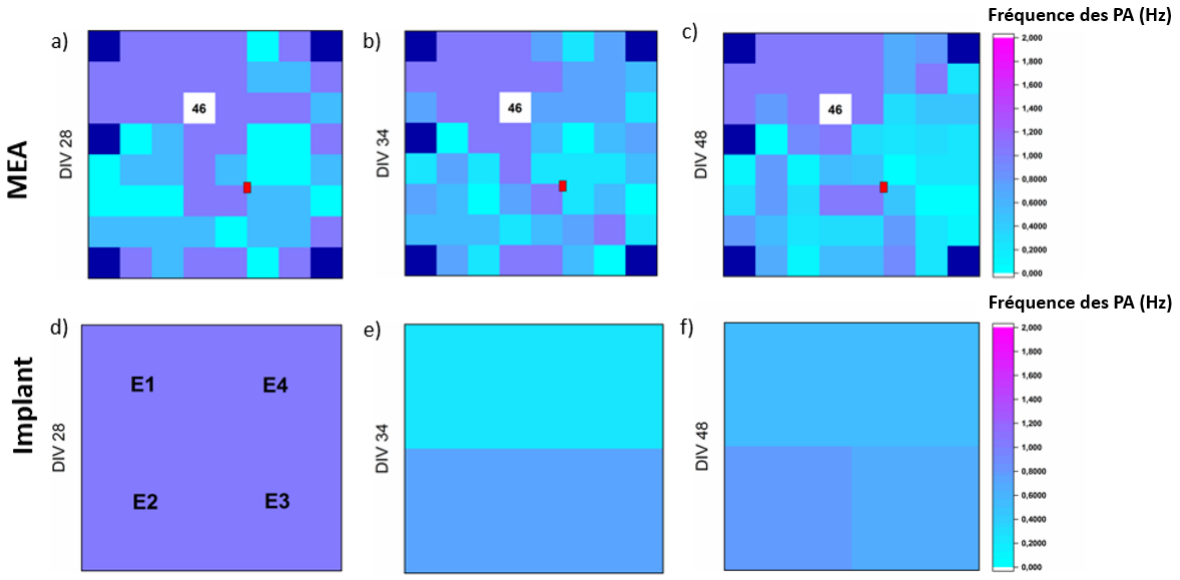


Figure III. 31: Mesure de la réponse de l'activité du réseau hippocampe de rat sur le micro-dispositif MEA-implant après stimulation de l'électrode E46 et en fonction du temps : (a, d) DIV 28, (b, e) DIV 34 et (c, f) DIV 48. (a, b, c) Carte des électrodes MEA avec la localisation de l'implant (rectangle rouge). (d, e, f) Carte des électrodes de l'implant avec E1, E4 : les électrodes du haut et E2, E3 : les électrodes du bas.

Pour conclure, la stimulation du réseau neuronal nous a permis de mettre en évidence que le réseau répondait aux stimuli quelle que soit sa configuration 2D ou 3D. Le réseau neuronal a montré qu'il s'étendait sur toute la surface de la MEA et sur le plan 3D. Nous avons pu observer que les réponses des neurones aux stimulations n'étaient pas quasi systématiques, des électrodes stimulées peuvent provoquer l'activité de certaines zones et d'autres non. Néanmoins lorsque les neurones répondent, ils nous offrent une visibilité des connectivités qu'ils peuvent établir dans le réseau.

Pour être plus précis dans la cartographie du réseau, comme Shin et al[11] l'ont fait, c'est de fournir les groupes de neurones actifs après la stimulation. Avec un algorithme identifiant les groupes de neurones actifs et avec un plus grand nombre d'électrodes, il serait possible d'analyser spatialement la connectivité de ces groupes.

3.5 ETUDE DU VIEILLISSEMENT DES ELECTRODES MEA COMMERCIALES

Il a été observé par la start-up Synaxys qu'un nombre considérable d'électrodes de la MEA commerciale vieillissent après quelques mois de mesure et produisent des signaux très bruités. Ceci empêche la mesure du signal du réseau sur le long terme, surtout lorsque le but des cultures neuronales 3D est d'étudier la croissance neuronale sur le long terme, à savoir 1 à 3 ans. Pour cela, un moyen pour réduire les bruits des électrodes consiste à utiliser comme discuté précédemment, un traitement des électrodes. De ce fait leurs impédances sont réduites ce qui permet d'améliorer la qualité de signal enregistré en augmentant le rapport signal sur bruit. Nous avons donc convenu d'établir un traitement des électrodes d'or d'une MEA commerciale avec du PEDOT:PSS, comme effectué avec les électrodes de l'implant. Nous proposons une

étude comparative entre des électrodes commerciales non traitées et traitées avec du PEDOT:PSS pour évaluer leurs vieillissements sur le long terme (9 mois).

3.5.1 Protocole expérimentale

Dans un premier temps nous réalisons une activation électrochimique des électrodes d'or dans un bain d'acide sulfurique (0,5M) pour deux MEA commerciales (ECO-MCS). Chacune d'elles comporte 60 électrodes d'or de diamètre 100µm (Figure III. 32). Les électrodes d'or sont nettoyées des impuretés organiques qui s'y déposent. Une fois l'activation terminée, les électrodes d'or sont rincées à l'eau DI et séchées.

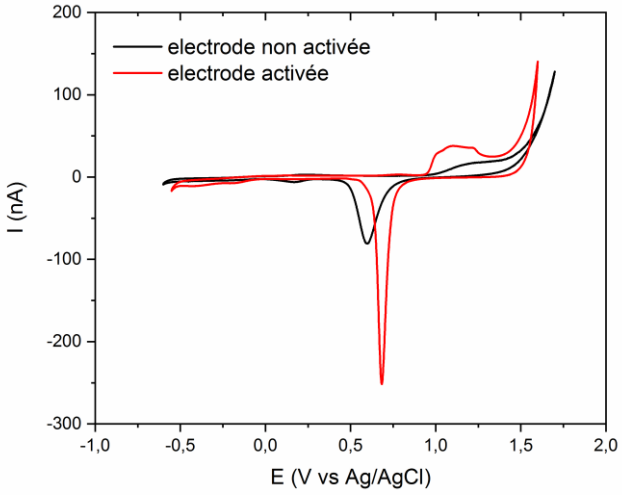


Figure III. 32 : CV d'une microélectrode d'or (d=100µm) cyclée entre -0,6V et 1,8 V vs Ag/AgCl à v=50mV/s dans H2SO4 avant (noir) et après son activation (rouge).

L'une des deux MEA est conservée pour les mesures électrophysiologiques, la deuxième MEA est quant à elle traitée avec du PEDOT :PSS sur l'ensemble des électrodes. Le dépôt PEDOT :PSS est donc réalisé par CV entre -0,7V et 1V vs Ag/AgCl à une faible vitesse de balayage de 10mV/s, sur deux cycles en suivant l'exemple du dépôt PEDOT:PSS sur implant. Malgré une plus grande surface des électrodes MEA, nous avons décidé de garder un dépôt de deux cycles afin d'optimiser le temps de dépôt pour les 60 électrodes (Figure III. 33), car un dépôt moyen de deux cycles pour une électrode dure 10 minutes.

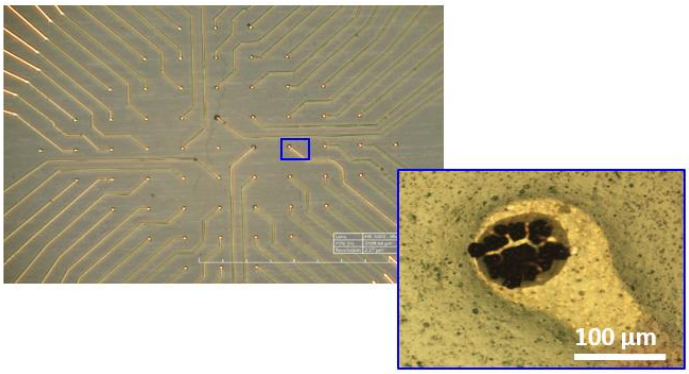


Figure III. 33: Image au microscope optique d'une électrode MEA traité avec PEDOT:PSS.

Par la suite, nous caractérisons les électrodes traitées avec du PEDOT :PSS par voltammétrie cyclique et par impédance. Nous notons une nette augmentation de la charge capacitive des électrodes après le traitement PEDOT:PSS (Figure III. 34. a). De même pour l'impédance, le traitement PEDOT:PSS montre une baisse de l'impédance à 1kHz : les 60 électrodes d'or non traitées ont une impédance moyenne égale à 90 kOhm alors que les électrodes traitées au PEDOT:PSS présentent une plus faible impédance de 48 kOhm (Figure III. 34. b-c). Une fois que les électrodes ont été traitées avec le PEDOT :PSS, elles sont rincées à l'eau DI et conservées en solution.

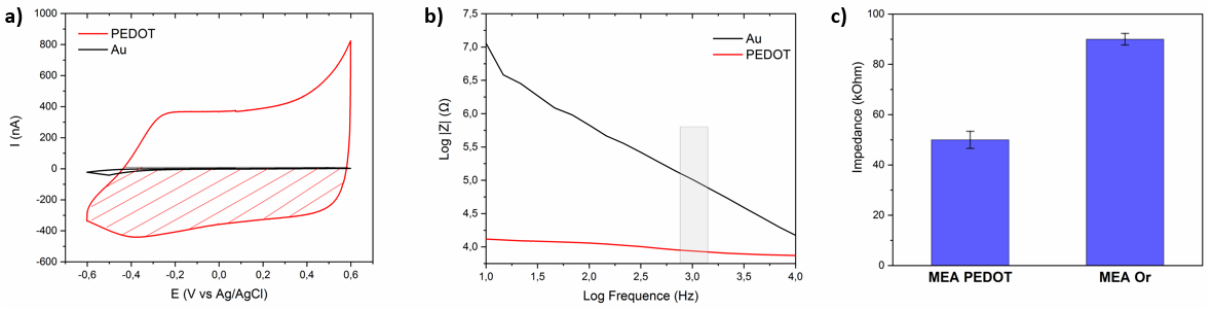


Figure III. 34: Caractérisations électrochimiques d'une électrode MEA (d=100µm) avant et après traitement PEDOT:PSS dans un milieu PBS : (a) CV d'une électrode traité (rouge) et non traité au PEDOT:PSS (noir) entre -0,6 et 0,6 V vs Ag/AgCl, v=50mV/s, (b) Mesures EIS d'une électrode traité (rouge) et non traité au PEDOT:PSS (noir) dans une gamme de fréquences de 100 Hz à 10 kHz.(c) Impédance moyenne mesurée à f=1kOhm pour les 60 électrodes traitées au PEDOT:PSS (MEA PEDOT) et non traitées (MEA Or).

3.5.2 Etude du signal enregistré avec les électrodes traitées et non traitées avec du PEDOT:PSS

Une fois le traitement PEDOT :PSS achevé sur l'ensemble des électrodes de la MEA commerciale, nous établissons une culture neuronale 3D au cœur de la chambre MEA. Nous ferons de même avec la deuxième MEA commerciale non traitée. La culture 3D est basée sur le même protocole que celui établi avec le micro-dispositif MEA-implant, à savoir d'une culture hippocampale d'embryons de rat sur des micro billes de silice.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact du traitement sur la mesure du signal. Pour cela, nous avons évalué la qualité de ce signal en nous concentrant sur le signal brut filtré. Sur la Figure III. 35, sont représentés à la première semaine de culture, des signaux bruts de 10 s de deux électrodes, l'une est non traitée (noir) et l'autre est traitée au PEDOT :PSS (rouge). Les valeurs crête à crête du signal brut enregistré par l'électrode traitée et non traitée ne sont pas les mêmes, l'électrode traitée présente un signal brut d'amplitude moyenne de 14 µV tandis que le signal brut de l'électrode non traitée présente une plus grande amplitude, soit 30 µV. On voit donc clairement que le traitement avec le PEDOT :PSS diminue l'amplitude du signal brut détecté. Cette diminution pourrait être causée par le traitement de l'électrode qui tend à diminuer le bruit de celle-ci.

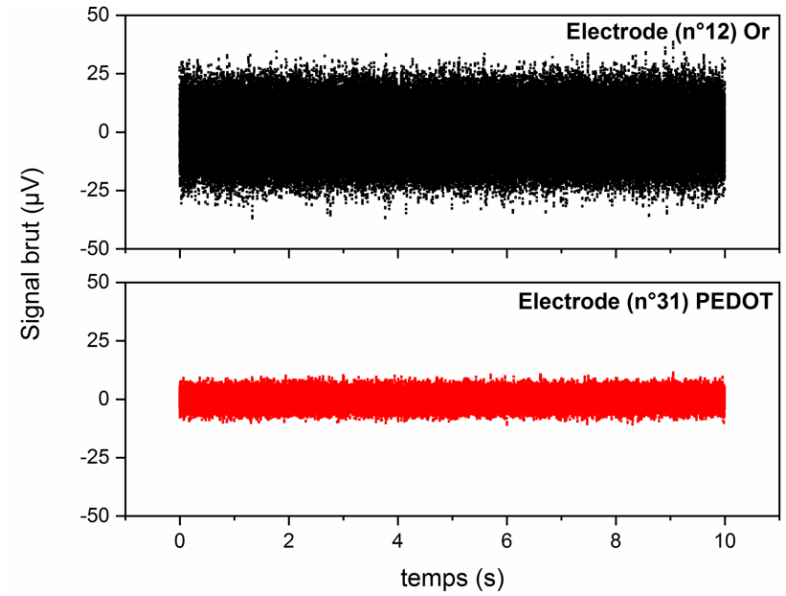


Figure III. 35: Signal brut (µV) enregistré sur 10 s d'une culture hippocampale d'une semaine. Mesure du signal brut (noir) d'une électrode non traitée et du signal brut (rouge) d'une électrode traitée avec PEDOT:PSS.

Le signal brut enregistré tend vers une distribution gaussienne car d'après l'enregistrement, le signal représente un nombre important de facteurs indépendants dont l'influence est moindre par rapport à la valeur de la grandeur étudiée. La distribution gaussienne est principalement déterminée par les valeurs « µ » et « σ », correspondant respectivement à l'espérance et à l'écart-type (Equation III. 2). C'est une fonction continue qui décrit la probabilité d'obtenir la valeur aléatoire x en fonction µ et σ.

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right).$$

Equation III. 2: Fonction de Gauss.

Cette fonction de distribution va nous permettre d'avoir un modèle pour analyser nos résultats de mesure à savoir l'intervalle de confiance ou le signal est à 99,7 % détecté. Cet intervalle de confiance nous le définirons comme la valeur seuil où l'on pourra détecter notre signal.

Par exemple, pour une distribution de Gauss, la probabilité de trouver x dans l'intervalle [µ-σ ; µ+σ] est égale à 68,3%, c'est-à-dire importante. La probabilité d'avoir un résultat compris dans

l'intervalle [μ- 3σ; μ+3σ] est de 99,7% (Figure III. 36). Par contre, la probabilité d'avoir un résultat en dehors de l'intervalle [μ-3σ; μ+3σ] est de seulement 0,3%.

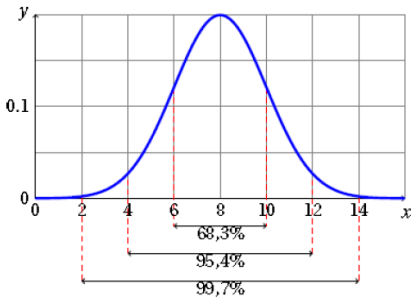


Figure III. 36: Distribution de Gauss.

Dans le cas des électrodes traitées et non traitées, nous avons établi un système de comptage des signaux effectué sur 10 s. L'objectif est de déterminer l'écart type à laquelle nous pourrons détecter intégralement le signal brut et si celui-ci varie en fonction du traitement de l'électrode. Nous avons donc établi des histogrammes représentant le nombre de comptages des points en fonction de l'amplitude du signal brut (μV) détecté pour les électrodes traitées et non traitées. Une fois les histogrammes tracés, nous les linéarisons avec la fonction Gauss afin d'extraire leurs écart-type (σ) (Figure III. 37).

Dans la Figure III. 37, sont représentés les écarts-types d'une électrode non traitée (Figure III. 37. a) et d'une électrode traitée (Figure III. 37. b). L'écart- type pour l'électrode non traitée est de 5 μV alors que pour l'électrode traitée, il est de 3 μV. L'écart-type est calculé pour l'ensemble des électrodes des MEA traitées et non traitées qui sont représentés dans la Figure III. 37. c. On obtient un écart type moyen de 3 ± 0,4 μV pour les électrodes traitées et de 4,73 ± 0,6 μV pour les électrodes non traitées. L'écart type est donc plus faible dans le cas où l'électrode est traitée, l'intégrale de confiance dans laquelle le signal brut est détecté est ainsi réduite. Si celle-ci est réduite, cela signifie que les valeurs sont moins dispersées et donc nous obtenons une meilleure qualité du signal.

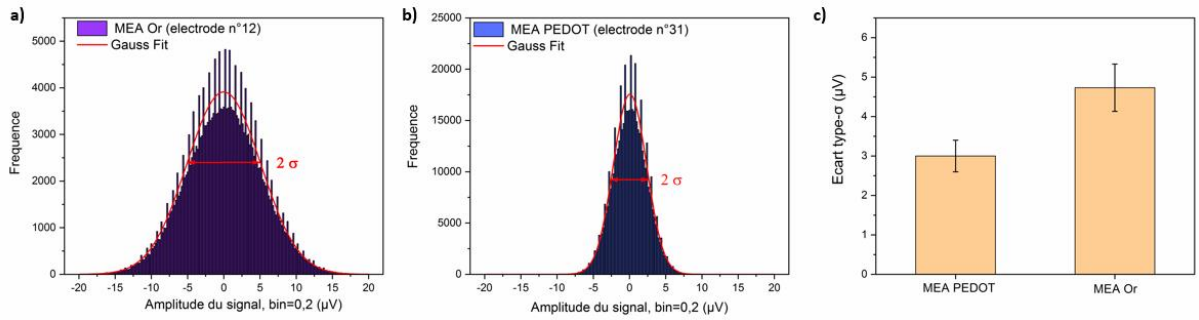


Figure III. 37: Histogrammes représentants les comptages des points (signaux) en fonction de leurs amplitudes (μV) et linéarisation des histogrammes avec la fonction Gauss pour la détermination de l'écart-type (σ), pour (a) l'électrode non traitée et (b) l'électrode traitée au PEDOT:PSS. (c) Ecart-type moyen pour l'ensemble des 60 électrodes d'une MEA traitée avec PEDOT:PSS et non traitée.

D'ailleurs nous avons analysé la qualité des signaux enregistrés en prenant compte des écarts-types calculés en fonction du signal brut et des amplitudes des PA détectés par le logiciel MCS. La qualité du signal définie comme le rapport Signal/Bruit ou **S**ignal to **N**oise **R**atio (SNR) est calculé à partir du ratio de l'amplitude du signal détecté et de la composante bruit. Il renseigne

de manière générale sur la qualité du signal détecté : plus il est élevé et meilleure est sa qualité. Nous avons choisi de calculer le SNR à partir des amplitudes détectées par le logiciel MCS et à partir des écarts-types calculés en fonction du signal brut (bruit) (Equation III. 3).

$$Signal/Bruit = \frac{Amplitude}{Ecart\ type}$$

Equation III. 3: Fonction SNR.

Sur la Figure III. 38. a sont relevées les valeurs d'amplitude des PA détectés par le logiciel MCS pour l'ensemble des électrodes qui composent la MEA traitée avec du PEDOT:PSS et la MEA non traitée. L'amplitude des signaux est d'environ 15 µV pour les électrodes traitées alors qu'ils sont de 35 µV en moyenne pour les électrodes d'or. Le traitement semble donc affecter l'amplitude des PA détectés. Néanmoins la qualité du signal semble quant à elle être améliorée avec le traitement (Figure III. 38.c), où les SNR calculés à partir de l'Equation III. 3 semblent plus élevés avec le traitement, soit de 4,8 ± 0,28 µV. Les SNR sont plus faibles avec les électrodes non traitées, soit de 3,9 ±0,4 µV. L'effet du traitement agit bien sur le rapport Signal/Bruit qui augmente. Le SNR est souvent associé à l'impédance de l'électrode, car en effet plus l'impédance est faible et plus le SNR augmente, ce que l'on peut observer sur la Figure III. 38. c, où le rapport Signal/Bruit est plus élevé pour les électrodes de faibles impédances.

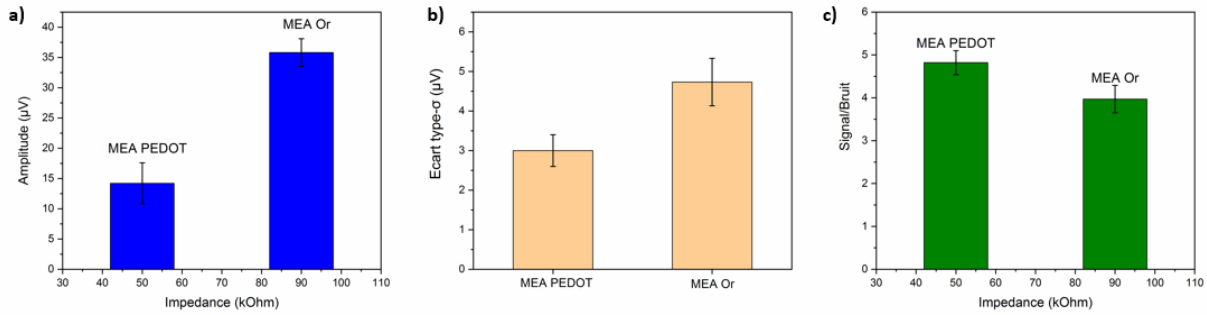


Figure III. 38: Evaluation du SNR des deux MEA : traitée au PEDOT:PSS et non traitée. (a) Amplitudes détectées à partir du logiciel MCS par les 60 électrodes d'une MEA traitée et non traitée. (b) Ecarts-types calculés à partir des fonctions gaussiennes pour MEA traitée et non traitée. (c) Evaluation du rapport Signal/Bruit en fonction des impédances des électrodes et du traitement.

En conclusion, cette étude a montré que le traitement des électrodes avec le PEDOT :PSS permet de diminuer leurs impédances en affectant leurs signaux bruts qui sont de meilleurs qualités que ceux des électrodes non traitées. Avec le calcul des écarts-types et du SNR, la qualité du signal enregistré est nettement améliorée avec le traitement des électrodes.

Nous allons voir dans le prochain paragraphe si le traitement améliore le signal enregistré sur des études long terme.

3.5.3 Etude du signal enregistré avec ou non traitement des électrodes commerciales sur le long terme

Dans un premier temps nous évaluons qualitativement selon les connaissances de l'expérimentateur (Synaxys) de la fonctionnalité de l'ensemble des électrodes traitées et non

traitées des MEAs. Nous déterminons visuellement la fonctionnalité des électrodes à partir de la valeur du signal du bruit détecté par l'électrode. Si cette valeur est supérieure à la valeur moyenne des bruits des 60 électrodes de la MEA, alors celle-ci sera considérée qualitativement comme dysfonctionnelle. Pour cela, nous avons enregistré le signal des cultures neuronales pendant 35 semaines et nous avons évalué la fonctionnalité des électrodes sur cette durée pour les électrodes traitées et non traitées. Par exemple, sur la Figure III. 39. a, à partir des électrodes non traitées, sont représentés des signaux d'une culture neuronale d'hippocampe de rat datant de deux semaines. L'enregistrement est ici effectué sur une fenêtre d'une seconde. La valeur du bruit crête à crête est de ± 15-20 µV pour l'ensemble des électrodes, on considère que les électrodes sont à cet instant fonctionnelles. Mais si l'on prend les mesures effectuées à la 35ième semaine de culture (Figure III. 39. b), on observera que la valeur du bruit a augmenté (± 40 µV), cela est probablement dû aux bruits présents dans le milieu de culture et au vieillissement des électrodes. Par contre certaines électrodes présentent un bruit beaucoup plus faible à la semaine 35 (± 5-15µV) et comparables à l'électrode de référence (± 12µV) que nous considérerons alors comme dysfonctionnelles. Nous établissons la même analyse sur les électrodes traitées avec du PEDOT : PSS. (Figure III. 40).

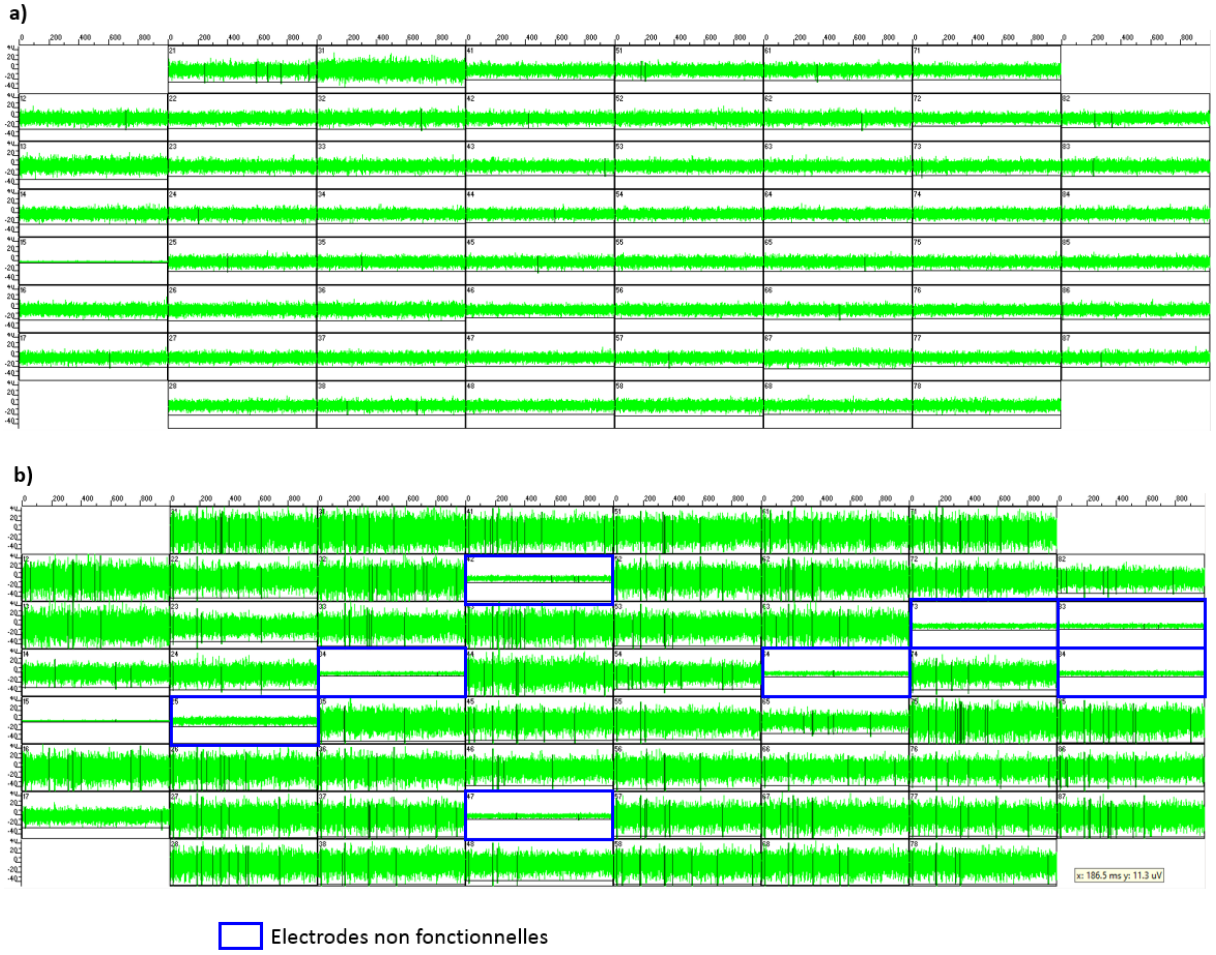


Figure III. 39: Enregistrement sur 1s, du signal électrophysiologique d'une culture hippocampale de rat avec une MEA non traitée. (a) à la semaine 2 et (b) à la semaine 35.

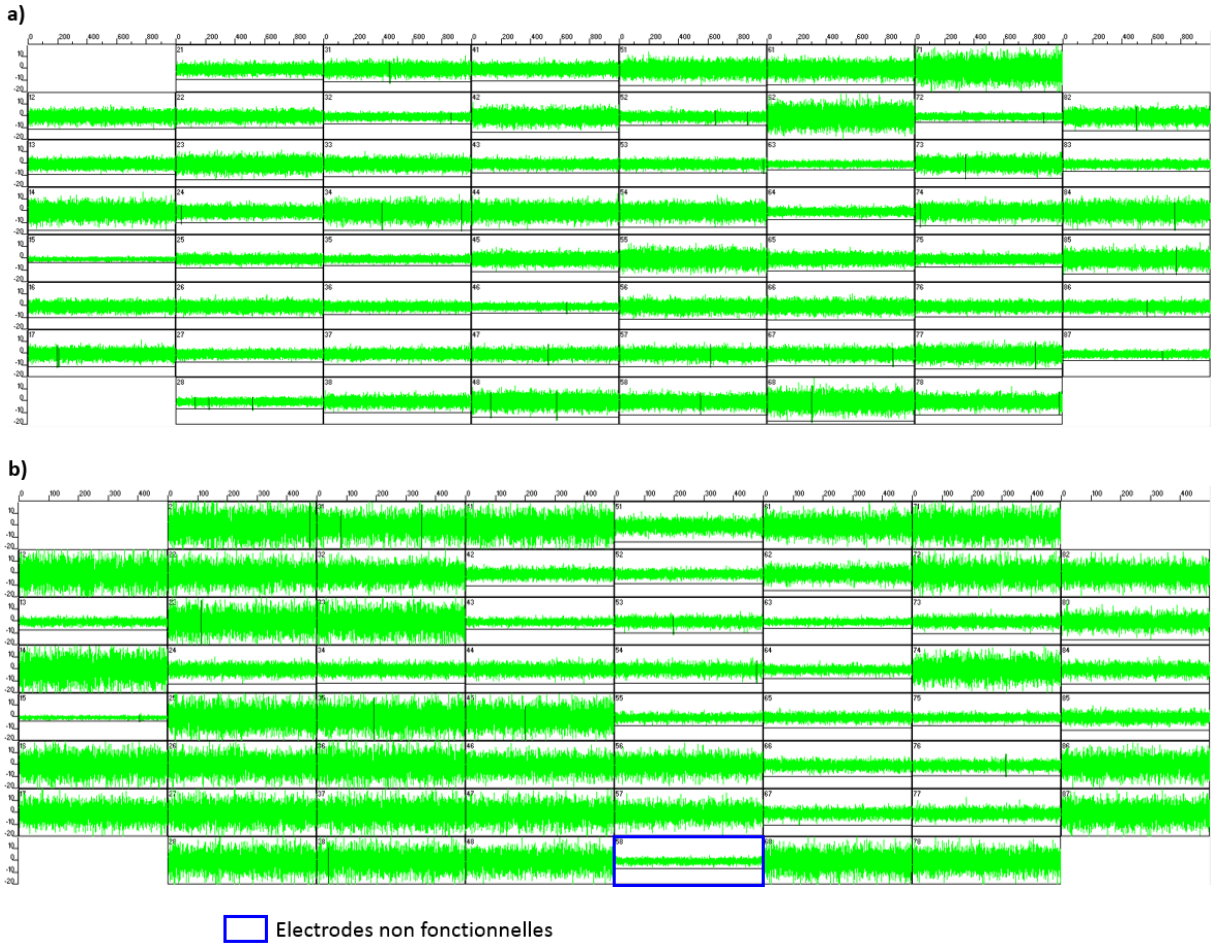


Figure III. 40: Enregistrement sur 1s, du signal électrophysiologique d'une culture hippocampale de rat avec une MEA traitée. (a) à la semaine 2 et (b) à la semaine 35.

On note qu'il y a un nombre considérable d'électrodes non fonctionnelles pour la MEA non traitée. Sur 60 électrodes, 52 électrodes sont encore fonctionnelles pour la MEA non traitée et 59 pour la MEA traitée (Figure III. 41).

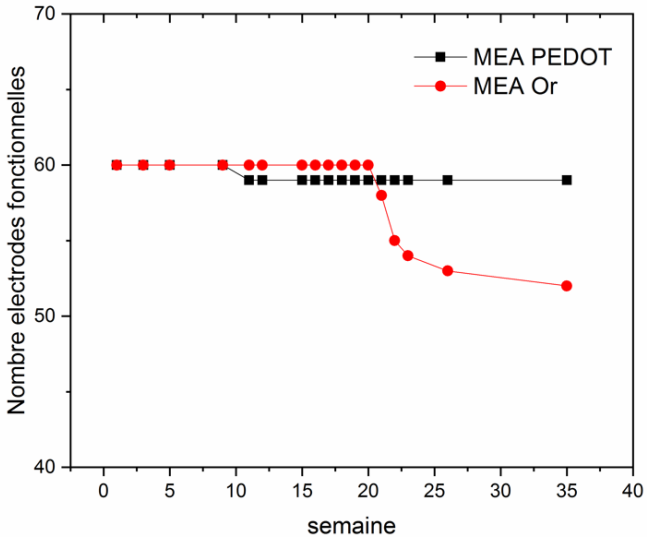


Figure III. 41: Nombre d'électrodes fonctionnelles après 35 semaines de mesure d'une culture hippocampale de rat avec (rouge) MEA Or et (noir) MEA traitée avec PEDOT:PSS.

Bien que le nombre d'électrodes non fonctionnelles pour la MEA non traitée soit faible, il est important de garder une fonctionnalité de toutes les électrodes sur le long terme pour aboutir à des analyses fiables de la culture neuronale 3D. La MEA traitée avec PEDOT:PSS montre bien une meilleure fonctionnalité que la MEA non traitée.

3.5.4 Conclusion

Pour conclure, cette étude nous a apporté des éléments informatifs sur la qualité des signaux enregistrés par les électrodes traitées et non traitées sur le long terme (9 mois de mesure). Le traitement avec le PEDOT:PSS a permis de montrer que les signaux enregistrés étaient de meilleure qualité que ceux des électrodes non traitées. Le SNR est plus élevé avec les électrodes traitées, cela a un lien avec l'impédance de l'électrode qui est plus faible grâce au traitement. La MEA traitée avec du PEDOT:PSS montre une meilleure fonctionnalité que la MEA non traitée, notamment avec le nombre des électrodes encore fonctionnelles à la semaine 35. Il est important de rappeler que la culture neuronale 3D a pour but d'étudier la croissance neuronale sur le long terme, à savoir 1-3 ans. Il est donc primordial que l'état des électrodes soient fonctionnelles pour de telles durées de culture.

3.6 CONCLUSION

Les données parcellaires fournies par les MEAs 2D font obstacle à l'analyse du circuit neuronal de la culture neuronale se développant en 3D. Pour s'affranchir de cette barrière, nous avons développé un système miniaturisé qui permet l'enregistrement au quotidien d'une culture 3D *in vitro*. Ce micro-dispositif couple une MEA 2D et un implant qui permettent les mesures en 3D. Ce micro-dispositif a permis l'investigation de la dynamique du réseau neuronal d'un modèle *in vitro* d'hippocampe de rat en temps réel sur une période de culture de 7 semaines. La stimulation électrique des électrodes a servi d'outil de vérification pour visualiser les connectivités 3D fonctionnelles entre neurones.

Néanmoins quatre points restent encore à améliorer pour élaborer une cartographie du réseau[13] notamment avec le développement d'un algorithme qui permettrait d'identifier les groupes de neurones fonctionnels dans le réseau et donc d'établir une connectivité entre eux[47,50]. D'autre part, pour cartographier le réseau, il faudrait moduler l'activité de certains types de neurones afin de confirmer la connectivité d'une population de neurones. Pour cela, l'administration de médicaments permettrait de bloquer ou d'activer certains types de neurones[8,49,51].

Enfin, deux points plus techniques restent à améliorer pour aboutir à une meilleure mesure spatio-temporelle de la culture neuronal 3D *in vitro*, c'est l'augmentation du nombre d'électrodes dans l'implant. C'est pourquoi, nous avons commencé à développer une deuxième génération d'implant sous la forme d'une maille qui intègre entre 24 et 64 électrodes, cette maille a l'avantage d'être flexible et d'enrober la culture 3D[52]. La maille sera ensuite couplée à la MEA pour mesurer une activité du réseau neuronal sur tous les points de la culture 3D.

Le dernier point technique à améliorer est le redimensionnement des électrodes des MEA. Les mesures effectuées dans ce chapitre ont été réalisées avec deux catégories d'électrodes, les électrodes de l'implant en PEDOT:PSS, de diamètre 40µm et les électrodes MEA en or, de diamètre 100µm. Il est ici impossible d'établir une cartographie du réseau neuronal si le dimensionnement des électrodes 2D et 3D est différent. Afin d'enregistrer des activités équivalentes, nous avons décidé de redimensionner la taille des électrodes à un même diamètre pour l'implant et pour la MEA.

Pour terminer, nous avons vu que le PEDOT :PSS apportait à la mesure du signal, une réduction du bruit et donc à une meilleure qualité de signal. De plus la fonctionnalisation des électrodes avec le PEDOT :PSS a montré une amélioration de la durée de vie des électrodes. Il serait donc envisageable de fonctionnaliser les électrodes de la MEA et de l'implant avec le polymère conducteur.

3.7 RÉFÉRENCES

(1) Qian, X.; Nguyen, H. N.; Song, M. M.; Hadiono, C.; Ogden, S. C.; Hammack, C.; Yao, B.; Hamersky, G. R.; Jacob, F.; Zhong, C.; Yoon, K.; Jeang, W.; Lin, L.; Li, Y.; Thakor, J.; Berg, D. A.; Zhang, C.; Kang, E.; Chickering, M.; Nauen, D.; Ho, C.-Y.; Wen, Z.; Christian, K. M.; Shi, P.-Y.; Maher, B. J.; Wu, H.; Jin, P.; Tang, H.; Song, H.; Ming, G. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-Bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* **2016**, *165* (5), 1238–1254. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.032.

(2) Li, S.; Severino, F. P. U.; Ban, J.; Wang, L.; Pinato, G.; Torre, V.; Chen, Y. Improved Neuron Culture Using Scaffolds Made of Three-Dimensional PDMS Micro-Lattices. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **2018**, *13* (3), 034105. https://doi.org/10.1088/1748-605X/aaa777.

(3) Bisio, M.; Bosca, A.; Pasquale, V.; Berdondini, L.; Chiappalone, M. Emergence of Bursting Activity in Connected Neuronal Sub-Populations. *PLOS ONE* **2014**, *9* (9), e107400. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107400.

(4) Wheeler, B. C.; Novak, J. L. Current Source Density Estimation Using Microelectrode Array Data from the Hippocampal Slice Preparation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1986**, *BME-33* (12), 1204–1212. https://doi.org/10.1109/TBME.1986.325701.

(5) Jones, N. A.; Hill, A. J.; Smith, I.; Bevan, S. A.; Williams, C. M.; Whalley, B. J.; Stephens, G. J. Cannabidiol Displays Antiepileptiform and Antiseizure Properties In Vitro and In Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *332* (2), 569–577. https://doi.org/10.1124/jpet.109.159145.

(6) Tukker, A. M.; Westerink, R. H. S. Novel Test Strategies for in Vitro Seizure Liability Assessment. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2021**, *17* (8), 923–936. https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1876026.

(7) Odawara, A.; Saitoh, Y.; Alhebshi, A. H.; Gotoh, M.; Suzuki, I. Long-Term Electrophysiological Activity and Pharmacological Response of a Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuron and Astrocyte Co-Culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443* (4), 1176–1181. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.142.

(8) Trujillo, C. A.; Gao, R.; Negraes, P. D.; Gu, J.; Buchanan, J.; Preissl, S.; Wang, A.; Wu, W.; Haddad, G. G.; Chaim, I. A.; Domissy, A.; Vandenberghe, M.; Devor, A.; Yeo, G. W.; Voytek, B.; Muotri, A. R. Complex Oscillatory Waves Emerging from Cortical Organoids Model Early Human Brain Network Development. *Cell Stem Cell* **2019**, *25* (4), 558-569.e7. https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.002.

(9) Spanu, A.; Colistra, N.; Farisello, P.; Friz, A.; Arellano, N.; Rettner, C. T.; Bonfiglio, A.; Bozano, L.; Martinoia, S. A Three-Dimensional Micro-Electrode Array for *in-Vitro* Neuronal Interfacing. *J. Neural Eng.* **2020**, *17* (3), 036033. https://doi.org/10.1088/1741-2552/ab9844.

(10) Yuan, X.; Schröter, M.; Obien, M. E. J.; Fiscella, M.; Gong, W.; Kikuchi, T.; Odawara, A.; Noji, S.; Suzuki, I.; Takahashi, J.; Hierlemann, A.; Frey, U. Versatile Live-Cell Activity Analysis Platform for Characterization of Neuronal Dynamics at Single-Cell and Network Level. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 4854. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18620-4.

(11) Park, Y.; Franz, C. K.; Ryu, H.; Luan, H.; Cotton, K. Y.; Kim, J. U.; Chung, T. S.; Zhao, S.; Vazquez-Guardado, A.; Yang, D. S.; Li, K.; Avila, R.; Phillips, J. K.; Quezada, M. J.; Jang, H.; Kwak, S. S.; Won, S. M.; Kwon, K.; Jeong, H.; Bandodkar, A. J.; Han, M.; Zhao, H.; Osher, G. R.; Wang, H.; Lee, K.; Zhang, Y.; Huang, Y.; Finan, J. D.; Rogers, J. A. Three-Dimensional, Multifunctional Neural Interfaces for Cortical Spheroids and Engineered Assembloids. *Sci. Adv.* **2021**. https://doi.org/10.1126/sciadv.abf9153.

(12) Soscia, D. A.; Lam, D.; Tooker, A. C.; Enright, H. A.; Triplett, M.; Karande, P.; Peters, S. K. G.; Sales, A. P.; Wheeler, E. K.; Fischer, N. O. A Flexible 3-Dimensional Microelectrode Array for in Vitro Brain Models. *Lab. Chip* **2020**, *20* (5), 901–911. https://doi.org/10.1039/C9LC01148J.

(13) Shin, H.; Jeong, S.; Lee, J.-H.; Sun, W.; Choi, N.; Cho, I.-J. 3D High-Density Microelectrode Array with Optical Stimulation and Drug Delivery for Investigating Neural Circuit Dynamics. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 492. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20763-3.

(14) Bayliss, S. C.; Buckberry, L. D.; Fletcher, I.; Tobin, M. J. The Culture of Neurons on Silicon. *Sens. Actuators Phys.* **1999**, *74* (1–3), 139–142. https://doi.org/10.1016/S0924-4247(98)00346-X.

(15) Jungblut, M.; Knoll, W.; Thielemann, C.; Pottek, M. Triangular Neuronal Networks on Microelectrode Arrays: An Approach to Improve the Properties of Low-Density Networks for Extracellular Recording. *Biomed. Microdevices* **2009**, *11* (6), 1269. https://doi.org/10.1007/s10544-009-9346-0.

(16) Dipalo, M.; Amin, H.; Lovato, L.; Moia, F.; Caprettini, V.; Messina, G. C.; Tantussi, F.; Berdondini, L.; De Angelis, F. Intracellular and Extracellular Recording of Spontaneous Action Potentials in Mammalian Neurons and Cardiac Cells with 3D Plasmonic Nanoelectrodes. *Nano Lett.* **2017**, *17* (6), 3932–3939. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b01523.

(17) Rutten, W. L. C. Selective Electrical Interfaces with the Nervous System. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4* (1), 407–452. https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153427.

(18) Seker, E.; Berdichevsky, Y.; Begley, M. R.; Reed, M. L.; Staley, K. J.; Yarmush, M. L. The Fabrication of Low-Impedance Nanoporous Gold Multiple-Electrode Arrays for Neural Electrophysiology Studies. *Nanotechnology* **2010**, *21* (12), 125504. https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/12/125504.

(19) Heim, M.; Rousseau, L.; Reculusa, S.; Urbanova, V.; Mazzocco, C.; Joucla, S.; Bouffier, L.; Vytras, K.; Bartlett, P.; Kuhn, A.; Yvert, B. Combined Macro-/Mesoporous Microelectrode Arrays for Low-Noise Extracellular Recording of Neural Networks. *J. Neurophysiol.* **2012**, *108* (6), 1793–1803. https://doi.org/10.1152/jn.00711.2011.

(20) *Spike sorting - Scholarpedia*. http://scholarpedia.org/article/Spike_sorting (accessed 2022-02-16).

(21) Rey, H. G.; Pedreira, C.; Quian Quiroga, R. Past, Present and Future of Spike Sorting Techniques. *Brain Res. Bull.* **2015**, *119*, 106–117. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.04.007.

(22) Aqrawe, Z.; Montgomery, J.; Travas-Sejdic, J.; Svirskis, D. Conducting Polymers for Neuronal Microelectrode Array Recording and Stimulation. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *257*, 753–765. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.023.

(23) Brüggemann, D.; Wolfrum, B.; Maybeck, V.; Mourzina, Y.; Jansen, M.; Offenhäusser, A. Nanostructured Gold Microelectrodes for Extracellular Recording from Electrogenic Cells. *Nanotechnology* **2011**, *22* (26), 265104. https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/26/265104.

(24) Pine, J. Recording Action Potentials from Cultured Neurons with Extracellular Microcircuit Electrodes. *J. Neurosci. Methods* **1980**, *2* (1), 19–31. https://doi.org/10.1016/0165-0270(80)90042-4.

(25) Keefer, E. W.; Botterman, B. R.; Romero, M. I.; Rossi, A. F.; Gross, G. W. Carbon Nanotube Coating Improves Neuronal Recordings. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3* (7), 434–439. https://doi.org/10.1038/nnano.2008.174.

(26) Boehler, C.; Stieglitz, T.; Asplund, M. Nanostructured Platinum Grass Enables Superior Impedance Reduction for Neural Microelectrodes. *Biomaterials* **2015**, *67*, 346–353. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.036.

(27) Thomas, C. A.; Zong, K.; Schottland, P.; Reynolds, J. R. Poly(3,4-Alkylenedioxypyrrole)s as Highly Stable Aqueous-Compatible Conducting Polymers with Biomedical Implications. *Adv. Mater.* **2000**, *12* (3), 222–225. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(200002)12:3<222::AID-ADMA222>3.0.CO;2-D.

(28) Cui, X.; Martin, D. C. Electrochemical Deposition and Characterization of Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) on Neural Microelectrode Arrays. *Sens. Actuators B Chem.* **2003**, *89* (1), 92–102. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(02)00448-3.

(29) Harris, A. R.; Newbold, C.; Carter, P.; Cowan, R.; Wallace, G. G. Using Chronopotentiometry to Better Characterize the Charge Injection Mechanisms of Platinum Electrodes Used in Bionic Devices. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*.

(30) Castagnola, V.; Descamps, E.; Lecestre, A.; Dahan, L.; Remaud, J.; Nowak, L. G.; Bergaud, C. Parylene-Based Flexible Neural Probes with PEDOT Coated Surface for Brain Stimulation

and Recording. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 450–457. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.004.

(31) Castagnola, V. Implantable Microelectrodes on Soft Substrate with Nanostructured Active Surface for Stimulation and Recording of Brain Activities. These de doctorat, Toulouse 3, 2014.

(32) Lecomte, A. Conception and Characterization of Flexible Microelectrodes for Implantable Neuroprosthetic Development. 161.

(33) Castagnola, V.; Descamps, E.; Lecestre, A.; Dahan, L.; Remaud, J.; Nowak, L. G.; Bergaud, C. Parylene-Based Flexible Neural Probes with PEDOT Coated Surface for Brain Stimulation and Recording. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 450–457. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.004.

(34) Lecomte, A.; Degache, A.; Descamps, E.; Dahan, L.; Bergaud, C. In Vitro and in Vivo Biostability Assessment of Chronically-Implanted Parylene C Neural Sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *251*, 1001–1008. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.057.

(35) Ouyang, L.; Musumeci, C.; Jafari, M. J.; Ederth, T.; Inganäs, O. Imaging the Phase Separation Between PEDOT and Polyelectrolytes During Processing of Highly Conductive PEDOT:PSS Films. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (35), 19764–19773. https://doi.org/10.1021/acsami.5b05439.

(36) Castagnola, V.; Bayon, C.; Descamps, E.; Bergaud, C. Morphology and Conductivity of PEDOT Layers Produced by Different Electrochemical Routes. *Synth. Met.* **2014**, *189*, 7–16. https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2013.12.013.

(37) Ahmed, R.; Reifsnider, K. Study of Influence of Electrode Geometry on Impedance Spectroscopy; American Society of Mechanical Engineers Digital Collection, 2010; pp 167–175. https://doi.org/10.1115/FuelCell2010-33209.

(38) Zhou, H.; Cheng, X.; Rao, L.; Li, T.; Duan, Y. Y. Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)/Multiwall Carbon Nanotube Composite Coatings for Improving the Stability of Microelectrodes in Neural Prostheses Applications. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (5), 6439–6449. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.042.

(39) Pautot, S.; Wyart, C.; Isacoff, E. Y. Colloid-Guided Assembly of Oriented 3D Neuronal Networks. *Nat. Methods* **2008**, *5* (8), 735–740. https://doi.org/10.1038/NMETH.1236.

(40) Song, H.; Ming, G.; Poo, M. CAMP-Induced Switching in Turning Direction of Nerve Growth Cones. *Nature* **1997**, *388* (6639), 275–279. https://doi.org/10.1038/40864.

(41) Abeles, M. *Corticonics: Neural Circuits of the Cerebral Cortex*; Cambridge University Press: Cambridge ; New York, 1991.

(42) *Neurobasal™-A Medium (1X) liquid - FR*. https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.253.html (accessed 2022-05-19).

(43) Chiappalone, M.; Bove, M.; Vato, A.; Tedesco, M.; Martinoia, S. Dissociated Cortical Networks Show Spontaneously Correlated Activity Patterns during in Vitro Development. *Brain Res.* **2006**, *1093* (1), 41–53. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.049.

(44) Brette, R.; Destexhe, A. *Handbook of Neural Activity Measurement*; Cambridge University Press, 2012.

(45) Robbins, A.; Fox, S.; Holmes, G.; Scott, R.; Barry, J. Short Duration Waveforms Recorded Extracellularly from Freely Moving Rats Are Representative of Axonal Activity. *Front. Neural Circuits* **2013**, *7*.

(46) Lewicki, M. S. A Review of Methods for Spike Sorting: The Detection and Classification of Neural Action Potentials. *Netw. Comput. Neural Syst.* **1998**, *9* (4), R53–R78. https://doi.org/10.1088/0954-898X_9_4_001.

(47) Bishop, C. M. *Pattern Recognition and Machine Learning*; Information science and statistics; Springer: New York, 2006.

(48) Quian Quiroga, R. What Is the Real Shape of Extracellular Spikes? *J. Neurosci. Methods* **2009**, *177* (1), 194–198. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.09.033.

(49) Shin, H.; Son, Y.; Chae, U.; Kim, J.; Choi, N.; Lee, H. J.; Woo, J.; Cho, Y.; Yang, S. H.; Lee, C. J.; Cho, I.-J. Multifunctional Multi-Shank Neural Probe for Investigating and Modulating

Long-Range Neural Circuits in Vivo. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 3777. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11628-5.

(50) Regalia, G.; Coelli, S.; Biffi, E.; Ferrigno, G.; Pedrocchi, A. A Framework for the Comparative Assessment of Neuronal Spike Sorting Algorithms towards More Accurate Off-Line and On-Line Microelectrode Arrays Data Analysis. *Comput. Intell. Neurosci.* **2016**, *2016*, 1–19. https://doi.org/10.1155/2016/8416237.

(51) Frega, M.; Tedesco, M.; Massobrio, P.; Pesce, M.; Martinoia, S. Network Dynamics of 3D Engineered Neuronal Cultures: A New Experimental Model for in-Vitro Electrophysiology. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5489. https://doi.org/10.1038/srep05489.

(52) Li, Q.; Nan, K.; Le Floch, P.; Lin, Z.; Sheng, H.; Blum, T. S.; Liu, J. Cyborg Organoids: Implantation of Nanoelectronics via Organogenesis for Tissue-Wide Electrophysiology. *Nano Lett.* **2019**, *19* (8), 5781–5789. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02512.

Chapitre 4

Intégration d'un micro capteur sur MEA pour la détection de pH dans une culture neuronale *in vitro*

4 CHAPITRE. 4 INTEGRATION D'UN MICRO CAPTEUR SUR MEA POUR LA DETECTION DE PH DANS UNE CULTURE NEURONALE *IN VITRO*

L'objectif de ce chapitre est de définir un protocole de fabrication d'un film d'oxyde d'Iridium (IrOx) sur MEA en vue de la réalisation d'un micro capteur pH intégrable au sein du micro-dispositif final. Ce chapitre démarre par une étude bibliographique de l'IrOx, notamment pour ce qui concerne sa sensibilité au pH ainsi que les méthodes de préparation. Une seconde étude est consacrée aux paramètres influençant les performances de stabilité du capteur IrOx pour des suivis long termes.

4.1 VERS UNE STANDARDISATION DES CULTURES 3D

Les cultures 3D d'organoïdes ont pour objectif de modéliser artificiellement des « organes humains de taille réduite » *in vitro* avec les mêmes fonctionnalités et structures que les organes *in vivo*. Ce sont des systèmes très similaires aux organes humains qui peuvent apporter une multitude d'informations sur le développement des organes[1], sur les maladies humaines (génétique[2], infectieuse[3], cancers[4]) et sur l'efficacité de médicaments[5] et leurs toxicités[6]. Il existe certaines pathologies dont l'origine restent encore inconnues, comme par exemple la maladie d'Alzheimer qui touche préférentiellement certaines zones du cerveau. Des cultures 3D d'organoïdes cérébraux pourraient permettre d'identifier les groupes de neurones impliqués dans la pathologie[7]. Néanmoins un problème se pose encore dans les cultures 3D, c'est la standardisation des cultures 3D pour reproduire le même type d'organoïde et avec les mêmes conditions physiologiques. De manière générale la culture 3D d'organoïdes est basée sur la croissance cellulaire à travers un matériel support (hydrogel[8], billes[9], etc.). Cependant, ces supports peuvent poser des limites à la diffusion et introduire des gradients de concentration[10] d'oxygène, de pH ou de nutriments (glucose, lactate, etc.), ce qui peut augmenter l'hétérogénéité du système de culture et restreindre le développement de la culture. À cette fin, une grande variété de méthodes de détection *in vitro* pour mesurer les gradients de concentration de pH, d'oxygène, etc. sont développées[42,43], comme les capteurs électrochimiques ou optiques résumés dans le chapitre 1. Parmi eux figurent les capteurs pH en oxyde métallique, plus spécifiquement l'oxyde d'Iridium (IrO_x). En raison de sa commodité à être intégrable dans une vaste gamme de supports et à être miniaturisable, l'IrO_x se présente comme un matériau sensible au pH idéal pour notre type de dispositif biologique.

Ce chapitre démarre par une étude bibliographique sur les méthodes de fabrication de l'oxyde d'Iridium et ses propriétés physico-chimiques. Des problèmes de stabilité seront abordés au cours de ce chapitre en proposant des solutions pour s'en affranchir ou en réduire l'impact sur le long terme.

4.2 LES OXYDES METALLIQUES

4.2.1 Introduction

Les oxydes métalliques sont depuis longtemps utilisés en métallurgie, ils sont extraits de minerais et présentent par leurs configurations électroniques à caractère semi-conducteur, une grande sensibilité à leurs environnements chimiques [50] ce qui les rend attractifs dans divers domaines d'applications comme le photovoltaïque, la catalyse, le traitement de surface, le magnétisme, la détection de gaz ou la mesure de pH.

Dès 1923, Uhl et Kestranek[51] ont développé le premier capteur pH à base d'oxyde métallique : l'oxyde d'Antimoine (Sb_2O_3) qui est très sensible au pH du fait de sa configuration électronique, également d'autres oxydes métalliques semblables ont vu le jour comme le PtO_2, W_2O_3, RuO_2, IrO_2, etc. L'émergence des microtechnologies a propulsé la miniaturisation et l'intégration des oxydes métalliques comme capteurs pH pour des milieux difficilement accessibles, notamment en biologie ou dans l'aérospatiale. Ils présentent d'autres avantages comme leurs faibles coûts de fabrication, leurs sensibilités et leurs portabilités. Leurs grandes sensibilités au pH résident principalement sur l'échange protonique entre la solution et la surface de l'oxyde. En effet, les oxydes peuvent présenter des défauts ponctuels liés à un désordre atomique où peuvent diffuser les ions hydroniums et créer une sensibilité au pH. Il existe différents types d'oxydes métalliques possédant ces propriétés et utilisés dans la littérature comme capteur pH[52] : Antimoine(Sb/Sb_2O_3)[53,54], Tungstène (W/W_2O_3)[55], Ruthénium (Ru/RuO_2)[56], Iridium (Ir/IrO_2)[57], Platine (Pt/PtO_2)[58] (Tableau IV.1).

Type d'oxyde métallique	Sensibilité	Références
Sb/Sb_2O_3	52 mV/pH	*Caflisch, 1978*
W/W_2O_3	53.5 mV/pH	Yamamoto, 2003
Ru/RuO_2	77.74 mV/pH	*Lonsdale, 2017*
Ir/IrO_2	75 mV/pH	*Marzouk, 1998*
Pt/PtO_2	55 mV/pH	*Park, 2005*

Tableau IV. 1: Liste des oxydes métalliques utilisés comme capteurs pH avec leurs valeurs de sensibilité au pH.

4.2.1.1 L'oxyde d'Iridium (IrO*x*)

En 1803, Wollaston et Tennant, alors qu'ils décapent à l'eau régale un minerai de Platine, ils découvrent hasardément d'autres types de métaux : Iridium, Palladium, Osmium, Rhodium et bien plus tard le Ruthénium. Ces éléments rares appartenant à la famille des platinoïdes sont inertes et présentent des propriétés chimiques très intéressantes particulièrement pour l'industrie de la catalyse[59,60] et du stockage d'énergie[61,62].
L'Iridium est un métal tellement résistant à la corrosion et aux températures extrêmes qu'il est devenu indispensable pour la fabrication des moteurs d'avions ou de pipelines en eau profonde. Il se distingue notamment par de multiples états d'oxydation, s'étalant de -2 à +9 ce qui le rend très attrayant dans l'industrie de la catalyse. Ses états d'oxydation les plus communs sont Ir(III) et Ir(IV). Les principales méthodes de fabrication peuvent être obtenues par quatre voies

différentes : thermique (Thermally-formed Iridium Oxide Film TIROF)[63], pulvérisation cathodique (Sputtered Iridium Oxide Film, SIROF)[64], activation anodique (Anodically formed IRidium Oxide Film AIROF)[65] ou électrodéposition (Electrodeposited IRidium Oxide Film EIROF)[49]. Suivant ces différentes méthodes de fabrication, l'oxyde d'Iridium adoptera une structure cristallographique appropriée : cristalline ou amorphe. En ce qui concerne les TIROF et le SIROF, ils possèdent une structure cristalline de type rutile alors que les AIROF et EIROF possèdent une structure amorphe. La structure cristalline de l' IrO_x est thermodynamiquement stable[66,67], alors que la structure amorphe de l'IrO_x présente à sa surface des défauts stœchiométriques importants, et qui par suite constituent des sites d'adsorption privilégiés vis-à-vis de l'oxygène et des groupements hydroxyles[66,67]. Ce type de structure amorphe présente donc une réactivité à son environnement (Figure IV. 1). Nous verrons par la suite, que la sensibilité au pH des IrO_x amorphes est liée à la présence de ses défauts stœchiométriques[66,68].

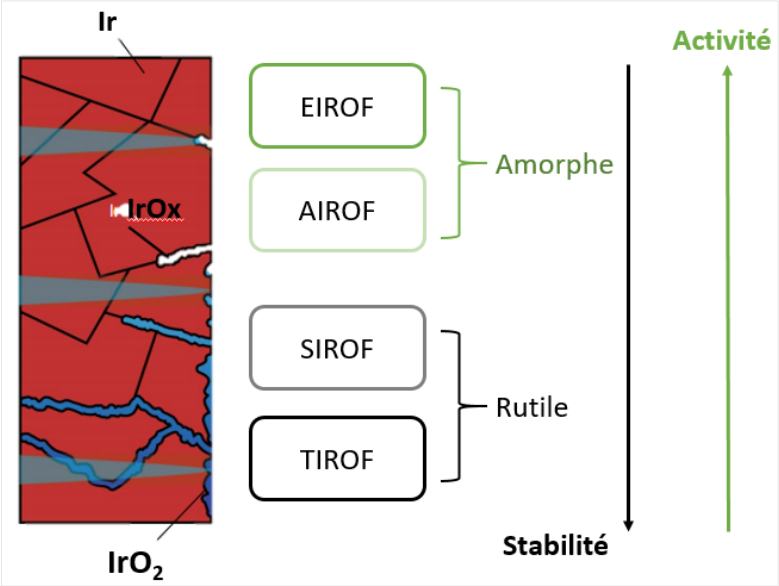


Figure IV. 1: Les propriétés thermodynamiques de l'IrOx selon son type de fabrication[19]

4.2.1.1.1 L'état cristallin

L'oxyde d'Iridium ou IrO_2 est de structure cristalline de type rutile où les cations Ir^{4+} sont entourés par six anions O^{2-} en coordination octaédrique[69] (Figure IV. 2).

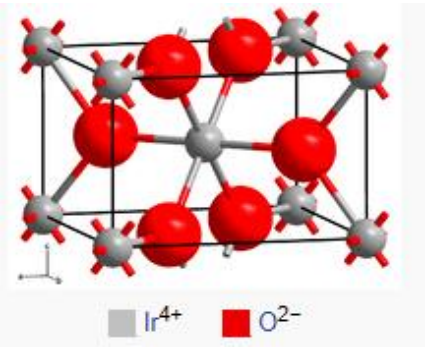


Figure IV. 2: Représentation cristallographique IrO_2

Il est synthétisé principalement par traitement thermique (TIROF[63,70]), ou par pulvérisation cathodique magnétron (SIROF[71,72]). Ces techniques de fabrication produisent un oxyde d'Iridium aux propriétés électroniques intéressantes ainsi qu'une très bonne stabilité chimique[70,73]. C'est pour cela que les IrO_2 sont en grande majorité employés pour le suivi biologique dans le domaine de l'électrostimulation[72,74]ou pour les mesures pH[75,76]. L'IrO_2 dit anhydre [70]suit d'après la relation de Nernst un potentiel linéaire en fonction du pH et sa sensibilité est de |59| mV/pH à 25 °C Eq (IV. 1). L'équilibre redox de cet oxyde formé peut être décrit selon l'équation[73] Eq (IV. 2) :

$$E = E^0 - \frac{0{,}059\text{V}}{n}\ \text{pH}$$

Equation IV. 1:Equation de Nernst des IrO_2 cristallins avec E potentiel d'oxydoréduction du couple ox/réd (V), E_0 le potentiel standard du couple ox/réd (V) et n le nombre d'électrons transféré pendant la réaction (T=25°C).

$$2IrO_2 + 2H^+ + 2e^- = Ir_2O_3 + H_2O$$

Equation IV. 2: Equation d'oxydoréduction des IrO_2 cristallins.

En dépit de leurs stabilités, les oxydes d'Iridium cristallins restent très coûteux par leurs méthodes de fabrication. C'est la raison pour laquelle d'autres méthodes moins coûteuses ont émergé comme l'électrodéposition d'oxydes d'Iridium.

4.2.1.1.2 L'état amorphe

L'oxyde d'Iridium amorphe ou IrO_x formé par voie chimique et plus particulièrement par la méthode électrochimique, est plus actif que l'IrO_2 cristallin. Son activité est expliquée par la présence d'une couche d'oxy-hydroxyde d'iridium formée soit par oxydation de l'Iridium métal[77] soit par électrodéposition[49], ce qui augmenterait sa porosité et entrainerait la multiplication de sites actifs au sein du matériau[78,79]. L'IrO_x a donc de ce fait un grand pouvoir catalytique très employé dans l'électrolyse de l'eau afin de produire soit du dioxygène [80] soit du dihydrogène[81]. Selon Juodkazyte[80], la couche d'oxy-hydroxyde d'iridium formée présenterait plusieurs hydroxydes : $IrO(OH)_2$ et $Ir(OH)_3$ et d'états d'oxydations respectifs Ir(IV) et Ir(III). La présence de ces groupes hydroxydes serait la conséquence des mécanismes d'échanges ioniques de type protonique H_3O^+ avec l'IrO_x, lorsque celui-ci est plongé dans une solution aqueuse[82].

Par ailleurs, les IrOx amorphes[83] présentent une plus grande surface active que les IrO_2 cristallins, c'est pourquoi de manière générale les IrO_x sont plus sensibles au pH, autrement dit il s'effectue à la surface des IrO_x un plus grand échange protonique avec la solution[26,84,85]. Bien que la stœchiométrie de l'IrO_x reste inconnue, sa réaction redox est donnée dans l'équation Eq (IV. 3) ainsi que son équation de Nernst Eq (IV. 4) qui valide sa linéarité au pH estimée à $|60| - |90|$ mV/pH (25 °C)[52]:

$$2IrO_2(OH)_{(2-x)}H20_{(2+x)}^{(2-x)} + (3-2x)H^+ + 2e^- = Ir_2O_3(OH)_3(H_2O)_3^{3-} + 3H_2O$$

Equation IV. 3: Equation d'oxydoréduction des IrOx amorphes.

$$59\frac{(3-2x)}{2}mV/pH$$

Equation IV. 4: Equation de Nernst des IrOx amorphes avec x les valeurs stœchiométriques du couple IrOx amorphe.

4.2.1.1.3 Stabilité des oxydes d'Iridium

Comme expliqué précédemment, la stabilité de l'oxyde d'Iridium est impactée par les méthodes de fabrication utilisées. Celles-ci conduiraient à la formation d'une structure cristalline ou amorphe. Les structures cristallines souvent décrites comme anhydres présentent une meilleure stabilité[70] alors que les structures amorphes décrites comme hydratées et poreuses présentent une moins bonne stabilité[77]. En revanche, les structures amorphes[49] possèdent de nombreux sites catalytiques actives[84] qui impactent sur la sensibilité du matériau aux mesures de pH.

Le tableau ci-dessous résume les propriétés des différents types d'oxydes d'Iridium synthétisés par voie thermique (TIROF), pulvérisation cathodique (SIROF), activation anodique de l'Iridium (AIROF) et par électrodéposition (EIROF). Les TIROF et SIROF présentent une structure cristalline anhydre et sont donc moins actifs mais plus stables tandis que les EIROF et AIROF présentent une structure amorphe hydratée et ont donc une meilleure activité mais une moins bonne stabilité (Tableau IV.2).

	Structure Cristalline		**Structure Amorphe**	
	TIROF	**SIROF**	**EIROF**	**AIROF**
Hydratation	Anhydre	Anhydre	Hydratée	Hydratée
Activité	**-**	**-**	**+++**	**+++**
Stabilité	**+++**	**+++**	**- -**	**-**

Tableau IV. 2: Caractéristiques des oxydes d'Iridium obtenus selon différentes techniques.

4.2.2 L'Oxyde d'Iridium amorphe

4.2.2.1 Méthodes de fabrication par voie électrochimique

Dès les années 1980, Burke[84], Yamanaka[49] et Hitchman[86] ont étudié les propriétés physico-chimiques de l'oxyde d'iridium amorphe. Yamanaka a développé une méthode permettant de déposer par voie électrochimique un film d'IrOx ou EIROF à partir d'une solution alcaline. Burke et Hitchman, ont quant à eux étudié les propriétés d'oxydoréduction des films d'IrOx ou AIROF formés par oxydation électrochimique d'un métal d'Iridium. Nous allons aborder en détail les deux procédés de fabrication des IrOx amorphes.

4.2.2.1.1 Oxydation métallique de l'Iridium métal (AIROF)

Des premiers travaux ont été effectués dans les années 1980 sur la formation d'oxyde d'AIROF par anodisation électrochimique. Conway[65], Burke[84] et Hitchman[86] ont montré qu'il était possible de cycler par voltammétrie l'Iridium entre [0 – 1,5]V vs ESH (Electrode Standard à Hydrogène) dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) et de former un film d'oxyde d'Iridium hydraté. Selon Buckley et Burke[87], la première couche d'oxyde formée est de nature compacte et anhydre de type IrO_2 puis à mesure que l'on cycle dans H_2SO_4, l'IrO_2 s'hydrate et devient par conséquent amorphe. Autrement dit, lors du cycle anodique il y a accumulation et production d'oxydes sur l'Iridium et lors du cycle cathodique celui-ci est réduit mais pas complétement avec adsorption d'atomes d'Hydrogène ce qui forme un oxyde d'Iridium hydraté amorphe (Figure IV. 3).

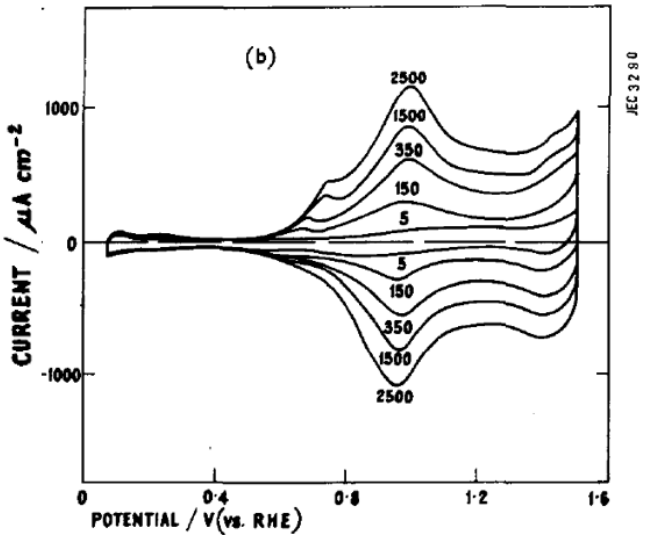


Figure IV. 3 : Voltammétrie cyclique d'un film métallique d'Iridium dans une solution d'acide sulfurique 1M (H_2SO_4) et balayé à 40mV/s sur [0,56 – 1,5]V vs ESH pour former l'oxyde d'Iridium (AIROF) après 2500 cyclages[88].

Le fait que les AIROF soient amorphes et hydratés, cela leurs apportent des propriétés catalytiques et capacitives intéressantes. On retrouve les AIROF dans de nombreux domaines d'application, comme la catalyse[89,90], les supercondensateurs[65,91], les capteurs pH[26] et électrochromes[92], et l'électrostimulation[93]. Néanmoins, la demande et la rareté du métal d'Iridium rendent la fabrication des AIROF onéreuse. C'est donc, à partir de 1987, que Yoshino[94] et Yamanaka[49] proposent une autre méthode permettant la fabrication d'oxydes d'Iridium hydraté (EIROF).

4.2.2.1.2 Electrodéposition des oxydes d'Iridium (EIROF)

L'électrodéposition permet d'élaborer des couches minces d'oxydes d'Iridium par l'intermédiaire d'un courant électrique traversant l'électrolyte. Ce courant contrôle la vitesse des ions d'Iridium présents dans l'électrolyte. Cette approche offre la possibilité de contrôler la quantité du dépôt obtenue.

Contrairement aux AIROF, l'électrodéposition d'oxyde d'iridium offre de nombreux avantages, notamment dans le choix du substrat : métal (Ir, Au, Pt), oxyde d'indium d'étain (ITO). D'ailleurs les EIROF sont très utilisés comme vitrage électrochrome sur des substrats transparents comme l'ITO pour leurs propriétés optiques[92,94]. En effet, grâce à la présence de différents états redox, les EIROF peuvent changer de couleur lorsqu'ils subissent un transfert électronique et passent d'une couleur transparente au noir.

Les champs d'utilisation des EIROF se sont multipliés en raison de leurs facilités d'intégration dans des substrats rigides ou souples et également grâce à la rapidité de leurs fabrications (quelques minutes). De plus leurs structures amorphes contiennent de nombreux sites actifs, rendant ainsi possible aux EIROF d'être employés comme des capteurs pH[57,95] ou bien encore comme des électrodes stimulatrices au sein du cerveau[96].

Les EIROF sont principalement fabriqués en suivant le protocole de Yamanaka[49], il existe d'autre protocoles comme celui proposé par Baur[97]. Le protocole de Yamanaka propose une solution alcaline où sont dissous des sels métalliques $IrCl_4.xH_2O$. Des oxalates sont également dissous dans le but de stabiliser la solution. Cette solution va alors former des complexes oxalates-Iridium capables de s'oxyder lors de l'électrolyse anodique et de former ainsi un oxyde d'Iridium hydraté ou EIROF. Bien que ce protocole de déposition reste le plus employé, il reste encore des questions quant à la méthode de préparation, par exemple Elsen[98] a montré que les ions oxalates ne jouaient pas le rôle de stabilisateur sur la solution.

4.2.2.1.3 Principe de détection du pH avec les AIROF et EIROF

Comme précédemment énoncé, les AIROF et EIROF abritent de nombreux sites électro actifs sensibles au pH[77,85]. Sur le tableau ci-dessous (Tableau IV. 3) nous pouvons voir de nombreux oxydes et hydroxydes d'iridium formés par électrodéposition (EIROF) ou par oxydation anodique (AIROF) responsables de la sensibilité au pH.

Ir^{3+}	$IrO(OH)$	$Ir(OH)_3$	Ir_2O_3	$Ir_2O(OH)_4$	
Ir^{4+}	IrO_2	$IrO(OH)_2$	$Ir(OH)_4$	$Ir_2O_3(OH)_2$	$Ir_2O(OH)_6$

Tableau IV. 3: Formes possibles d'oxydes et d'hydroxydes d'Iridium formés par voie électrochimique.

En principe, la mesure de pH consiste à évaluer la différence de potentiel entre une électrode de référence et l'IrOx à potentiel ouvert. L'IrOx adopte alors un potentiel propre à la solution de mesure et lorsque cette solution change de pH alors le potentiel change. Il change parce que l'état de surface de l'IrOx a été modifié. De manière générale, les IrOx synthétisés par voie électrochimique comportent de nombreux sites actifs et vont donc adsorber[99] plus facilement à leurs surfaces des ions H_3O^+, ce qui explique leurs grandes sensibilités au pH. Sur la Figure IV. 4, on peut voir une modélisation de la sensibilité pH des IrOx décrite selon le mécanisme de Grotthuss[100]. Lorsque l'IrOx est plongé dans une solution aqueuse, des ions H_3O^+ sont chimisorbés à la surface de l'IrOx puis apparaît ensuite un mouvement des protons à travers la surface d'IrOx.

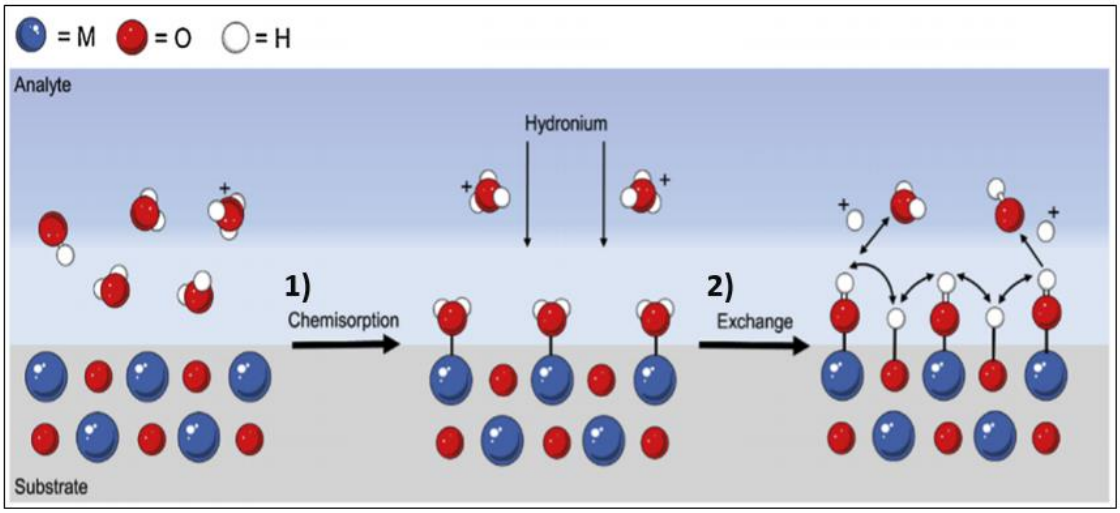


Figure IV. 4: Modélisation de la sensibilité pH chez les IrOx selon le mécanisme de Grotthuss : (1) chimisorption de l'eau sur l'IrOx (2) puis mouvement des protons à travers la surface de l'IrOx[99].

D'après l'équation d'oxydoréduction Eq (IV. 5) établie par Burke[85], les IrOx synthétisés par voie électrochimique ont une sensibilité de 88,5mV/pH Eq (IV. 6). C'est une réponse super-Nernstienne comparée à la valeur de sensibilité obtenue pour l'oxyde d'Iridium cristallin/anhydre, qui est de 59 mV/pH.

$$2\ Ir(OH)_2O^- + H_2O = Ir_2O(OH)_3O_3^{-3} + 3H^+ + 2e^-$$

Equation IV. 5: Equation IrOx synthétisé par voie électrochimique

$$E = E^0 - \frac{3}{2} x \frac{RT}{F} pH \ , (T=25°C)$$

$$E = E^0 - 88,5\ pH$$

Equation IV. 6: Equation de Nernst du couple IrOx synthétisé par voie électrochimique.

Burke souligne comme hypothèse, que l'hydratation des oxydes d'Iridium synthétisés par voie électrochimique serait responsable de l'augmentation de la sensibilité au pH. En effet, il a démontré que les IrOx hydratés présentaient à leurs surfaces un plus grand transfert de protons que les oxydes d'Iridium anhydres. Le tableau IV. 4 ci-dessous compare les caractéristiques des oxydes d'Iridium anhydres et hydratés.

Etat d'hydratation	**Anhydre**	**Hydraté**
Technique de fabrication	SIROF et TIROF	AIROF et EIROF
Réaction Redox	$2IrO_2 + 2H^+ + 2e^- = Ir_2O_3 + H_2O$	$[IrO_2(OH)_2 . 2H_2O]^{2-} + 3H^+ + 2e- = [Ir_2O_3(OH)_3 . 3H_2O]^{3-} + 3H_2O$
Sensibilité au pH	Nernstienne E = E◦ - 59 pH (T=25°C)	Super-Nernstienne E = E◦ - 88,5 pH (T=25°C)

Tableau IV. 4 : Propriétés redox des IrOx anhydres et hydratés.

Olthuis[26] émet une autre hypothèse et suggère que la hausse de sensibilité des IrOx hydratés a un lien avec le type d'oxyde formé. Pour le démontrer, il a oxydé à un potentiel constant dans un milieu acide et à différents temps (entre 2 et 10 minutes) des IrOx, il a relevé ensuite leurs sensibilités et leurs potentiels à pH=0. Sur le Tableau IV. 5 sont présentées les sensibilités des IrOx en fonction du temps d'oxydation, on peut noter que la sensibilité augmente lorsque l'IrOx subit un temps d'oxydation plus long. En parallèle, les potentiels des IrOx oxydés à (pH=0) en fonction du temps d'oxydation sont mesurés et il apparaît également que les potentiels augmentent avec le temps d'oxydation. Ces potentiels sont par ailleurs d'après l'équation de Nernst proportionnels au rapport stœchiométrique des oxydes formés (Eq IV.7). De ce fait, le rapport varie avec le temps d'oxydation et est responsable de la variation de la sensibilité pH des IrOx. Pour conclure, Olthuis démontre que la sensibilité de l'IrOx dépend étroitement de la valence des oxydes formés.

Temps d'oxydation (min)	Measurement number	pH sensitivity [mV/pH]	Extrapolated potential at pH = 0 [mV]
2	1	62.0	492
4	2	67.1	563
6	3	68.7	619
8	4	71.3	700
10	5	73.6	824

Tableau IV. 5: Evolution de la sensibilité pH (mV/pH) et du potentiel E (pH=0) des AIROF en fonction de leurs temps d'oxydation en milieu acide.

$$E = E^0 - \frac{0{,}059}{n} \text{ x rapport stœchiométrique} \left(\frac{[Ox]_{IrOx}}{[Red]_{IrOx}}\right) \text{ x } \log\left(\frac{[Ox]_{IrOx}}{[Red]_{IrOx}}\right)$$

Equation IV. 7: Equation de Nernst d'un couple IrOx avec E potentiel d'oxydoréduction du couple ox/réd (mV), E_0 le potentiel standard du couple ox/réd (V) et n le nombre d'électrons transféré pendant la réaction (T=25°C).

4.3 ETUDE DU CAPTEUR PH EIROF OU IROX

Le but de notre étude est de pouvoir suivre et de mesurer les faibles variations de pH dans une culture neuronale 3D avec l'aide d'une MEA. La MEA présentant un réseau d'électrodes où les surfaces sont de tailles micrométriques, il est donc important de choisir une méthode de dépôt où l'on peut contrôler la densité de dépôt de manière localisée. C'est pourquoi nous avons orienté notre choix vers la méthode de dépôt électrochimique de l'oxyde d'Iridium afin d'élaborer un capteur pH. En effet c'est une technique de fabrication où les dépôts sont reproductibles et permettent un contrôle in situ du type d'IrOx déposé. Nous mentionnerons dans cette partie les différentes voies de dépôt des films d'oxyde d'iridium électrodéposés (EIROF) avant de décrire la procédure de dépôt mise au point pour fabriquer des films d'oxyde d'iridium stables dans le temps.

4.3.1 Méthodes de dépôts électrochimiques des IrOx

Avec les différentes techniques électrochimiques comme la voltammétrie cyclique, la chronoampérométrie ou la chronopotentiométrie, il est possible de déposer uniformément et de contrôler les dépôts de films d'EIROF à la surface de l'électrode.

Le dépôt électrochimique est réalisé dans un bécher contenant des sels métalliques de tétrachlorure d'Iridium ($IrCl_4$) dans lequel sont plongées trois électrodes : l'électrode de référence, la contre électrode et l'électrode de travail. Toutes sont reliées aux bornes d'un potentiostat.

A la surface de l'électrode de travail, l'oxyde d'Iridium se dépose selon le mécanisme réactionnel suggéré par Yamanaka[49] Eq (IV. 8):

$$[Ir(COO)_2(OH)_4]^{2-} = IrO_2 + 2CO_2 + 2H_2O + 2e^- \quad (IV.8)$$

D'après l'équation IV.8, lorsqu'un courant traverse la surface de l'électrode de travail, les ligands d'oxalates Ir(IV) présents en solution s'oxydent pour se déposer à la surface de l'électrode sous la forme d'oxyde d'Iridium (IrO_2). On compte dans la littérature de nombreuses méthodes électrochimiques permettant le dépôt d'oxyde d'Iridium, par exemple le mode galvanostatique (courant constant), le mode ampérométrie (potentiel constant), le mode potentio-dynamique (balayage de potentiel) ou bien le mode pulsé (impulsion d'un courant anodique ou cathodique pendant un temps donné) (Tableau IV. 6).

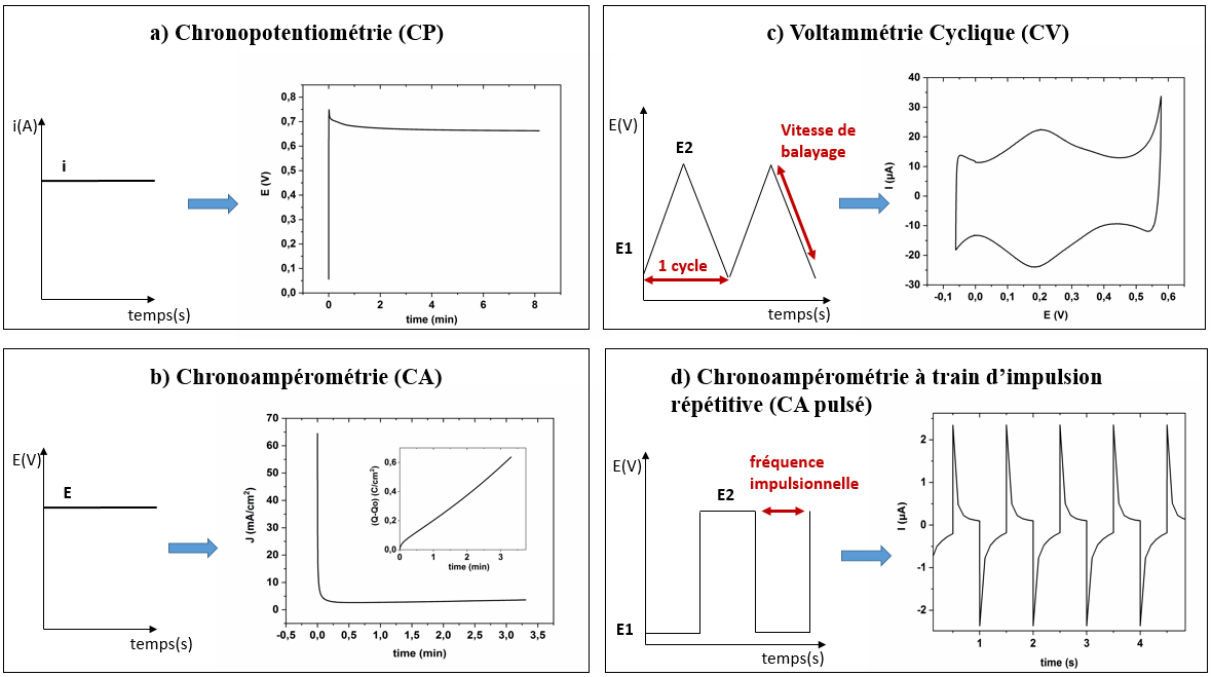


Tableau IV. 6: Les trois voies d'électrodéposition utilisés pour le dépôt d'IrOx.

4.3.1.1 La Chronopotentiométrie (CP)

La chronopotentiométrie à courant constant consiste à imposer à un système électrochimique un courant d'intensité constant et à mesurer l'évolution temporelle du potentiel E (Tableau IV.

6. a). Les substances électro-actives en solution se déposent soit par réduction soit par oxydation sur l'électrode de travail. Suite à la modification de l'électrode, son potentiel varie au cours du temps et permet d'obtenir des informations qualitatives du dépôt[101]. Si des réactions parasites se produisent à la surface de l'électrode alors le potentiel varie, de même si un film peu stable de l'électrode se dissout, cela entraînera une baisse du potentiel de l'électrode. La CP permet de fixer la densité de charge contrôlant ainsi l'épaisseur du dépôt. C'est d'ailleurs parmi les différentes méthodes de dépôt celle qui est la plus rapide.

4.3.1.2 La Chronoampérométrie (CA)

La technique chronoampérométrie est similaire à la CP mais dans ce cas un potentiel constant est appliqué à l'électrode et c'est le courant qui varie au cours du temps, permettant de déterminer la charge électrique échangée (Tableau IV.6. b). La réaction d'électrode consomme en proportion faible des espèces électro-actives, par oxydation ou réduction avec apparition d'un courant qui est mesuré. Les conditions expérimentales sont adaptées pour que l'activité de l'espèce électro-active soit en relation directe avec le courant[102]. Le dépôt par CA permet de quantifier la quantité de matière déposée, c'est une technique où le dépôt s'effectue de manière rapide.

4.3.1.3 La Voltammétrie Cyclique (CV)

La CV consiste à imposer, entre l'électrode de travail et celle de référence, une variation de potentiel E (t) linéaire et à enregistrer l'évolution du courant I (t) qui circule entre l'électrode de travail et la contre électrode, durant l'électrolyse (Tableau IV. 6. c). Le courant d'électrolyse (I) correspondant au transfert électronique permet la réduction des ions métalliques à la surface de l'électrode. Il correspond à la somme de deux courants distincts : le courant faradique (I_f) et le courant capacitif (I_c) avec $I = I_f + I_c$. C'est le courant faradique qui résulte des réactions d'oxydoréduction à l'interface électrode/solution, de ce fait il permet d'identifier *in situ* la nature des oxydes formés lors de l'électrolyse. Cela nous permet de suivre et de contrôler *in situ* le dépôt. Par ailleurs, le dépôt par CV offre un contrôle de la vitesse de dépôt, en diminuant cette vitesse, le dépôt est plus uniforme, homogène et adhère mieux au substrat[96,103].

4.3.1.4 Chronoampérométrie à trains d'impulsions répétitives (CA à régime pulsé)

L'électrodéposition pulsée diffère de l'électrodéposition classique, elle consiste à appliquer un potentiel interrompu à la place d'un potentiel continu et à mesurer le courant impulsionnelle en fonction du temps (Tableau IV. 6. d). Elle présente de nombreux avantages : une bonne uniformité du dépôt, une bonne adhésion au substrat et elle permet d'obtenir des particules de plus petite taille. En effet, c'est le temps impulsionnel qui va permettre de structurer de manière homogène le dépôt[104,105].

Dans le Tableau IV. 7 sont listées les principales techniques de dépôt de l'IrO_x utilisées dans la littérature:

Type de dépôt	Protocole	Substrat	Sensibilité	Référence
Galvanostat	10 min, [2-3] A/m2	ITO	/	Yamanaka, 1989
	8 min, 2 mA/cm^2	Pt (0,32 cm2)	–63.5 mV/pH	Marzouk, 1998
	15 min, 0.16 mA/cm2	Pt (1,57 cm2)	-62.5 mV/pH	Kim, 2003
	8 min, [1–1.5] mA/cm2	Pt (5x10^{-6} cm^2)	-77.6 mV/pH	Ges, 2005
	1-10 min, [0.2–0.3] mA/cm2	Au (2x10^{-4} cm^2)	-79 mV/pH	Elsen, 2009
Chronoampérométrie	[0.6–0.7] V vs SCE, 40 sec	Au (2x10^{-4} cm^2)	-79 mV/pH	Elsen, 2009
	0.6 V vs SCE, 0.5 C/cm2	Pt (3,14x10^{-6} cm^2)	-60 mV/pH	Tsopela, 2014
Voltammétrie cyclique	[0 ; 0.6] V vs. AgCl, 100 cycles, v= 50 mV/s	Pt (10^{-3} cm^2)	-[68 -77]mV/pH	Yang, 2004
	[0 ; 0.55] V vs. AgCl, 100 cycles, v= 75 mV/s	Pt (5x10^{-7} - 8x10^{-6} cm^2)	-77.6 mV/pH	Ges, 2005
	[-0.5 ; 0.7] V vs. SCE, 100 cycles, v= 5–10 V/s	Au (2x10^{-4} cm^2)	-79 mV/pH	Elsen, 2009
	[-0.5 ; 0.65] V vs. AgCl, 100 cycles, v= 50 mV/s	Acier (0,045 cm^2)	-74.5 mV/pH	Kakooei, 2013
	[0 ; 0.65] V, vs. SCE, 50 cycles, v= 10 mV/s	Pt (9x10^{-4} cm^2)	-71.3 mV/ pH	Zea, 2019
Voltammétrie cyclique + Pulses	1-[0.0 ; 0.55] V vs. SCE, 50 cycles, v= 50 mV/s 2- pulses [0.0 ; 0.55] V, (F=2Hz)	Au (5.127x10^{-3} cm^2)	/	Meyer, 2001
		Fil Pt (0.01 cm)	-75.5 mV/pH	Yi Lu, 2009
		Acier (0,57cm^2)	-66 mV/pH	Mayorga, 2009
Pulses	[-0.5 ; 0,7] V vs. SCE, 100-10000 cycles, F= 4Hz	Au (2x10^{-4} cm^2)	-76 mV/pH	Elsen, 2009
	[0.0 ; 0.55] V vs. AgCl, 2400 cycles, F=2 Hz (40min)	Au [5.5x10^{-4} - 1.96x10^{-3} cm^2]	-[63.8 -69.5] mV/pH	Carroll, 2010

Tableau IV. 7: Récapitulatif des méthodes d'électrodéposition d'IrOx dans la littérature.

Parmi les nombreuses méthodologies appliquées pour la fabrication de l'oxyde d'Iridium, on notera que la sensibilité est presque équivalente d'un dépôt à un autre. Par ailleurs, parmi les nombreuses techniques existantes pour l'électrodéposition d'IrOx, il apparaît que les oxydes formés sont les mêmes. Comme on peut le voir sur la Figure IV. 5, les caractérisations par CV des IrOx déposés par CA ou par CV ont similaires. On peut également identifier les deux couples d'oxydoréduction quasi-réversibles : Ir(III)/Ir(IV) à 0,7V vs NHE et Ir(IV)/Ir(V) à 1,2 V vs NHE[106] sur les deux dépôts.

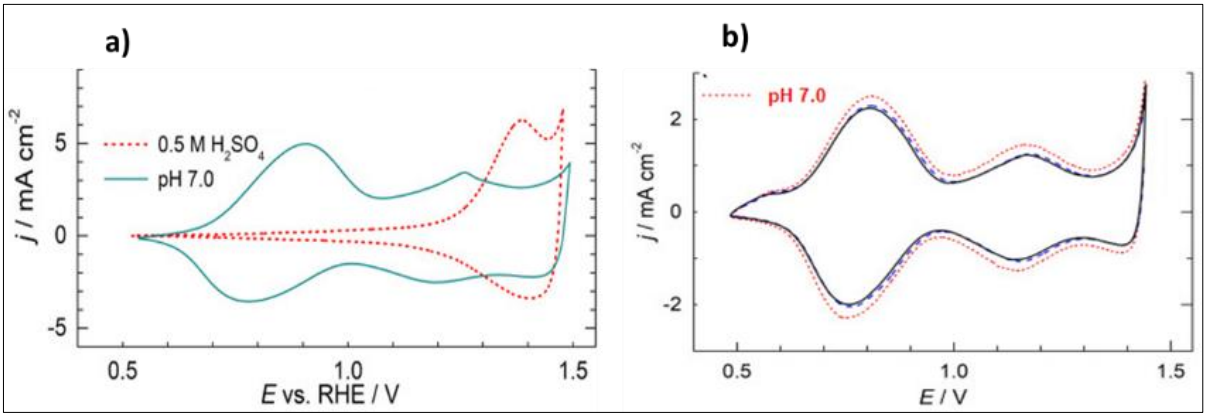


Figure IV. 5: Caractérisation par CV dans un milieu PBS (pH=7) à v=20mV/s vs NHE de deux IrOx électrodéposés par (a) CA et par (b) CV.

Nous avons opté dans un premier temps pour le choix d'un dépôt par CP, parce que c'est une technique d'élaboration rapide et reproductible[57,98]. En outre, elle apporte des renseignements qualitatifs du film d'IrOx formé par le suivi du potentiel en fonction du temps ainsi l'identification de phénomènes se produisant à la surface du film d'IrOx comme sa dissolution, ou bien des réactions parasites qui peuvent être facilement identifiables et contrôlés. Quant à la

densité de courant utilisée pour électrodéposer l'oxyde à la surface des électrodes, elle est comprise entre 1,6x10^{-4} A/cm^2 et 2 x10^{-4} A/cm^2, sinon au-delà, le dépôt devient irrégulier.

4.3.2 Dépôt électrochimique de l'IrOx

Nous avons élaboré dans un premier temps des dépôts d'IrOx par trois méthodes distinctes, à savoir par CP, par CV et par CA pulsé. Nous comparerons les morphologies, sensibilités et stabilités des IrOx obtenus. Le système électrochimique est composé de trois électrodes connectées à un potentiostat (VMP3-Biologic) : une référence en Calomel (ECS), une contre-électrode en fil de platine et une électrode de travail en or de surface géométrique S=0,04mm^2.

4.3.2.1 Protocole expérimental

4.3.2.1.1 Préparation de la solution

Une solution alcaline d'oxyde d'Iridium est préparée selon la méthode de Yamanaka[49]. Un sel métallique $IrCl_4$ (4.45x10^{-3}mol/L) et de l'acide oxalique (1.11 x10^{-1}mol/L) sont dissous dans 50mL d'eau auquel on ajoute 0,5mL de H_2O_2, puis la solution est ajustée à pH 10 par ajout de K_2CO_3. La solution doit reposer au moins deux jours pour qu'elle se stabilise, la couleur de la solution varie alors du brun au bleu.

Pour que le dépôt de l'oxyde d'Iridium soit déposé uniformément, Yamanaka a noté que l'ajout de H_2O_2 était essentiel à la solution de dépôt. Il a également spécifié que l'ajout de l'acide oxalique dans la solution alcaline était indispensable afin que les ions d'Iridium ne soient pas complexés et qu'ils ne précipitent pas en solution. En ce qui concerne les conditions d'électrodéposition de la solution, il a été montré qu'une température égale à 15°-25°C était optimale pour un bon dépôt. Dans la Figure IV. 6 est représenté un schéma du dépôt d'oxyde d'Iridium par voie électrochimique avec une configuration à trois électrodes : électrode de référence, contre-électrode et électrode de travail.

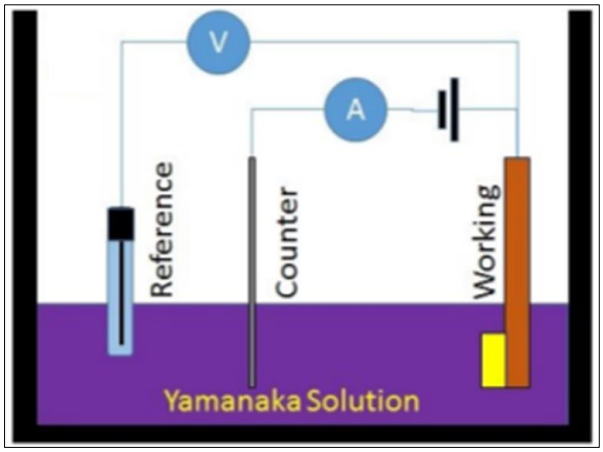


Figure IV. 6: Configuration d'un système à trois électrodes pour le dépôt d'IrOx : électrode de référence, contre électrode et électrode de travail connectés à un potentiostat.

4.3.2.1.2 Préparation du substrat

Des électrodes d'or de surface S=0,04 cm^2 seront d'abord utilisées dans le but d'optimiser les paramètres de dépôt de l'IrOx, puis une fois le dépôt optimisé nous réaliserons l'étude sur des microélectrodes d'or (d=100µm) avec une surface de S= 7,85x10^{-5} cm^2.

Dans un premier temps les électrodes d'or sont activées électrochimiquement dans un bain d'acide sulfurique (0,5M) pour éliminer des impuretés comme des résidus organiques ou des poussières. Cette électrode est connectée à une électrode de référence (ECS) et à une contre électrode (fil de platine). Un balayage en potentiel entre – 0,5 V et + 1,65 V à une vitesse de 200mV/s est alors effectuée jusqu'à la stabilisation du courant de celle-ci. On observe alors la courbe caractéristique de l'or qui est exprimée en densité de courant (J) – potentiel (E) (Figure IV. 7). Cette densité de courant correspond au transfert électronique permettant la réduction des ions de l'or à la surface de l'électrode. On note après 30 cycles d'activation, une légère augmentation de densité de courant par rapport au 1er cycle ainsi qu'une distinction des pics d'oxydation de l'or. C'est une activation nécessaire afin d'assurer une bonne adhésion de l'IrOx à la surface de l'or, surtout lorsque la surface est de petite dimension (micrométrique).

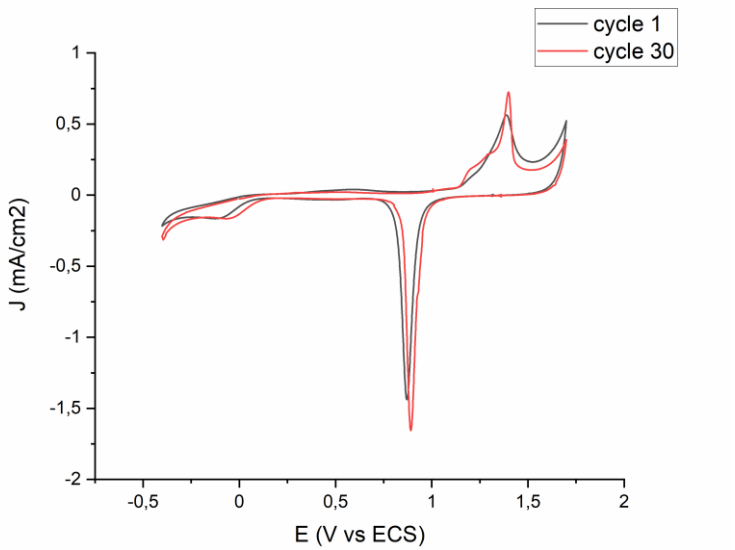


Figure IV. 7: Activation de la surface d'or (S=0.04 cm^2) dans H_2SO_4 à 200mV/s vs ECS.

4.3.2.1.3 Dépôt électrochimique de l'IrOx

Les dépôts ont été réalisés avec trois méthodes distinctes : CP, voltammétrie cyclique (CV) et CA pulsé). Un premier dépôt est réalisé par CA suivant le protocole de Marzouk[57], à savoir une densité de charge de 1 mA/cm^2 pendant 8 min (Tableau IV. 8.a). Afin d'assurer une étude comparative relative à une même quantité d'IrOx déposé, nous caractériserons par CV en milieu PBS si la densité de courant est équivalente pour chacun des dépôts.

Dans un deuxième temps, un dépôt est réalisé par CV suivant le protocole de Ges[107] et Meyer[96]soit à une vitesse de balayage de 25 mV/s sur une fenêtre de potentiel de [-0,05 – 0,66]

V vs ECS pour 300 cycles (Tableau IV. 8.b). Enfin, un dernier dépôt par CA pulsé a été effectué selon le protocole de Carroll[108], soit un dépôt pulsé entre 0 et 0,66 V vs ECS pendant 500 cycles et avec une fréquence impulsionnelle de 2Hz (Tableau IV. 8. c).

Pour chacune des méthodes employées, la réaction se produisant à la surface de l'électrode est la suivante[109] :

$$2\ [IrO_2(OH)_2.2H_2O]^{2-} + 3H^+ + 2e- = [Ir_2O_3(OH)_3.3H_2O]^{3-} + 3H_2O.$$

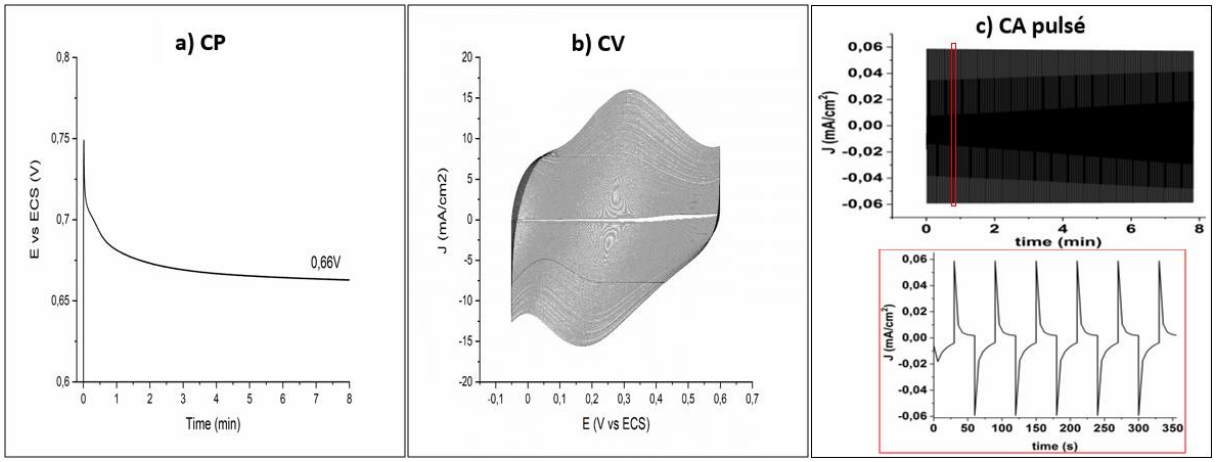


Tableau IV. 8: Dépôts caractéristiques d'IrOx sur macro électrode (S=0,04 cm^2) par : (a) CP avec une densité de courant de 1mA/cm^2, (b) CV 300 cycles, à v=25 mV/s sur [-0,05 - 0,66] V vs ECS et (c) CA pulsé entre 0 et 0,66 V vs ECS avec une fréquence impulsionnelle de 2Hz sur 500 cycles.

4.3.2.2 Caractérisation des dépôts

4.3.2.2.1 Caractérisations électrochimiques

Des tests de caractérisation des différents dépôts ont été réalisés par électrochimie et par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) afin de comparer les propriétés redox, morphologiques et mécaniques des dépôts d'IrOx élaborés suivant les techniques employées. Enfin nous caractériserons par potentiométrie la sensibilité pH des IrOx. Les caractérisations par CV et par Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (EIS) ont été réalisées sur les différents dépôts effectués en CP, CV et par CA pulsé. Ils ont été réalisés en milieu PBS (pH=7). Pour les mesures EIS, nous effectuons un balayage fréquentiel sinusoïdal à tension constante sur la plage [10 Hz-10 kHz] et nous relevons les valeurs d'impédance |Z| en fonction de la fréquence.

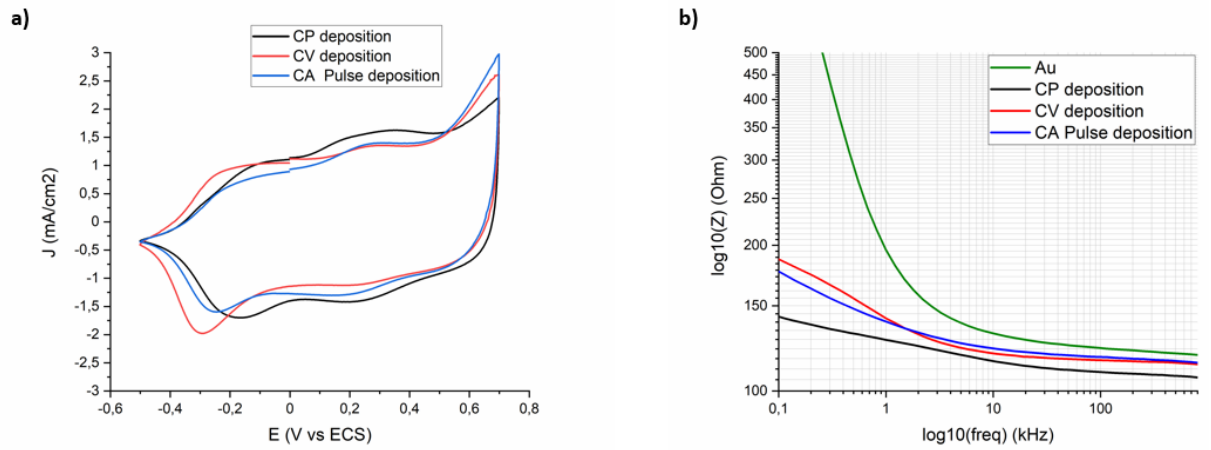


Figure IV. 8: Caractérisations électrochimiques en milieu PBS des différents dépôts IrOx réalisés. (a) Caractérisations par CV sur [-0,6V-0,8V] vs ECS, (v=50mV/s) pour de l'IrOx déposé par CP (noir), CV (rouge) et CA pulsé (bleu). (b) Caractérisations EIS des électrodes d'or nu (vert) et d'IrOx déposé par CP (noir), CV (rouge) et CA pulsé (bleu).

Les caractérisations CV réalisées sur une fenêtre de [-0,6V-0,8V] vs ECS à une vitesse de balayage de 50mV/s pour les différents dépôts IrOx, montrent toutes une courbe caractéristique de l'IrOx (Figure IV. 8.a). En effet, nous observons la formation d'un pic étendu entre [0,15 ; 0,4] V et son pic retour également étendu entre [0,2 ; -0,3] V correspondant au couple Ir(OH)x(III)/ IrO_2(IV)[110–112]. Ces pics sont étendus du fait que l'IrOx formé est de forme hydraté et amorphe. Le deuxième pic que l'on peut également identifier à partir de 0,6 V est le couple Ir(V) / Ir(VI) qui est principalement responsable de la production d'oxygène (OER). Par ailleurs, ces CV montrent un comportement de l'IrOx identique pour chacune des techniques de dépôt. On remarquera que la CV du dépôt par CP est plus capacitive que les deux autres méthodes, ce qui pourrait expliquer une surface plus poreuse produit par la méthode CP.

Des mesures d'impédances (EIS) ont ensuite été effectuées afin de contrôler la qualité du dépôt (Figure IV. 8.b). Le principe de l'EIS réside dans la mesure d'un courant sinusoïdal d'une électrode de travail suite à une perturbation sinusoïdale en potentiel. Sa réponse traduit un caractère résistif et/ou capacitif du circuit en fonction de la fréquence. L'avantage de la mesure EIS en fréquentiel est qu'elle permet de remonter à certains phénomènes ayant lieu sur l'électrode, comme la dégradation ou le changement des propriétés chimiques du matériau. Dans notre cas, nous nous intéressons principalement à contrôler la qualité du dépôt entre chacune des techniques de dépôt employées et les comparer à celle de l'or de surface identique, à une fréquence fixe de 1 kHz. On observe ainsi que l'impédance (Z) mesurée pour les trois dépôts IrOx diminue par rapport à celle mesurée pour l'or, ce qui signifie que l'IrOx déposé est bien conducteur et qu'il présente une surface active beaucoup plus grande que celle de l'or parce qu'il présenterait une structure plus rugueuse ou poreuse avec l'IrOx déposé par les trois méthodes. Pour terminer, l'impédance relevée pour chacun des dépôts est relativement proche, on compte respectivement 141 ± 8 Ohm , 139 ± 3 Ohm et 128 ± 9 Ohm pour les dépôts réalisés par CV, Pulsé et CP.

Les électrodes d'IrOx sont par la suite conditionnées dans une solution tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline) pendant deux jours afin de les stabiliser avant les mesures pH[57]. Ce conditionnement est très important car l'IrOx électro-déposé est de nature amorphe et

présente des groupes hydroxydes à sa surface qui échangent des ions protonique H^+ avec le milieu dans lequel l'IrOx est immergé[82]. Lorsque l'IrOx est suffisamment hydraté, il se stabilise, comme on peut le voir sur la Figure IV. 9, où le potentiel standard de l'IrOx est mesuré en circuit ouvert par potentiométrie en milieu PBS. On constate que le potentiel diminue considérablement de 18 mV entre les jours 0 et 1,5. C'est durant cette période que l'IrOx s'hydrate et qu'il est par conséquent moins stable. Il redevient stable après 1,5-2 jours d'hydratation.

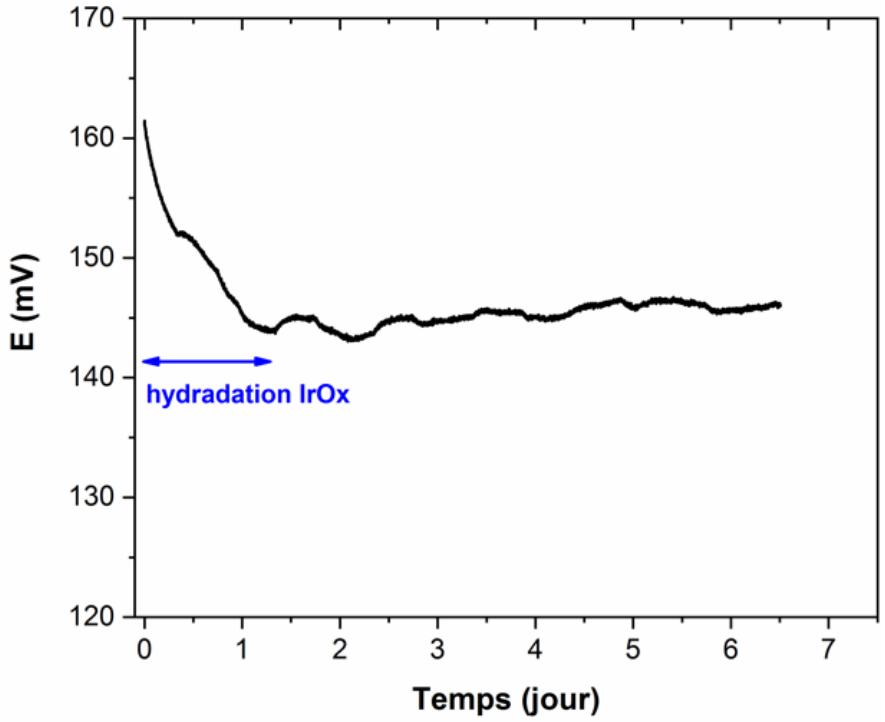


Figure IV. 9: Mesure par potentiométrie (vs ECS), le potentiel standard de l'IrOx immergé dans un milieu PBS.

Nous avons ensuite effectué des tests de sensibilité du capteur pH afin d'estimer la sensibilité pour chaque technique de dépôt utilisée. Les mesures de sensibilité ont été effectuées par potentiométrie qui consiste à mesurer dans une solution saline, la différence de potentiel entre une électrode de référence et une électrode de travail, à circuit ouvert (Figure IV. 10.a). Nous avons effectué les mesures pH dans une solution tamponnée au phosphate (PBS) que nous avons dilué avec une solution NaOH pour les pH basiques ou HCl pour les pH acides.

Nous avons mesuré des sauts en potentiel du film d'IrOx lorsque celui-ci est plongé dans différentes solutions de pH de [2-12]. La Figure IV. 10.b montre la réponse linéaire des capteurs pH déposé avec les trois méthodes de dépôts : CP, CV et CA Pulsé.

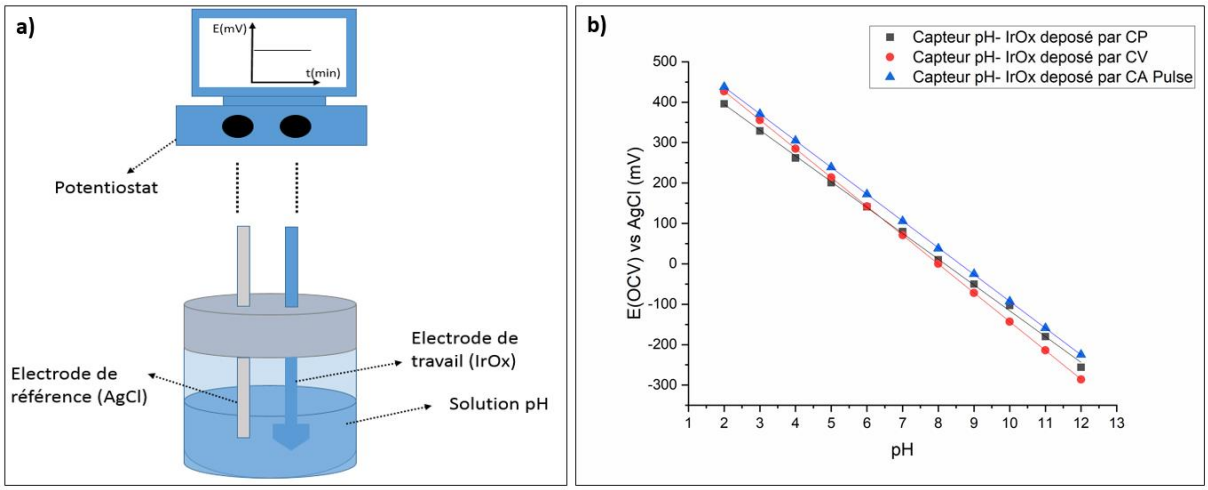


Figure IV. 10: (a) Schéma du dispositif potentiométrique pour la mesure du pH, constitué d'une électrode de référence (AgCl) et d'une électrode de travail d'IrOx connectées à un potentiostat. (b) Mesures de sensibilité du capteur pH en fonction du mode de dépôt : CP (noir), CV (rouge) et CA pulsé (bleu).

On note respectivement une sensibilité de -63,9 ± 2 mV/pH, -66,2 ± 1,5 mV/pH et -64,8 ± 3,4 mV/pH pour les IrOx déposés par CP, CV et CA pulsé. Suivant la technique d'électrodéposition utilisée, il n'y a donc pas d'influence notable sur la sensibilité du capteur pH. Par ailleurs, nous pouvons observer que la réponse est linéaire avec le pH. Cette réponse est super-Nernstienne puisque les sensibilités mesurées sont bien supérieures à la sensibilité d'un capteur pH standard qui est de 59mV/pH. Cette réponse super-Nerstienne est caractéristique des oxydes métalliques qui peuvent se présenter sous la forme d'oxydes hydratés de type M(OH)x et induire une plus grande sensibilité au pH[50].

4.3.2.2.2 Caractérisations MEB

Des caractérisations MEB ont été réalisées sur des électrodes IrOx obtenues par CP, CV et CA pulsé afin d'identifier les différentes morphologies générées lors du dépôt (Tableau IV. 9).

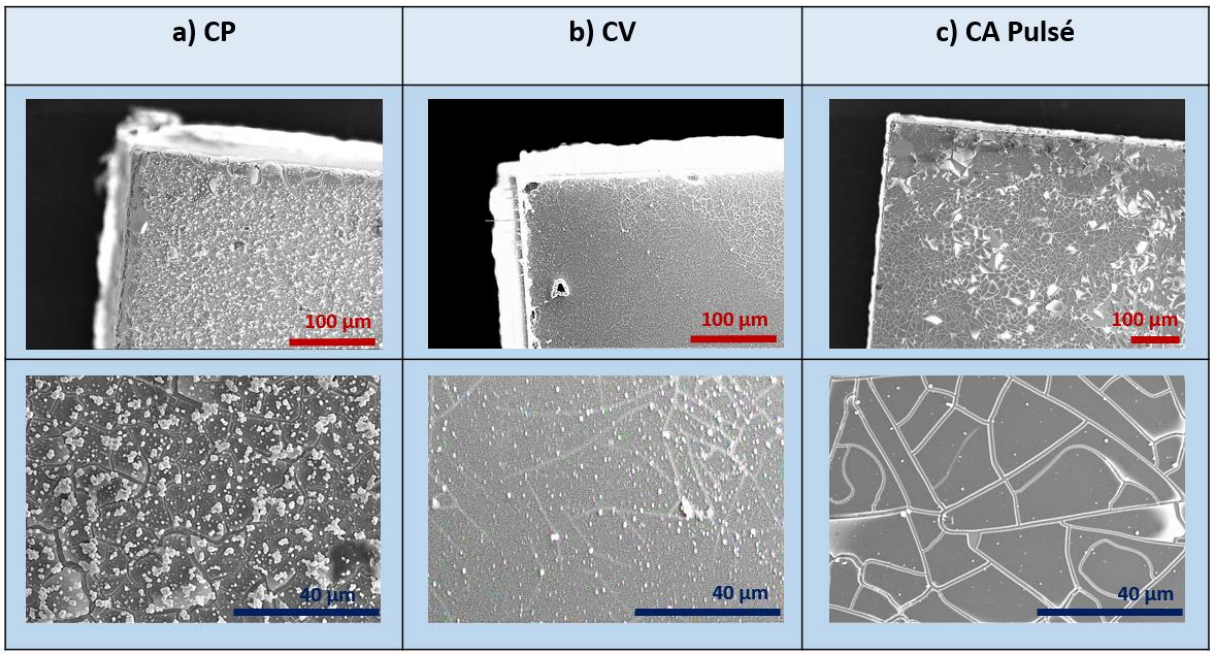


Tableau IV. 9: Images MEB des différents dépôts d'IrOx réalisés par : (a) CP, (b) CV et (c) CA Pulsé.

La CP permet d'obtenir un dépôt d'un film d'IrOx rugueux alors qu'avec la CV un dépôt d'IrOx uniforme et homogène est obtenu. La CA pulsé conduit à la formation d'un dépôt d'IrOx uniforme avec des aspérités à sa surface. Ce que l'on peut également noter, c'est la présence de craquelures à la surface de l'IrOx pour les trois méthodes, elles sont plus visibles pour les dépôts réalisés par pulsé et par CP. Néanmoins le dépôt par CV présente de légères fissures notamment sur le bord de l'électrode.

Nous pouvons conclure que les trois modes de dépôts utilisés à savoir par CP, CV et CA pulsé présentent toute une sensibilité élevée et comparable. En revanche, en fonction de la technique de dépôt employé, celui-ci peut générer des craquelures, comme celles observées au MEB pour l'IrOx déposé par CP et par pulsé ce qui peut conduite à une instabilité du capteur. Meyer[96] et Zea[103] proposent d'utiliser les modes de dépôt telle que la CV à faible vitesse de balayage pour une meilleure stabilité mécanique et une bonne adhésion du dépôt d'IrOx.

Afin de nous affranchir des problèmes d'instabilités mécaniques du capteur de l'IrOx, nous avons poursuivi sur des dépôts par CV à faible vitesse de balayage (v=25 mV/s).

4.3.2.3 Mesure de sensibilité pH du dépôt IrOx

Nous notons que le capteur IrOx répond très rapidement avec une grande sensibilité aux variations de pH (Figure IV. 11. a). Comme nous l'avons montré précédemment la mesure de

sensibilité du capteur IrOx déposé par CV à 25mV/s présente une grande sensibilité au pH voisine de -66,2 ± 1,5 mV/pH.

Si nous nous intéressons aux sauts en potentiels mesurés à différents pH entre 2 et 12, on observe une dérive à mesure que l'on répète la mesure dans la même solution pH (Figure IV. 11. b). Par exemple à pH 2, on remarque à 50 minutes d'intervalle entre la première et la seconde mesure du potentiel (OCV), une dérive d'environ 40 mV sur le potentiel mesuré. Par ailleurs, cette dérive est également observée avec les autres modes de dépôts d'IrOx.

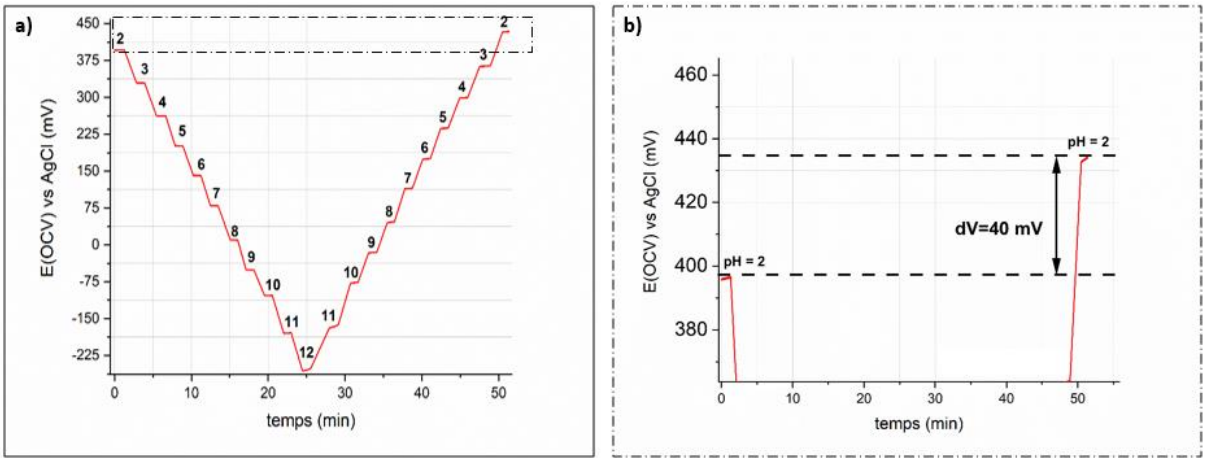


Figure IV. 11: (a) Mesure sensibilité pH de l'électrode d'IrOx sur un cycle sur une fenêtre pH de [2-12]. (b) Hystérésis calculé (dV) entre le début et la fin du cycle (pH=2).

Huang[113] attribue cette dérive sur l'IrOx aux changements de ses propriétés chimiques au cours de la mesure, les propriétés d'oxydoréduction de l'IrOx peuvent en effet être responsables de ce changement avec l'établissement d'un nouveau potentiel d'équilibre. Selon Olthuis[26] ce phénomène est notamment plus prononcé pour les IrOx déposés électrochimiquement, car ils présentent une multitude de formes hydrates et peuvent subir une hydrolyse conduisant ainsi à une modification de leurs propriétés chimiques et à l'établissement d'un nouveau potentiel d'équilibre (Tableau IV. 10).

Ir^{3+}	Ir^{4+}
IrO(OH)	IrO_2
$Ir(OH)_3$	$IrO(OH)_2$
Ir_2O_3	$Ir(OH)_4$
$Ir_2O(OH)_4$	$Ir_2O_3(OH)_2$
	$Ir_2O(OH)_6$

Tableau IV. 10: Les différentes formes d'IrOx hydrates déposées par électrochimie[26].

Olthuis a montré que l'IrOx avait une sensibilité au pH et un potentiel d'équilibre différent selon son degré d'oxydation. Il a pour cela oxydé l'IrOx dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) et à différents temps d'oxydation. Il a pu constater que plus le temps d'oxydation augmentait et plus les propriétés l'IrOx changeaient. La sensibilité pH et le potentiel d'équilibre mesuré à pH=0 de l'IrOx ont été impacté par l'oxydation forcée de l'IrOx (Tableau IV. 11). Ce

phénomène permet d'expliquer la dérive de 40 mV observée sur notre électrode à pH 2 (Figure IV. 11. b) après 50 minutes de mesure. Bien que l'électrode n'ait pas subi ici d'oxydation forcée, on observe une variation du potentiel d'équilibre de l'IrOx à pH=2. Ceci pourrait s'expliquer par le passage successif de l'électrode dans plusieurs bains de pH (2-12). La nature hydratée de l'IrOx peut fragiliser sa stabilité et peut provoquer lorsque celui-ci est baigné dans plusieurs solutions pH, un changement de ses propriétés chimiques et donc un changement de son potentiel d'équilibre.

Measurement number	pH sensitivity [mV/pH]	Extrapolated potential at pH = 0 [mV]
1	62.0	492
2	67.1	563
3	68.7	619
4	71.3	700
5	73.6	824

Tableau IV. 11: Mesure de la sensibilité pH et du potentiel d'équilibre à pH=0 pour plusieurs états d'oxydation de l'IrOx.

Une caractérisation par CV a été réalisée sur l'électrode d'IrOx après la mesure de sensibilité pH (Figure IV. 12), on peut observer une légère diminution de la charge capacitive de l'IrOx. Il est possible que la surface hydratée de l'Ir(OH)x ait subi des modifications de surface après son hydratation dans les différents bains de pH ce qui pourrait conduire à une légère diminution de sa charge capacitive et ainsi à une dérive du potentiel.

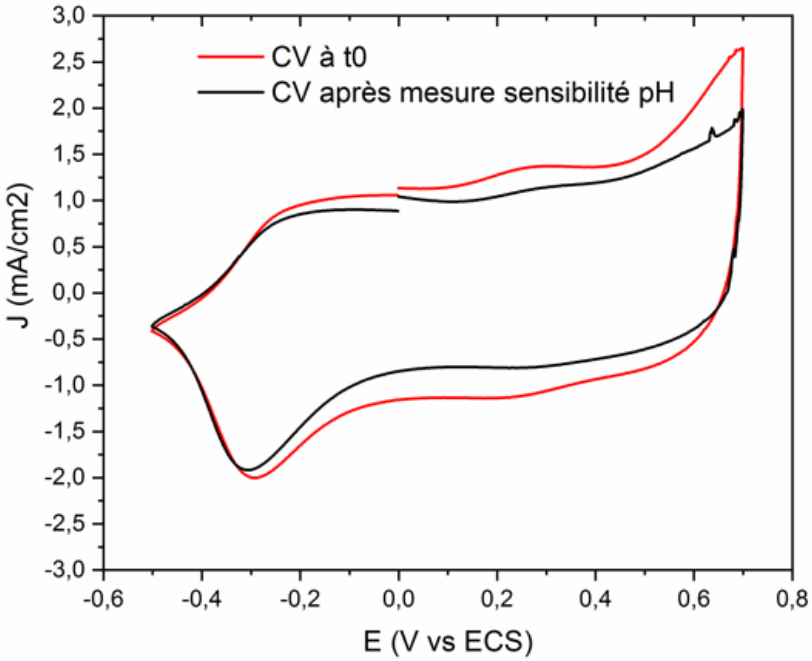


Figure IV. 12: Caractérisations par CV d'une électrode d'IrOx en milieu PBS sur [-0.5V-0.7V] vs ECS, (v=50mV/s) avant les mesures de sensibilité pH (rouge) et après les mesures de sensibilité pH (noir).

Dans l'ensemble de la littérature des capteurs pH- IrOx, les dérives de potentiel ne sont pas mentionnées car les capteurs pH sont souvent utilisés sur des courtes durées (1-2 heures). Néanmoins certains auteurs ont étudié les facteurs induisant une instabilité du capteur pH- IrOx, nous les décrivons dans les paragraphes suivants.

4.3.2.4 Facteurs d'instabilité du capteur pH

Malgré les performances élevées des capteurs pH IrOx, leurs stabilités sur le long terme restent un défi majeur qui est peu abordé dans la littérature. En effet, il existe une dérive du capteur IrOx qui peut se présenter soit comme une dérive temporelle ou soit comme une perte de sensibilité pH. La dérive temporelle et la perte de la sensibilité pH dépendent intrinsèquement des propriétés du matériau qui vieillit au cours du temps en solution. L'accélération du vieillissement du matériau est dû aux groupements hydroxydes qui le composent et qui se dissolvent en solution, ce qui engendre un déséquilibre de ses états redox[114] et à une instabilité du capteur avec la génération d'un nouveau potentiel d'équilibre [26,77,82,84,85]. Semblablement à l'IrOx, l'oxyde d'antimoine est utilisé comme capteur pH et présente une instabilité à long terme du fait de sa corrosion par la présence d'oxygène dissous en solution[115]. De la même manière, des interférences ioniques[52,82] peuvent être responsables du changement des propriétés d'oxydoréduction de l'IrOx comme les ions sodium [116] ou encore les ions oxalates, carbonates et phosphates[50] qui complexent à la surface de l'IrOx. Pour d'autres, l'adhérence imparfaite des couches d'IrOx déposées électrochimiquement peut générer une instabilité mécanique et induire une instabilité du capteur pH à long terme[96]. Pour la plupart des articles traitant des capteurs pH IrOx, une grande majorité des articles traitent de l'efficacité du capteur pH pour des études de très courtes durées (de 1h à 6h). Seuls quelques articles présentent des mesures pH effectuées pour des mesures longs termes (de 10 jours à 1 an) sans pour autant aborder les problèmes d'instabilité du capteur pH (Figure IV. 13).

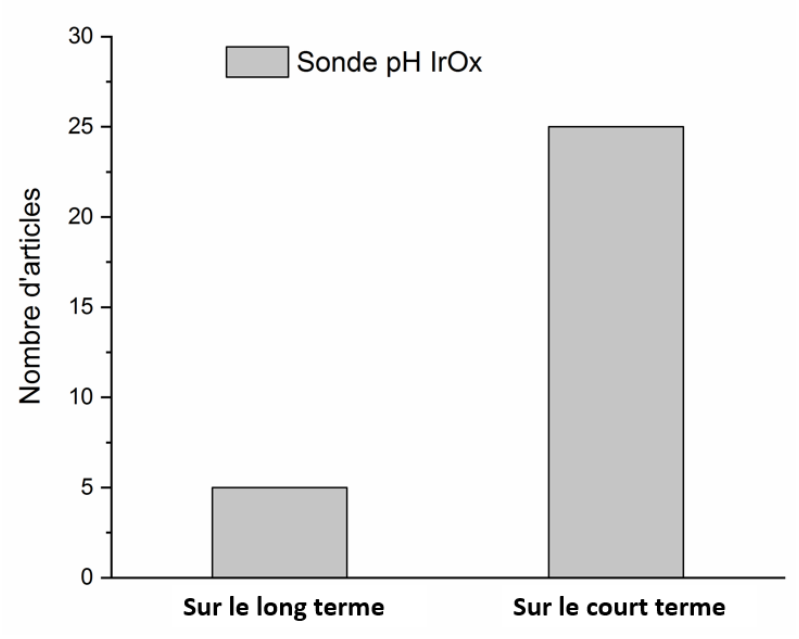


Figure IV. 13: Nombre d'articles traitant les capteurs pH IrOx pour des activités à court terme et à long terme.

Dans le tableau ci-dessous sont représentées les seules études de stabilité long terme des capteurs pH- IrOx:

Electrode	Technique de fabrication	Support	Surface	Perte sensibilité ou dérive temporelle	Temps de mesure	Domaine pH étudié	Littérature
IrOx	CV- 100 x [0; 0.6] V vs AgCl v=50 mV/s	Verre	10^{-3} cm2	Dérive de 20mV en OCV	10 jours	7	Yang, 2004
IrOx/Nafion (séché à 80°C)	CV-100 [0;0.55] V vs AgCl v=75 mV/s	Verre	5 x10^{-6} cm2	Dérive de 3mV en OCV	1 mois	7	Ges, 2005
IrOx/Nafion	CP-8 minutes 2 mA/cm²	Flexible-Kapton/ polyimide (160µm)	0,32 cm2	2,5 mV/pH	1 mois	2 - 10	Marzouk, 1998
IrOx/Nafion	CP- 20 minutes 0,0004 mA/cm2	Pointe en verre	4 x10^{-7} cm2	16 mV/pH	2 mois	4 - 10	Bezbaruah, 2002
Pt poreux/ IrOx	CV-50 x [0; 0.65] V vs AgCl v=10 mV/s	Flexible-Polyethylenenaphthalate (125µm)	9 x10^{-4} cm2	18 mV/pH	1 an	2 - 10	Zea, 2019

Tableau IV. 12: Ensemble de la littérature ayant étudié la stabilité long terme des IrOx déposés électrochimiquement.

Il apparait clairement dans le Tableau IV. 12, qu'il y a bien une perte de sensibilité du capteur pH. Il existe cependant des solutions permettant de réduire la perte de sensibilité ou la dérive du capteur pH notamment l'utilisation d'une membrane perméable comme le Nafion permettant de limiter les interférences ioniques[117–119].

Sur le Tableau IV. 13, Fog[82] résume les interférences ioniques subies par les différents oxydes métalliques. L'oxyde d'Iridium (IrO_2) en fait partie, les ions comme les Cl^-, Br^- et I^- produisent sur l'IrO_2 des interférences et par conséquent des hystérésis du capteur sont relevés impliquant alors une dérive du capteur.

Electrode material	Sensitivity mV/pH	Recommended pH range	Accuracy ±mV	Hysteresis pH 2 → 12 → 2 ±mV	Redox interference ±mV	Other interferences
TiO_2	55 0	2 - 12	15	30	100	F^-
RuO_2	61 8	2 12	2	9	100	I^-
$RhO_2\ xH_2O$	68 2	2 - 12	1	20	400	Br^-, I^-
SnO_2	46 6	—	65	75		
Ta_2O_5	49 3	3 - 10	30	50	70	F^-, I^-
$OsO_2\ H_2O$	51 2	2 - 11	15	25	200	
IrO_2	59 8	2 10	2	25	20	Cl^-, Br^-, I^-
PtO_2	46 7	5 - 10	4	100	100	I^-

Tableau IV. 13: Liste des oxydes métalliques utilisés comme capteurs pH et subissant des instabilités à cause d'interférences ionique.

Il y a également la technique de fabrication de l'IrOx qui peut jouer sur la stabilité mécanique de l'IrOx, comme constaté par Meyer[96] les dépôts effectués par dépôt galvanostatique ou par potentiométrique peuvent générer des craquelures parce que ce sont des techniques de dépôts rapides. Il propose pour cela, un dépôt contrôlé et plus adhérent en utilisant de voies de dépôt moins rapide comme la voltammétrie cyclique. Enfin parmi les autres facteurs limitant la stabilité des capteurs pH- IrOx, on citera l'épaisseur du dépôt d'IrOx, qui selon Elsen[98] produit un film fragile et non-uniforme si le dépôt est épais.

Tous ces facteurs énumérés seront étudiés dans la suite de ce chapitre afin d'améliorer la stabilité du capteur pH pour un suivi long terme.

4.3.3 Optimisation de la fabrication du capteur pH pour des suivis long terme

4.3.3.1 Etude avec une membrane protectrice

4.3.3.1.1 Nafion

Le Nafion est un copolymère à base de tétrafluoroéthylène sulfonaté qui est chimiquement et thermiquement résistant. Il se compose de chaînes de squelette C-F avec une extrémité contenant des groupes SO_3 -H^+ (Figure IV. 14). Le Nafion est en effet une membrane conduisant très facilement les ions cationiques et particulièrement les protons en raison de sa chimie de surface. En revanche sa membrane conduit difficilement les électrons et les anions tel que Cl^-, OH^-. De ce fait, le Nafion présente des propriétés remarquables tels que : une sélectivité des échange d'ions, une bonne tenue mécanique, une bonne stabilité chimique, thermique et électrochimique enfin une bonne conductivité protonique à des températures inférieures à 80°[1,2]. Ce sont les raisons pour lesquelles le Nafion est très utilisé dans les piles à combustibles, les traitements de surface de métaux, l'électrolyse de l'eau et les capteurs.

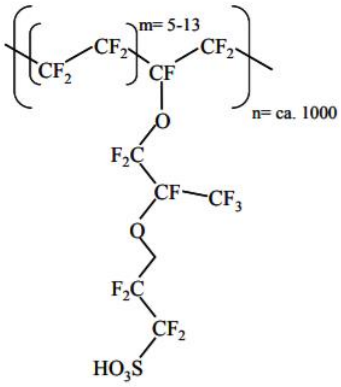


Figure IV. 14: Structure du Nafion.

Cette membrane protège les surfaces des oxydes métalliques contre certaines interférences ioniques et améliore la stabilité du capteur pH. Cette membrane sélective permet d'atténuer les effets oxydant ou réducteur à la surface des IrOx[57,117,118]. Comme l'a montré Kinlen[117], la membrane Nafion atténue les effets d'oxydo-réduction des espèces anioniques sur la surface de l'IrOx. Sur la Figure IV. 15, nous observons que des anions comme les ferri- ou ferrocyanures modifient les sensibilités pH des électrodes IrO_2 non traitées au Nafion avec une variation non linéaire. En revanche, les électrodes IrO_2 sur lesquelles une membrane de Nafion a été déposée permettent d'obtenir une réponse linéaire au pH. Ces résultats montrent que le Nafion est une membrane sélective, capable de contrer des ions tels que les ferri- ou ferrocyanures favorisant une variation linéaire du potentiel mesuré avec le pH.

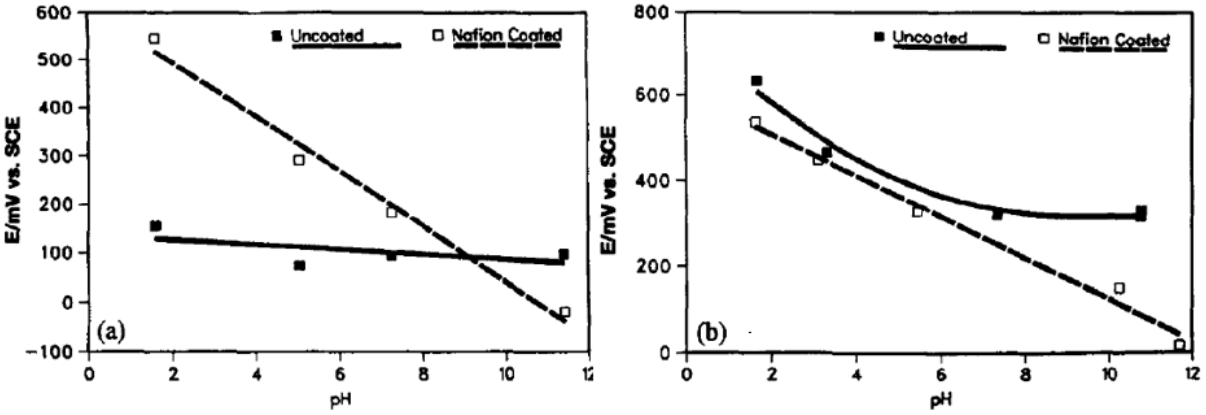


Figure IV. 15: Réponse pH sur des électrodes IrO_2 traitées (carré vide) et non traitées au Nafion (carré plein) dans un bain (a) 0.01M ferricyanure de potassium et dans un bain de (b) 0.01M de ferrocyanure de potassium.

4.3.3.1.2 Caractérisation du dépôt avec une couche de Nafion

A la suite d'une électrodéposition du film IrOx par CV (v=25mV/s), nous déposons 0,5µL de Nafion (5%) sur la surface de l'IrOx (0,04 cm^2). Nous laissons sécher l'électrode une journée[57] et mesurons l'épaisseur de Nafion déposé au profilomètre et qui est évalué à 2µm d'épaisseur (Figure IV. 16).

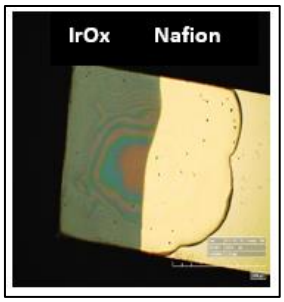


Figure IV. 16: Image au microscope du dépôt de Nafion sur le film IrOx.

Une fois le Nafion séché, nous avons caractérisé en milieu PBS par CV et par impédance électrochimique l'électrode avant et après le dépôt de Nafion. On peut noter que les pics Ox/Red sont moins visibles avec l'IrOx -Nafion, probablement dû à l'effet capacitif qu'induit le Nafion comme polymère sur l'électrode d'IrOx (Figure IV. 17. a). On remarque également par analyse d'impédance que l'IrOx -Nafion adopte un comportement résistif par rapport à l'IrOx seul (Figure IV. 17. b) ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le Nafion est moins conducteur et qu'il recouvre bien l'ensemble de l'électrode.

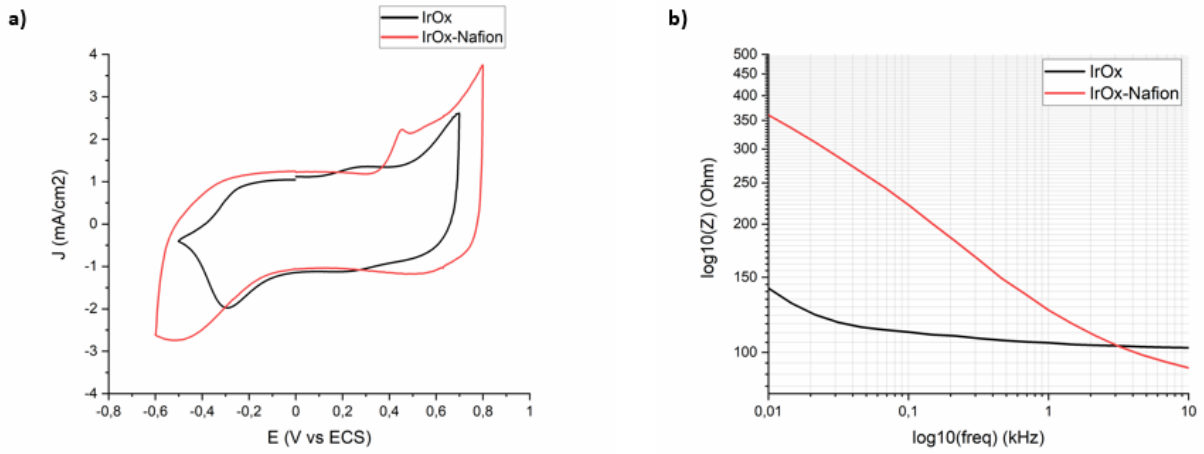


Figure IV. 17: Caractérisation en milieu PBS de l'électrode d'IrOx avant et après dépôt du Nafion : (a) CV à v=50mV/s vs ECS de : IrOx (noir), IrOx-Nafion (rouge) ; (b) EIS IrOx (noir), IrOx-Nafion (rouge).

4.3.3.1.3 Mesure de la sensibilité et de la stabilité du capteur IrOx avec une membrane Nafion

Une fois la couche de Nafion séchée, les électrodes IrOx -Nafion et IrOx sont hydratées dans un milieu PBS pendant 2 jours. Dans un second temps, nous avons effectué des mesures de sensibilités pH pour les électrodes d'IrOx et IrOx-Nafion dans les milieux PBS concentrés à 1X et 10X. La différence entre ces deux milieux est que le milieu PBS 10X est 10 fois plus concentré en ions Na^+, Cl^-, K^+ et HPO^-_4.

La composition du milieu **PBS (1X)** est la suivante: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 1,8mM KH_2PO_4 et **PBS (10X)** : 1,37M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na_2HPO_4, 18 mM KH_2PO_4.

Nous vérifierons par cette méthode si le Nafion fait barrière aux ions responsables des dérives/hystérésis observées précédemment. Les mesures sont réalisées en circuit ouvert avec une électrode Calomel (ECS) comme référence et l'électrode d'IrOx et IrOx -Nafion comme électrode de travail. Nous avons évalué la sensibilité de ces électrodes pour des pH : 6,5 , 7 et 7,5. Pour ce faire, les électrodes sont d'abord plongées une minute en solution avant la mesure du potentiel.

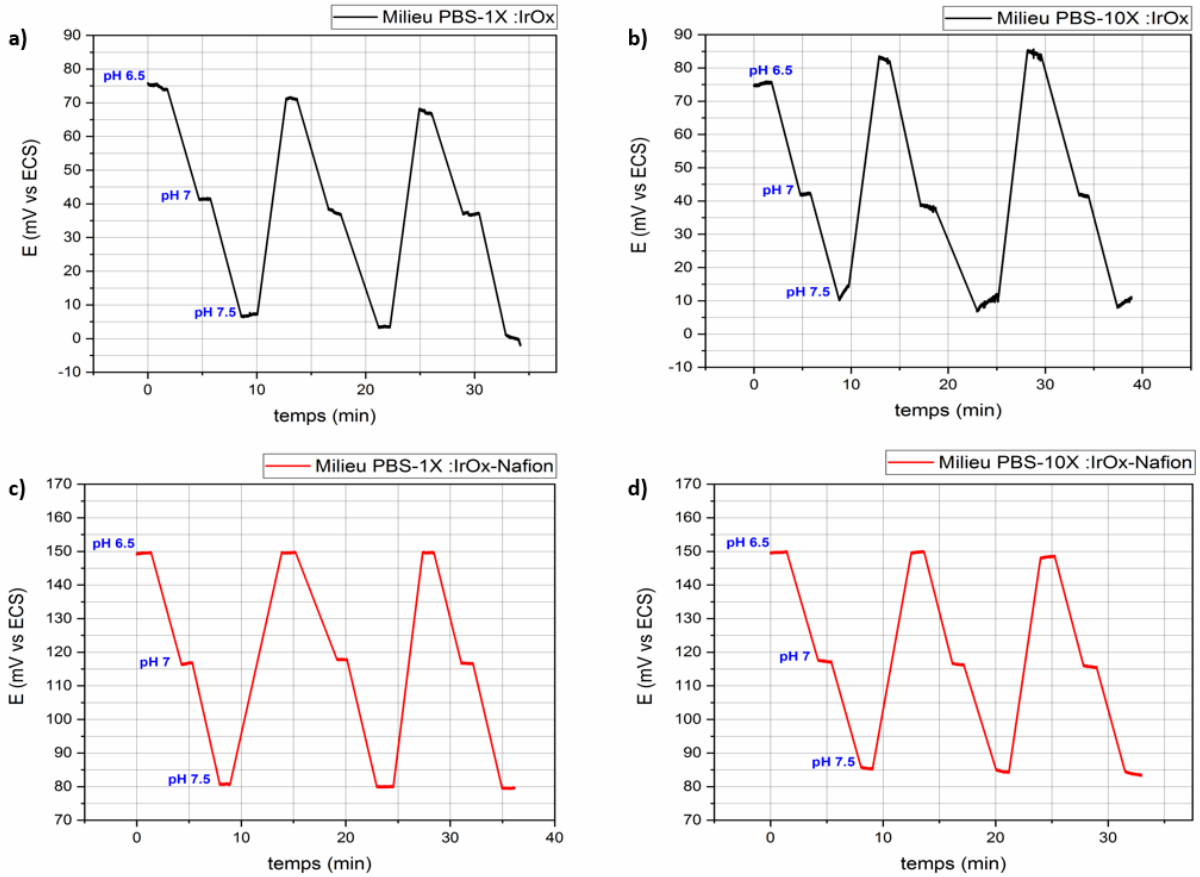


Figure IV. 18: Mesures de sensibilité pH dans des solutions tampons PBS dilué et concentré pour des électrodes d'IrOx traitées et non traitées au Nafion. Mesure du potentiel de l'électrode en circuit ouvert dans des solutions pH 6,5, 7 et 7,5. (a) Electrode IrOx non traitée plongée dans une solution PBS dilué (1X), (b) électrode IrOx non traitée plongée dans une solution PBS concentré (10X), (c) électrode IrOx traitée avec Nafion plongée dans une solution PBS dilué (1X) et (d) électrode IrOx traitée avec Nafion plongée dans une solution PBS concentré (10X).

Tout d'abord, nous observons sur la Figure IV. 18 une sensibilité similaire entre les électrodes d'IrOx et d'IrOx -Nafion, qui est de |69-70|mV/pH. Il n'y a donc pas de diminution de sensibilité en présence de la membrane de Nafion sur l'IrOx. Nous avons ensuite évalué les sauts en potentiel des électrodes en présence des deux milieux de PBS : 1X et 10X. Nous observons dans le milieu 1X, une nette stabilisation des sauts pour l'IrOx -Nafion (Figure IV. 18. c) alors que pour l'IrOx, on observe une légère dérive de quelques millivolts (Figure IV. 18. a). Cette dérive est encore plus prononcée dans le milieu 10X (Figure IV. 18. b), ceci pourrait

s'expliquer par la forte présence d'ions en solution perturbant le film d'IrOx. Néanmoins dans le milieu concentré (10X), l'IrOx -Nafion (Figure IV. 18. d) présente également une légère dérive à des pH 7 et 7,5. Ceci confirme l'hypothèse que le Nafion agit bien comme une couche barrière à l'IrOx réduisant la migration des anions de la solution vers la couche d'IrOx. Cependant l'apparition d'une dérive pour l'IrOx -Nafion en milieu concentré (10X) démontre que cette barrière n'est pas parfaite.

Nous avons poursuivi les mesures de pH avec l'électrode IrOx-Nafion en milieu PBS (1X) (Figure IV. 19. a). Nous avons effectué plusieurs cycles de mesure sur 140 minutes, afin d'évaluer si le Nafion agit comme une barrière protectrice tout au long de la mesure. En effet, les sauts en potentiels sont observés lorsqu'il y a changement de pH mais une légère dérive commence à s'installer dès le premier cycle, cette dérive devient de plus en plus importante à mesure que l'on avance dans le temps. De ce résultat nous pouvons émettre l'hypothèse que l'IrOx -Nafion a subi des perturbations ioniques à sa surface qui ont probablement changé les propriétés chimiques du film d'IrOx. Ces modifications apparaissent clairement lorsque l'IrOx -Nafion est caractérisé par CV en milieu PBS (1X) (Figure IV. 19. b) avec l'apparition d'un nouveau pic à -0,4V vs ECS et un léger décalage du pic d'oxyde de l'IrOx situé à 0,4V. Par définition, le Nafion agit comme une membrane stoppant uniquement la diffusion des anions et laissant passer les cations, il est probable que les cations comme Na^+ ou K^+ ne sont pas bloqués et agissent à la surface de l'IrOx.

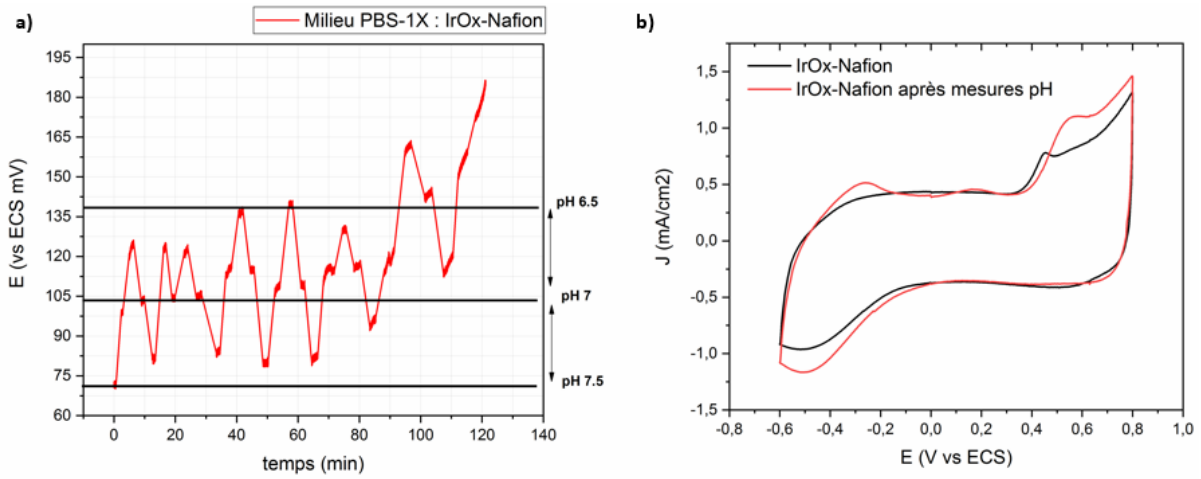


Figure IV. 19: (a) Mesures pH avec l'électrode IrOx-Nafion en milieu PBS 1X sur plusieurs cycles de mesure répartis sur 140 minutes. (b) Caractérisation CV (v=50mV/s) de l'électrode IrOx-Nafion en milieu PBS (1X) avant les mesures de sensibilités pH (rouge) et après les mesures de sensibilités pH (bleu).

Par la suite nous avons procédé à des mesures de stabilité des électrodes IrOx et IrOx -Nafion dans un milieu PBS (1X) avec un pH fixé à 7,4, dans le but d'observer si le Nafion agit véritablement comme une membrane protectrice et s'il permet de mieux stabiliser le potentiel OCV de l'IrOx.

Nous avons mesuré alors le potentiel OCV (mV) pour chacune des électrodes en fonction du temps, c'est un système de mesure à deux électrodes où l'électrode d'IrOx est connectée à une électrode de référence en Calomel (ECS). Une fois la mesure terminée nous remesurons le pH

de la solution qui ne devrait pas bouger car la solution PBS est un milieu tamponné. Les électrodes sont chacune plongées en milieu PBS avec respectivement une électrode de référence (ECS), la solution et les électrodes sont couvertes d'un capuchon permettant le maintien de la solution sans évaporation pendant le suivi long terme.

Nous avons ensuite évalué les dérives des électrodes d'IrOx et d'IrOx -Nafion en effectuant des mesures du potentiel dans une même solution (PBS 1X, pH=7,4) pendant 10 jours. Comme nous pouvons l'observer sur la Figure IV. 20. a, les électrodes présentent des perturbations sur leurs mesures de potentiel OCV, ces potentiels varient arbitrairement. On linéarisera les courbes obtenues afin d'estimer la pente de la dérive émanant des électrodes d'IrOx et IrOx -Nafion. Comme on peut le voir sur cette figure, les pentes sont décroissantes pour les deux électrodes, mais elles sont aussi croissantes pour d'autres échantillons déposés dans les mêmes conditions. On pourra noter que pour ces deux échantillons, la pente de la dérive reste tout de même importante : 5,3 mV/ jour pour l'IrOx -Nafion et 3,1mV/jour pour l'IrOx (Figure IV. 20. a), contrairement à ce qu'a obtenu Ges[107] avec l'IrOx -Nafion, soit 3 mV / mois. La dérive est tout de même plus importante pour l'électrode d'IrOx avec Nafion (Figure IV. 20. b). Comme on peut l'observer, la membrane de Nafion n'agit pas remarquablement sur la stabilité du capteur, il semblerait qu'un autre élément plus déterminant puisse être à l'origine des dérives observées.

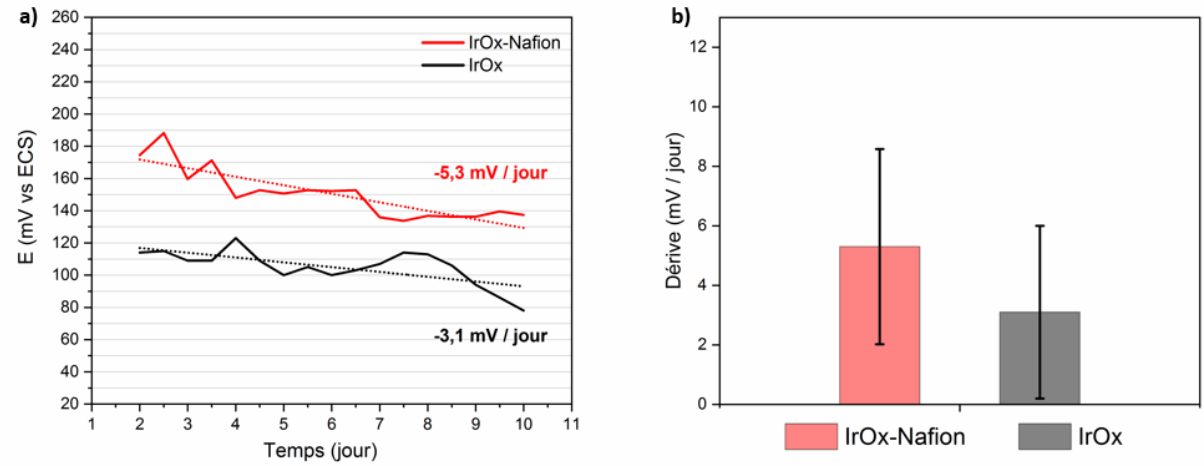


Figure IV. 20: (a) Evolution du potentiel des électrodes d'IrOx traitées avec Nafion (rouge) et non traitées (noir) sur 10 jours de mesures en continue dans un milieu PBS (1X, pH=7,4). (b) Dérive moyenne du potentiel évaluée sur une dizaine de jours pour les électrodes d'IrOx traitées au Nafion (rouge) et non traitées (noir).

4.3.3.1.4 Conclusion

Nous pouvons conclure que le Nafion permet de réduire la dérive du potentiel de l'IrOx à court terme. En revanche à long terme, cette dérive évolue comme celui de l'électrode d'IrOx sans Nafion. Cela pourrait avoir un lien intrinsèque avec le matériau comme on a pu l'observer sur la Figure IV. 19.b où une légère dérive anodique se produisait sur le pic de l'oxyde d'Iridium juste après les mesures pH. Un changement de structure de la surface de l'IrOx pourrait expliquer cette dérive d'autant plus que cette dérive reste non prévisible aussi bien pour l'IrOx que pour l'IrOx -Nafion. Pour conclure sur cette étude, le Nafion n'apporte pas d'amélioration

sensible sur la stabilité du capteur IrOx. Afin d'étudier les autres paramètres permettant l'optimisation du capteur IrOx et de comprendre les autres facteurs d'instabilité, nous n'avons pas utilisé le Nafion pour la suite de nos expériences.

Il est possible que l'instabilité du capteur d'IrOx puisse provenir d'une instabilité mécanique du capteur d'IrOx comme l'a identifié Elsen[49]. Il explique que l'électrodéposition du film d'IrOx par une grande densité de courant génère une plus grosse épaisseur ainsi qu'une plus grande porosité qui induit par conséquent une instabilité mécanique du capteur pH. Nous allons dans le paragraphe suivant étudier l'effet de l'épaisseur de l'IrOx sur sa stabilité sur le long terme.

4.3.3.2 Etude sur l'épaisseur d'IrOx déposée

L'épaisseur peut induire une instabilité du capteur d'IrOx. Comme observé par MEB, les IrOx déposés par CP, CV ou pulsé présentent des craquelures à la surface (Tableau IV. 9), celles-ci peuvent apparaître après le dépôt, lorsque la solution électrolytique s'évapore de la surface de l'oxyde d'Iridium[121,122]. Si l'épaisseur était plus fine alors ces phénomènes d'IrOx craquelés seraient moins prononcés[123] ce qui pourraient probablement améliorer la stabilité du capteur IrOx. Elsen[98] a utilisé pour cela des dépôts par CV afin de mieux contrôler les épaisseurs de film d'IrOx, les dépôts fins varient entre 50nm et 320nm.

Dans notre cas, les dépôts d'IrOx étudiés précédemment avaient pour épaisseur 1µm avec une densité de courant de 0,5C/cm^2, semblable aux conditions de dépôts d'IrOx dans la littérature et présentent des craquelures (Figure IV. 21). Nous allons au cours de ce paragraphe diminuer la densité de courant du dépôt d'IrOx, de façon à diminuer l'épaisseur de l'IrOx et diminuer les fissures observées sur les bords de l'électrode.

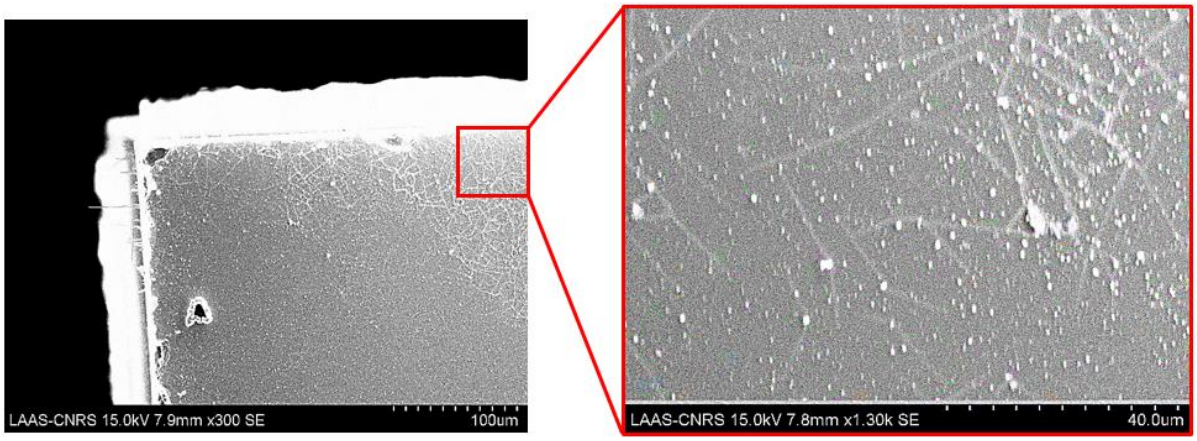


Figure IV. 21: Observation MEB d'un dépôt IrOx réalisé par CV (0,5C/cm2) avec observation de craquelures à la surface de l'électrode d'IrOx.

4.3.3.2.1 Dépôt d'IrOx avec différentes densités de courant

Les dépôts sont réalisés sur des électrodes de surface identiques de 0,04 cm^2, les électrodes sont préalablement nettoyées par CV dans un bain H_2SO_4 durant plusieurs cycles. Par la suite, les dépôts ont été réalisés par CV à une vitesse de balayage de 25 mV/s entre [-0,05-0,66] V vs ECS avec quatre densités de charges : 25, 50, 100 et 200 mC/cm^2 (Tableau IV. 14)

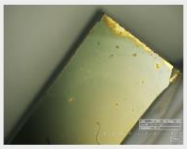
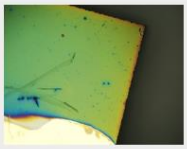
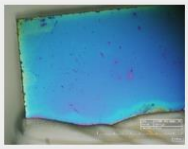
Nombre cycles de dépôt par CV (25mV/s)	10	20	40	80	400
Charge injectée	25 mC/cm2	50 mC/cm2	100 mC/cm2	200 mC/cm2	500 mC/cm2
Epaisseur	40 ± 10 nm	100 ± 15 nm	180± 20 nm	400± 20 nm	1µm± 50 nm
Image microscope					

Tableau IV. 14: Résumé récapitulatif des différentes densités de charges appliquées avec leurs épaisseurs correspondantes pour l'électrodéposition d'IrOx à la surface des électrodes d'or de 0,04 cm^2.

Ces densités de charge sont comparées à celles utilisées précédemment c'est-à-dire 0,5C/cm^2. Sur la Figure IV. 22. a, nous pouvons observer les différents dépôts réalisés par CV ainsi que leurs caractérisations en milieu PBS (1X) (Figure IV. 22. b). Nous pouvons clairement distinguer l'augmentation de la charge capacitive des IrOx lorsque les densités de charge de dépôt augmentent. Par ailleurs, pour chacune des densités de courant nous avons mesuré l'épaisseur des IrOx déposés à l'aide d'un profilomètre, ces épaisseurs sont de 40nm, 100nm, 180nm, 400nm et 1µm d'épaisseur pour des densités de charge respectives de 25, 50, 100, 200 et 500 mC/cm^2. Ces résultats sont bien en accord avec leurs caractérisations par CV. Il est également possible d'estimer ces différentes épaisseurs par microscopie optique, la couleur des dépôts varie en effet en fonction de l'épaisseur. Ainsi pour un dépôt fin on obtiendra un film d'IrOx transparent et pour des dépôts plus épais l'IrOx vire au bleu.

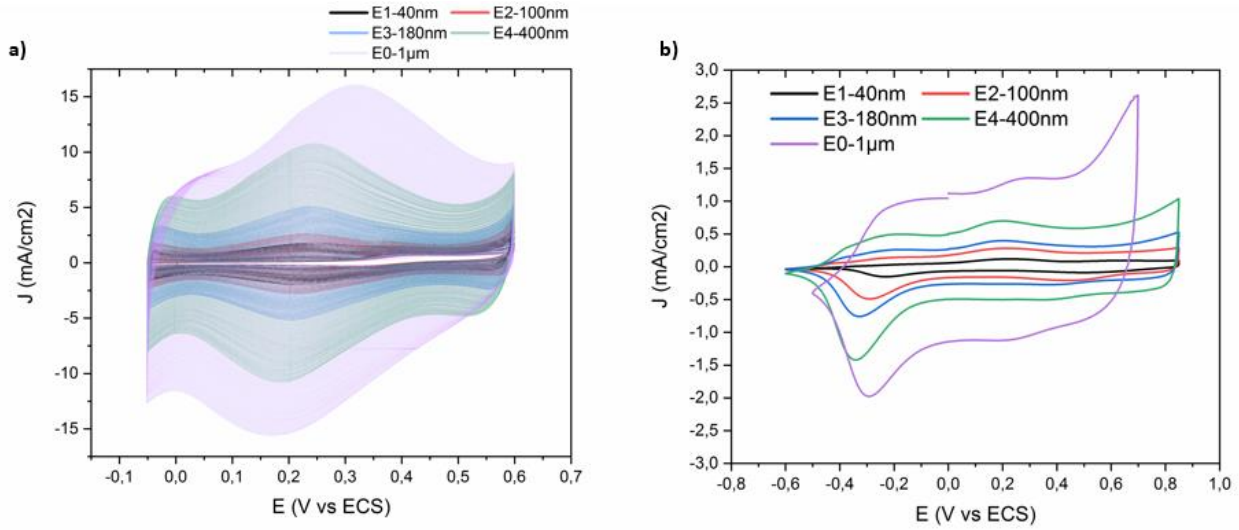


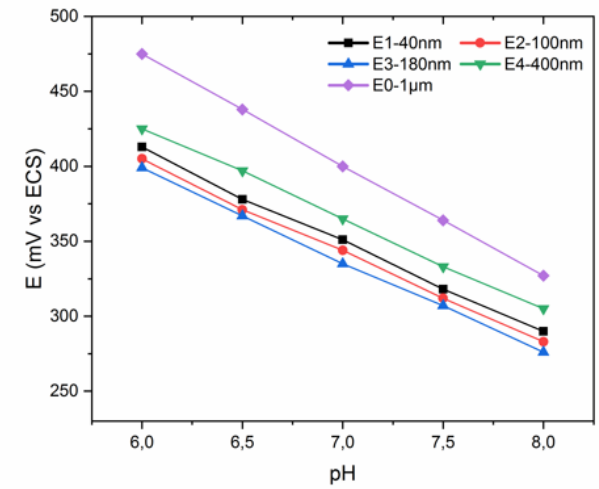
Figure IV. 22: (a) Electrodéposition IrOx par CV (v=25mV/s) sur [-0,05-0,66] V vs ECS pour les épaisseurs suivantes : 40nm (noir), 100nm (rouge), 180nm (bleu), 400nm (vert) et 1µm (violet). (b) Caractérisations CV en milieu PBS (1X) à 50mV/s vs ECS des électrodes d'IrOx d'épaisseurs : 40nm (noir), 100nm (rouge), 180nm (bleu), 400nm (vert) et 1µm (violet).

4.3.3.2.2 Mesure sensibilité et stabilité du capteur IrOx avec différentes épaisseurs

Dans la suite des analyses, nous avons plongé les électrodes dans un milieu PBS afin qu'elles s'hydratent. Nous avons d'abord mesuré leurs sensibilités et ensuite évalué leurs stabilités sur le long terme (10 jours).

Les mesures de sensibilité ont été réalisées en milieu PBS à des pH de : 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 et 8 (Figure IV. 23).

On note que, quelle que soit l'épaisseur de l'IrOx, il existe une linéarité de la réponse du capteur en fonction du pH. Néanmoins, une plus grande sensibilité est obtenue pour les capteurs présentant une plus grande épaisseur d'IrOx, soit avec 400nm et 1µm. Cette plus grande sensibilité peut être expliqué par la présence d'une plus grande surface active d'IrOx comme observé sur les CV IrOx (Figure IV. 22. b).



Epaisseur	Sensibilité
40 nm	- 60 ± 4,5 mv / pH
100 nm	- 64 ± 3 mv / pH
180 nm	- 66 ± 5,3 mv / pH
400 nm	- 71 ± 2,8 mv / pH
1 µm	- 76 ± 6 mv / pH

Figure IV. 23: Mesures de sensibilité pH [6-8] avec les électrodes IrOx de différentes épaisseurs.

Par la suite nous avons procédé à des mesures de stabilité des électrodes IrOx et évalué leurs dérives en fonction de leurs épaisseurs. Les mesures ont été effectuées en milieu PBS à pH 7,4.

Nous avons mesuré le potentiel OCV (mV) pour chacune des électrodes en fonction du temps, c'est un système de mesure à deux électrodes où l'électrode d'IrOx est connectée à une électrode de référence en Calomel (ECS). Les deux électrodes sont plongées en milieu PBS. L'ensemble est couvert d'un capuchon permettant le maintien de la solution sans évaporation pendant le suivi long terme.

Dans un premier temps, nous avons observé des variations du potentiel pour chacune des épaisseurs, nous avons évalué les dérives par linéarisation de leurs potentiels en fonction du temps (Figure IV. 24. a). En effet, les pentes obtenues pour chaque épaisseur montrent une plus grande dérive pour l'électrode de 400 nm d'épaisseur qui est de |6,84| mV/ jour, alors que pour

les plus faibles épaisseurs, les dérives sont moins importantes. Elles présentent des dérives (mV/jour) de |1,68| ; |1,27| et |0,81| pour les épaisseurs respectives: 180nm, 40nm et 100nm. Les mesures ont été répétées pour plusieurs échantillons (Figure IV. 24. b) et montrent des résultats équivalents, excepté pour les échantillons avec des épaisseurs de 180nm et 400nm qui possèdent une plus grande disparité des dérives qui peut être expliquée par la présence d'une contrainte mécanique plus importante pour ces grandes épaisseurs, les conduisant à être plus instables.

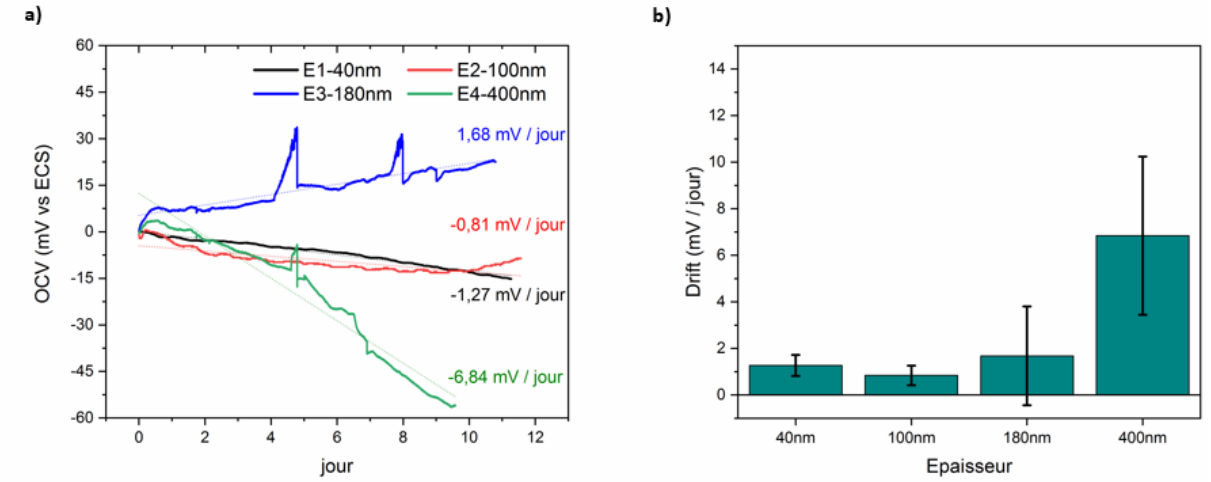


Figure IV. 24: (a) Mesures en continu sur 10 jours du potentiel OCV des électrodes IrOx avec différentes épaisseurs. (b) Dérive moyenne évaluée sur une dizaine de jours pour les électrodes d'IrOx d'épaisseurs 40, 100, 180 et 400 nm.

Nous avons ensuite observé par MEB les morphologies des IrOx après les mesures OCV (Figure IV. 25). On constate pour l'épaisseur de 400nm, la présence de craquelures et de délamination de l'IrOx (Figure IV. 25. a). Quelques légers défauts apparaissent à la surface des électrodes IrOx pour des épaisseurs de 180nm (Figure IV. 25. b) et de 100nm (Figure IV. 25. c). Seule l'électrode IrOx d'épaisseur 40nm (Figure IV. 25. d) montre un dépôt lisse et homogène. La présence de craquelures et de délamination sur l'électrode d'IrOx d'épaisseur 400nm pourrait expliquer son importante dérive relevée dans les mesures OCV par rapport aux autres épaisseurs (Figure IV. 24).

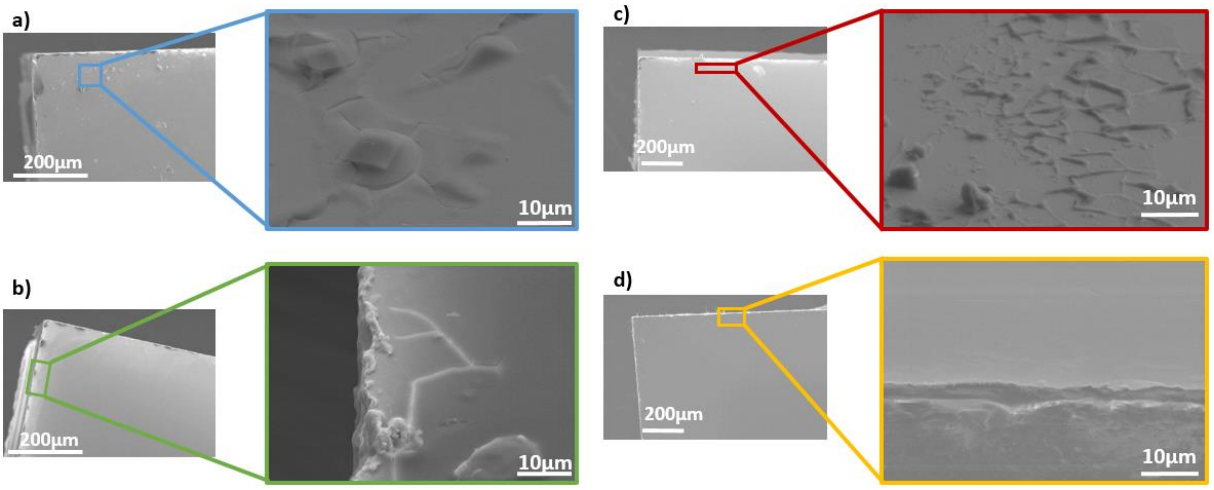


Figure IV. 25: Observation MEB des échantillons IrOx après suivi en milieu PBS pendant 10 jours. (a) 400nm, (b) 180nm, (c) 100nm et (d) 40nm.

Par ailleurs, d'autres réponses peuvent être apportées sur la question de la dérive. L'IrOx formé électrochimiquement est de structure hydratée par la présence de groupements OH sur Ir, soit -Ir^{III}-OOH[59] et il se présente comme un oxyde métallique poreux. D'après Kasian[59] l'IrOx hydraté et poreux développe lors de sa formation des lacunes sur sa structure, celles-ci peuvent être comblées par des molécules d'eau lorsque l'IrOx est immergé en solution. Ces nouvelles liaisons avec les molécules d'eau peuvent affaiblir les liaisons -Ir^{III}-OOH préétablies et dissoudre par conséquent l'Iridium en solution. Les -Ir^{III}-OOH peuvent être identifiés par CV, on pourra donc identifier le pic d'oxydation Ir(III)OOH -> Ir(IV)O_2 à 0,2 V vs ECS et son pic retour à -0,3 V vs ECS (Cf. flèche Figure IV. 26. a), ces pics ne sont pas réversibles probablement dû à la présence des OH sur l'IrOx [111]. Lorsque nous comparons les caractérisations CV des électrodes d'IrOx (Figure IV. 26) juste après leurs électrodépositions et après leurs suivis long terme en milieu PBS (10 jours), nous constatons que le pic à -0,3V diminue fortement pour l'ensemble des électrodes de 40, 100, 180 et 400nm. Ce pic pourrait correspondre à -Ir^{III}-OOH et diminuerait donc après le suivi de l'IrOx en milieu PBS, comme évoqué précédemment les liaisons Ir(III) et OH se rompent avec le vieillissement de l'IrOx en solution entraînant alors la dissolution de l'Iridium. Ceci conduit à une dérive qui apparaît sur l'ensemble des OCV des différentes épaisseurs d'IrOx (Figure IV. 24).

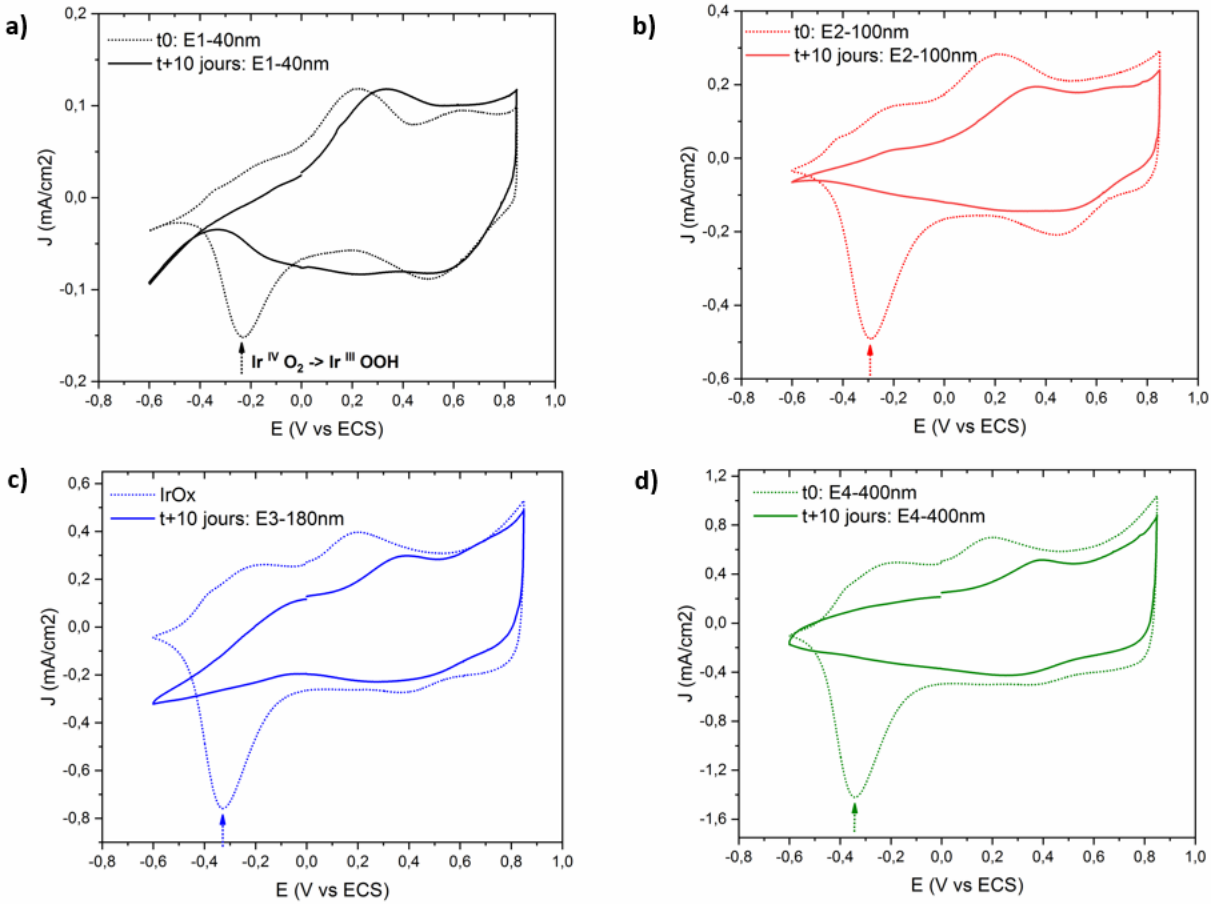


Figure IV. 26: Caractérisations CV des électrodes IrOx dans un milieu PBS (1X) à v=50mV/s avant (trait pointillés) et après leurs suivis long terme en milieu PBS (trait plein), pour les épaisseurs : (a) 40nm, (b) 100nm, (c) 180nm et (d) 400nm.

La sensibilité pH semble elle aussi impactée lorsque des mesures de sensibilité ont été réalisées après les 10 jours de suivi en milieu PBS (Tableau IV. 15). Sur le tableau ci-dessous on peut noter une diminution de la sensibilité pour l'ensemble des épaisseurs. Par analyse comparative, il y a vraisemblablement un lien entre la perte de sensibilité et la diminution du pic situé à -0,3V présenté dans les CV IrOx (Cf. flèche Figure IV. 26).

Epaisseur	Sensibilité après 10 jours de suivis dans milieu PBS (mV/pH)	Evaluation perte sensibilité après 10 jours (mV/pH)
40 nm	- 58 ± 3,2	**2**
100 nm	- 62 ± 2,1	**2**
180 nm	- 62 ± 6	**4**
400 nm	- 64 ± 4,3	**7**

Tableau IV. 15: Evaluation de la perte de sensibilité des électrodes IrOx après leurs suivis long terme.

4.3.3.2.3 Conclusion

Pour conclure sur la stabilité des capteurs IrOx en fonction de leurs épaisseurs : les dérives sont importantes et apparaissent pour des épaisseurs élevées, comme observé pour 1µm et 400nm. Ces dérives peuvent être causées par une instabilité mécanique du film d'IrOx déposé et par l'apparition des craquelures lorsque la densité de charge de dépôt est élevée. Néanmoins, la dérive reste présente pour toutes les épaisseurs étudiées, elle est probablement dû au vieillissement de l'IrOx qui en raison de sa structure hydrate et amorphe peut conduire à la dissolution de l'Iridium.

4.3.3.3 Conclusion sur l'optimisation de la stabilité du capteur pH IrOx

Pour conclure sur l'étude de l'optimisation de la dérive des capteurs IrOx pour des suivis long terme, il apparait que la dérive peut être impactée par plusieurs paramètres notamment par la présence des craquelures qui réduisent fortement sur la stabilité du capteur. Ces craquelures peuvent être supprimées en faisant le choix de déposer l'IrOx par CV à faible vitesse de balayage avec une faible densité de charge. On a pu établir que les dépôts à faible densité de charge produisaient des films d'IrOx plus fins et mécaniquement plus stables. Nous avons en effet observé par MEB que les dépôts étaient restés adhérents au substrat après un long suivi en milieu PBS. En revanche, la dérive est continuellement présente pour toutes les épaisseurs d'IrOx dont les propriétés chimiques intrinsèques changent à cause de son vieillissement rapide en solution. En outre, le dépôt d'une couche de Nafion n'a pas permis de supprimer ce vieillissement intrinsèque de l'IrOx. Il est donc important de calibrer la dérive du capteur IrOx avec un grand panel d'échantillons avant de débuter des mesures pH. C'est ce que nous allons aborder dans le paragraphe suivant.

4.4 TRANSFERT DU CAPTEUR PH IROX SUR MEA

Bien que discuté dans les parties précédentes du réel problème de dérive du capteur pH IrOx sur le long terme, nous intégrerons le capteur pH IrOx sur MEA en prenant en compte cette dérive, en procédant à des étapes de calibrations du capteur. Le dépôt IrOx est effectué sur des microélectrodes MEA dans le but de suivre le pH du milieu de croissance de la culture neuronale *in vitro*.

4.4.1 Electrodéposition et caractérisation du capteur pH sur MEA

En considérant l'optimisation des paramètres d'électrodéposition du film IrOx sur macro électrodes nous avons choisi d'établir un dépôt IrOx sur MEA avec une faible densité de charge de 25mC/cm^2 et à une faible vitesse de dépôt de 25 mV/s. Nous avons utilisé ces conditions de

dépôt sur microélectrodes d'or d'une MEA commerciale (MEA ECO MultiChannelSystems MCS) avec un diamètre de 100µm. Le dépôt d'IrOx a été réalisé à partir d'une solution alcaline d'oxyde d'Iridium, préparée selon la méthode de Yamanaka[49]. La MEA contient un puit dans lequel la solution d'oxyde d'Iridium est contenue, c'est dans cette chambre que seront immergés deux électrodes connectées à l'électrode de travail. Avec la microélectrode d'or de la MEA comme électrode de travail, la Réf Ag/AgCl comme électrode de référence et l'électrode de platine comme contre électrode, toutes ces électrodes sont connectées à un potentiostat (VMP3-BIOLOGIC) (Figure IV. 27).

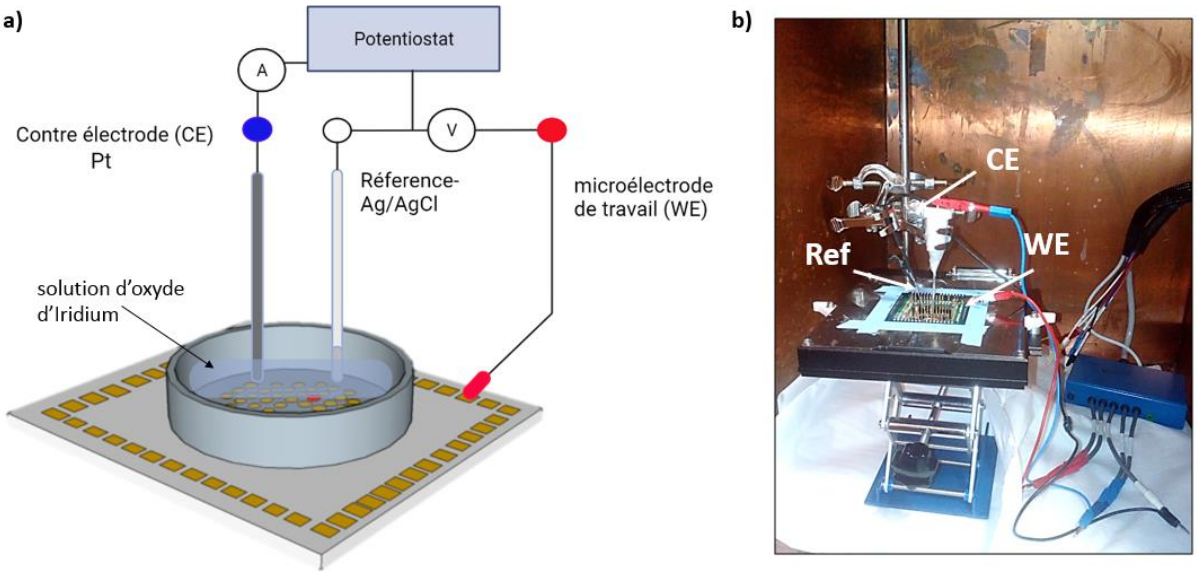


Figure IV. 27: Principe de dépôt IrOx sur microélectrode MEA (d=100µm). (a) Schéma du montage avec un système à trois électrodes connectées au potentiostat : l'électrode de platine comme CE, l'électrode de Référence Ag/AgCl comme Réf et la microélectrode MEA comme WE. (b) Image du montage avec la MEA connectée à la plateforme d'acquisition du signal.

Dans un premier temps la microélectrode d'or est activée électrochimiquement dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) (0,5M) par CV à grande vitesse de balayage (v=200mV/s) et sur une fenêtre [-0,5 ; 1,7] V (Figure IV. 28. a). Dans un deuxième temps, nous rinçons l'électrode à l'eau DI et nous introduisons dans la chambre la solution alcaline d'oxyde d'Iridium pour le dépôt. L'électrodéposition de l'IrOx est réalisé par CV, à faible vitesse de balayage, soit v=25mV/s sur une fenêtre de [-0,05, 0,66] V vs AgCl. Sur la Figure IV. 28. b, on peut voir l'électrodéposition du film IrOx sur la microélectrode MEA dont la surface est de 7850µm^2. Le dépôt est stoppé lorsque la charge surfacique atteint 25mC/cm^2 (Figure IV. 28. c).

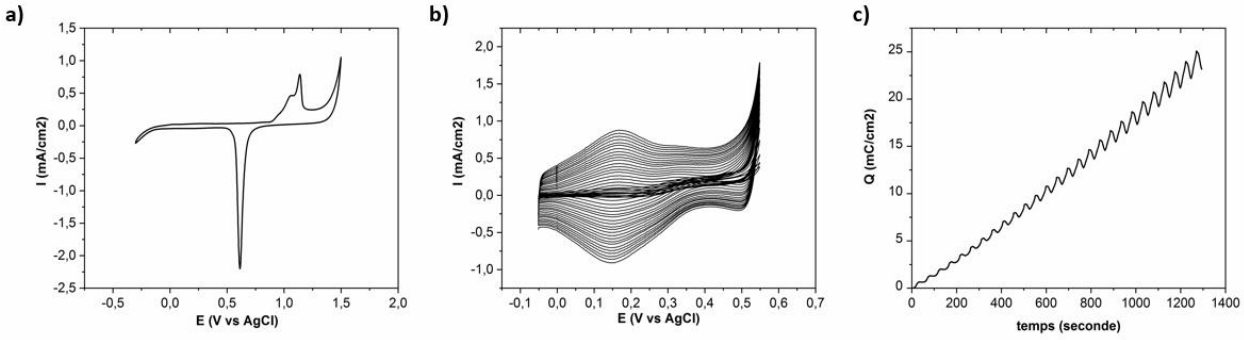


Figure IV. 28: (a) Activation par CV de la surface d'or d'une microélectrode MEA dans un milieu H_2SO_4 (0,5M). (b) Electrodéposition IrOx par CV (v=25mV/s) sur [-0,05, 0,66] V vs AgCl avec (c) pour une charge équivalente 25 mC/cm^2.

Sur la Figure IV. 29, la microélectrode IrOx est d'abord imagée par microscopie optique puis par MEB. On note que le dépôt est bien localement déposé sur la surface de la microélectrode, l'observation MEB montre que le dépôt IrOx est rugueux et bien adhérent à la surface.

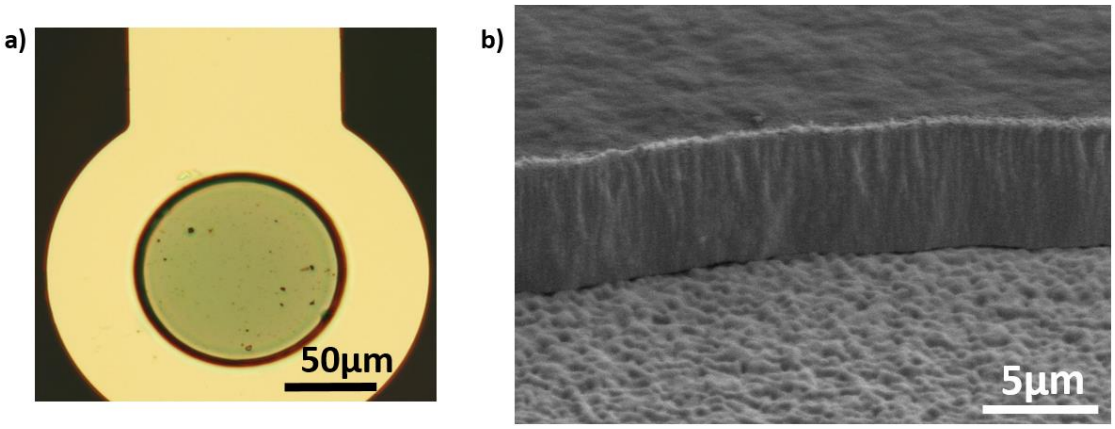


Figure IV. 29: (a) Image au microscope optique de la microélectrode IrOx (d=100µm), (b) image MEB de la surface de la microélectrode IrOx.

Une fois le dépôt terminé, la microélectrode est caractérisée par CV dans un milieu PBS (Figure IV. 30). Nous pouvons identifier les deux couples redox quasi-réversibles : Ir(III)/Ir(IV) à -0,3V vs AgCl et Ir(IV)/Ir(V) à 0,2 V vs AgCl[124] à la surface de la microélectrode IrOx.

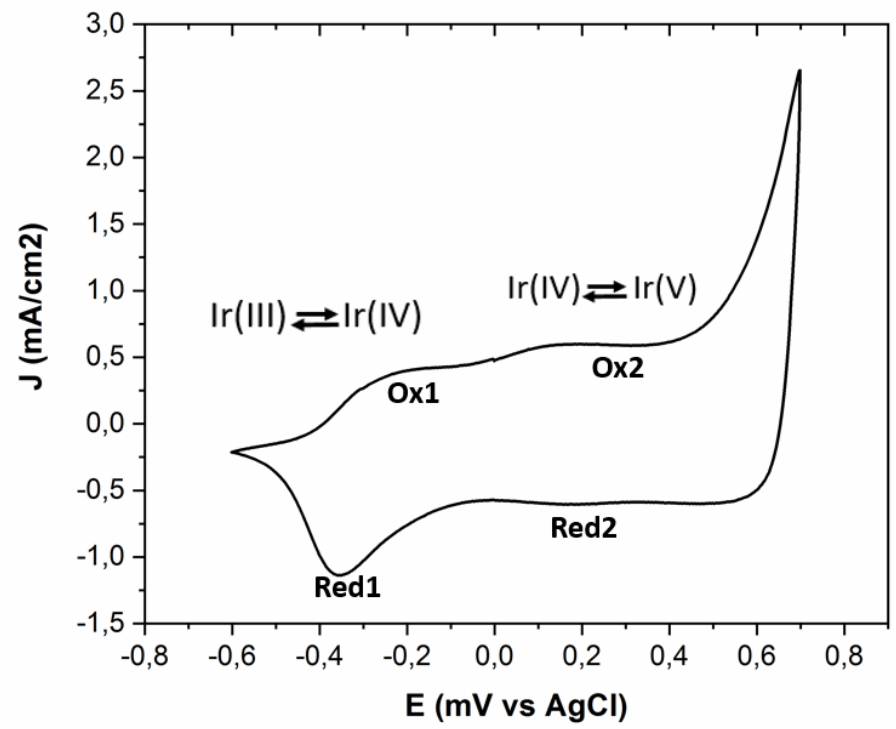


Figure IV. 30: Caractérisation par CV en milieu PBS de la microélectrode IrOx.

4.4.2 Calibration du capteur pH sur MEA

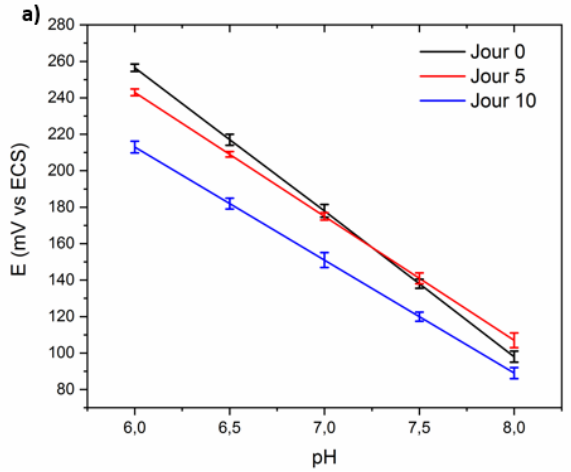
L'une des difficultés majeures qui se pose aujourd'hui avec notre capteur pH IrOx, c'est le fait de suivre le pH sur le long terme d'un milieu de culture sans possibilité de le pré-calibrer. En effet, nous avons vu dans la partie précédente que malgré une optimisation des conditions de dépôts de l'IrOx pour améliorer sa stabilité dans le temps, les propriétés intrinsèques du matériau IrOx pouvaient varier sensiblement ce qui rend la calibration laborieuse en vue d'obtenir la valeur pH du milieu de la culture neuronale sur du long terme. Nous avons donc établi deux calibrations du capteur pH: la sensibilité et la stabilité, avec une statistique obtenue sur dix échantillons. Les mesures ont été répétées sur plusieurs électrodes afin d'établir une moyenne de la dérive du capteur IrOx.

Nous effectuons des mesures de sensibilité pH par potentiométrie (OCV) aux jours : 0, 5 et 10. Pour cela, les électrodes restent continuellement hydratées deux jours en milieu PBS (1X, pH=7,4) pour éviter la fragilisation mécanique du film IrOx. Les mesures de sensibilité sont effectuées dans des solutions préalablement préparées aux pH: 6 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 ; 8.

Les mesures OCV des capteurs IrOx présentent bien une linéarité au pH (Figure IV. 31. a). Celle-ci équivaut en moyenne à 79 ± 3 mV/pH au jour 0 et diminue au cours du temps jusqu'à atteindre au 10ième jour une sensibilité moyenne de 61± 3 mV/pH (Figure IV. 31. b). Ces mesures nous montrent que bien que les capteurs IrOx soient très sensibles au pH, les capteurs présentent une forte perte de sensibilité sur les 10 jours de mesure. Soit la sensibilité moyenne sur les 10 jours de mesure est de 69,3 ± 9 mV/pH avec un écart type relatif de 13% autour de

la moyenne. L'écart type étant élevé, il produirait sur cette période de mesure une erreur de l'évaluation du pH de 0,1 unité.

Selon Hitchman[86], plus le dépôt d'oxyde d'Iridium est fin et plus la perte de la sensibilité pH est visible car le film IrOx est constamment en contact avec l'électrolyte, ce qui peut l'amener à se corroder puis à se dissoudre plus rapidement qu'un film épais. Les films IrOx électrodéposés sur la MEA présentent une épaisseur fine, en moyenne 40nm. C'est la raison pour laquelle on observe une diminution rapide de la sensibilité pH dans le temps.



b)

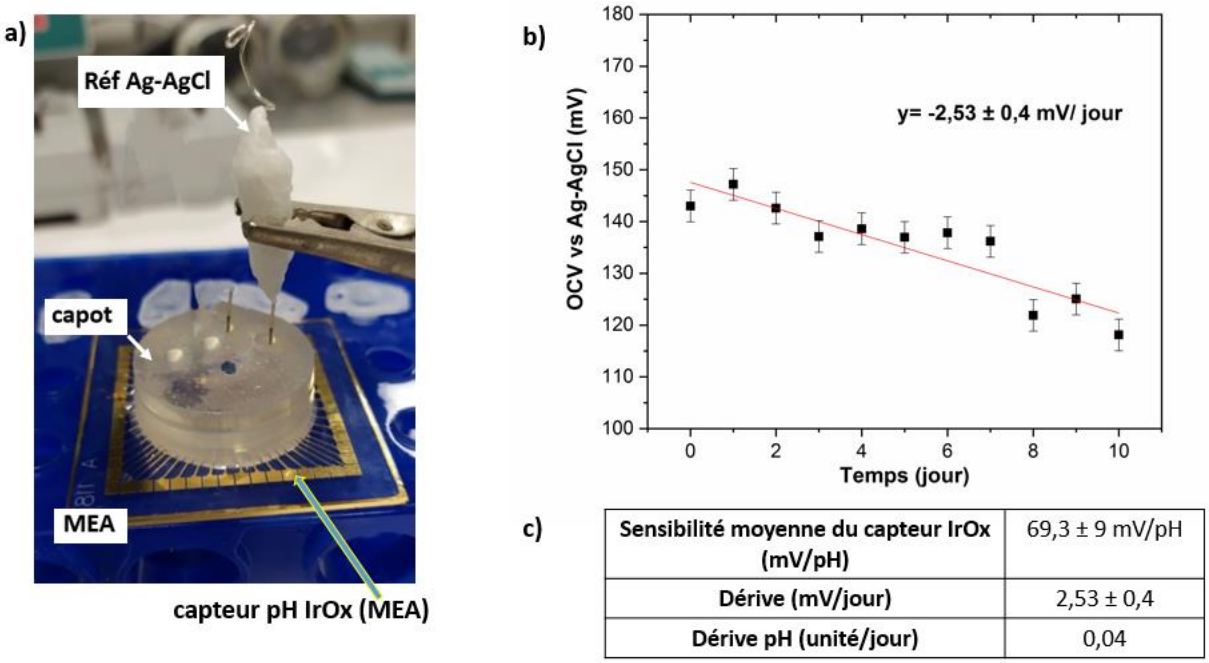
	Jour 0	Jour 5	Jour 10	Moyenne
Sensibilité pH (mV/pH)	79 ± 3	68 ± 3,5	61 ± 3	69,3 ± 9
Erreur pH (unité)	0,04	0,05	0,05	0,1

Figure IV. 31: (a) Mesure de la sensibilité du capteur pH IrOx aux jours 0, 5 et 10. (b) Mesures statistiques des sensibilités pH aux jours 0, 5 et 10 (relevées pour10 échantillons).

Pour compléter la calibration des capteurs pH, nous avons étudié par OCV, la dérive moyenne des capteurs IrOx sur une durée de 10 jours. Le suivi est effectué dans un milieu tamponné de PBS où le pH est fixé à 7,4. Le système de mesure comprend deux électrodes, une référence en Ag/AgCl et l'électrode d'IrOx comme électrode de travail, ces électrodes sont connectées en circuit ouvert à un potentiostat. Les mesures OCV sont relevées chaque jour pendant 10 jours. Afin d'éviter l'évaporation du milieu, la chambre MEA est fermée à l'aide d'un capot imprimé en 3D. Celui-ci va également servir pour fixer l'électrode de référence Ag/AgCl (Figure IV. 32. a).

Nous avons noté que les potentiels libres des dix échantillons qui sont d'ailleurs mesurés dans les mêmes conditions ne sont pas les mêmes malgré des conditions de dépôt identiques réalisés le même jour et hydratés dans les mêmes conditions. Les phénomènes à l'origine des variabilités des potentiels libres des capteurs IrOx sont encore mal identifiés dans la littérature. Il pourrait s'agir d'une mauvaise adhérence entre l'IrOx et le substrat MEA (or) qui conduirait à une variabilité du potentiel libre de l'IrOx. Sur la Figure IV. 32. b sont représentés les potentiels libres d'un capteur IrOx en fonction du temps. Les écarts types moyennés sur la totalité des dix échantillons sont calculés et représentés sur le graphe. On observe sur le graphe Figure IV. 32. b une dérive du potentiel du capteur IrOx mais également pour l'ensemble des autres échantillons, soit la dérive moyenne sur les 10 jours de mesure est de 2,53 ± 0,4 mV / jour. Nous constatons que cette dérive est quasi linéaire dans le temps pour l'ensemble des échantillons avec un coefficient de régression linéaire R^2 de 0,82. En prenant en considération:

la valeur moyenne de la sensibilité du capteur pH (69,3 ± 9 mV/pH) et la dérive moyenne du capteur pH sur les 10 jours de mesure (2,53 ± 0,4 mV/jour), nous obtenons une dérive de 0,04 unité de pH/jour (Figure IV. 32. c). Bien que le plan d'expérience ait été dessiné avec les calibrations du capteur pH IrOx pour sa mise en route dans le milieu cellulaire, il nous a été malheureusement impossible d'effectuer des tests pH *in vitro* par un manque de temps.



Sensibilité moyenne du capteur IrOx (mV/pH)	69,3 ± 9 mV/pH
Dérive (mV/jour)	2,53 ± 0,4
Dérive pH (unité/jour)	0,04

Figure IV. 32: (a) Image du dispositif MEA avec le capot qui referme la chambre de culture. Dans la chambre MEA se trouvent : le milieu de mesure, l'électrode IrOx et l'électrode Réf : Ag/AgCl. (b) Mesure par OCV du potentiel libre de l'IrOx dans une solution tamponnée PBS (pH=7,4) en fonction du temps avec un système à deux électrodes : la Réf et l'électrode IrOx (WE). (c) Tableau récapitulatif des dérives moyennes des capteurs IrOx sur les 10 jours de mesure.

4.5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce chapitre, nous avons étudié la sensibilité et la stabilité du capteur pH Oxyde d'Iridium (IrOx) en fonction des différentes techniques d'électrodépositions.

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés aux choix du mode de dépôt de l'IrOx, à savoir des dépôts par CP, CV et par CA Pulsé. Nous avons observé que la sensibilité pH est peu dépendante de la méthode de dépôt. En revanche, suivant la méthode de dépôt employée, des craquelures peuvent apparaître conduisant à une instabilité du capteur pH. Nous avons montré que le dépôt par CV à faible vitesse de balayage (v=25mV/s) générait moins de craquelures. Nous avons donc privilégié cette approche pour fabriquer nos capteurs d'IrOx.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'influence du Nafion sur la stabilité de l'IrOx. Nous avons vu que la sensibilité n'était pas impactée en présence du Nafion. Cependant la stabilité du capteur IrOx sur du long terme (10 jours) n'était pas notablement améliorée.

Dans une dernière étude, nous avons étudié l'influence de l'épaisseur déposée sur les électrodes. Nous avons pu montrer que pour des épaisseurs élevées de 1µm et 400nm, il apparaissait des dérives importantes du capteur, nous avons conclu que cette dérive était très probablement liée à la présence de craquelures qui dégradent la stabilité du capteur. Néanmoins, une dérive reste également présente pour les faibles épaisseurs sans qu'il n'y est une présence de craquelures. Nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'un vieillissement de l'IrOx qui conduisait à un changement des propriétés intrinsèques du matériau.

Pour terminer, nous avons repris les meilleures conditions de dépôt d'IrOx que nous avons intégré sur une MEA commerciale. Nous avons procédé à une calibration avec un grand panel d'échantillons pour calibrer la dérive du capteur pH IrOx. La calibration a pris en compte la variation de la sensibilité pH et la dérive du potentiel libre sur une dizaine de jours. Bien que la sensibilité du capteur diminue dans le temps et que la dérive soit toujours présente après les optimisations effectuées en première partie de ce chapitre, nous prendrons en compte ces paramètres de calibrations avant les mesures pH dans la culture neuronale 3D. Nous envisageons d'intégrer de manière non invasive un deuxième capteur pH optique afin de consolider les mesures observées avec le capteur pH IrOx. Le dispositif pH optique consiste à mesurer la fluorescence du milieu de culture grâce à un film optique (PreSens)[125] positionné dans la chambre transparente de la MEA. A l'aide d'une fibre optique, une lumière est envoyée vers le film pour mesurer la teneur en analytes H_3O^+ présents en solution. Le capteur optique fonctionne sur un intervalle pH de 5,5 – 8,5 avec une résolution de 0,01 pH (Figure IV. 33).

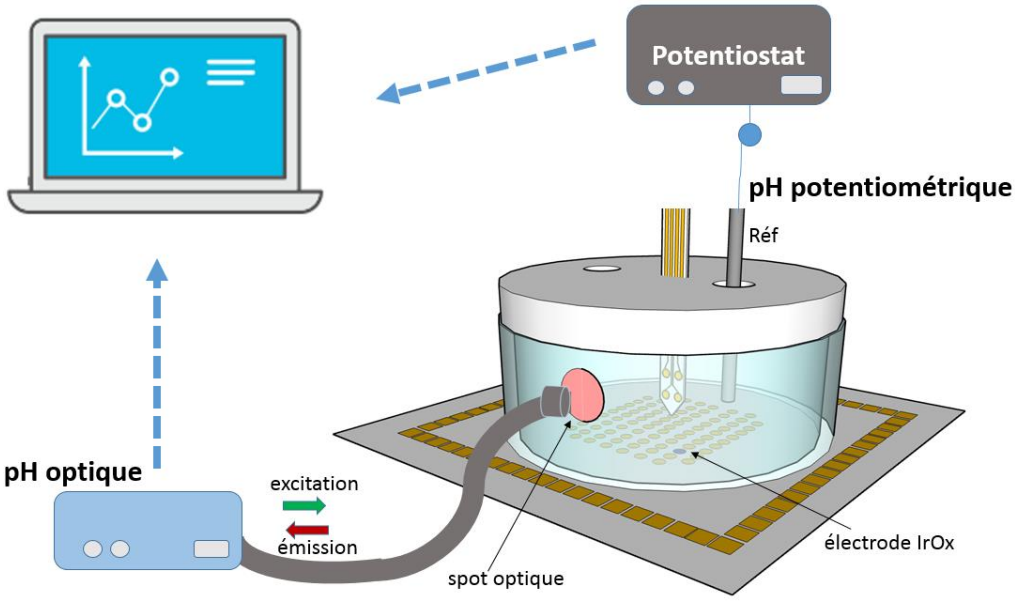


Figure IV. 33: Montage du capteur pH optique sur le micro-dispositif. Mesure du pH optique en parallèle avec la mesure du pH potentiométrique (électrodes IrOx et Réf).

Bien que l'oxyde d'Iridium soit utilisé comme capteur pH du fait de sa grande sensibilité, sa stabilité doit être fortement améliorée pour des études long terme. L'IrOx est intéressant comme capteur pH pour des suivis court terme (1-2heures). Il est cependant indispensable de revoir les modalités de dépôt du capteur IrOx. En effet, la structure amorphe induite par le dépôt

électrochimique conduit le matériau à une instabilité sur le long terme. Les causes de cette instabilité sont encore partiellement identifiées dans la littérature, la grande majorité des publications ne traite que de mesures pH effectuées sur des suivis de courte durée de quelques heures à quelques jours au maximum. D'autres pistes doivent être explorées pour améliorer les performances des capteurs pH IrOx.

Comme nous l'avons vu, la méthode de préparation de l'oxyde d'Iridium influe fortement sur sa stabilité et son activité électro-catalytique[68,126]. Deux types d'oxydes avec des morphologies très différentes subsistent chez l'oxyde d'Iridium: cristalline et amorphe. La morphologie amorphe est celle que l'on a étudié tout au long de ce chapitre, elle est obtenue lorsque l'IrOx est déposé électrochimiquement. C'est une morphologie amorphe parce qu'elle possède à sa surface des hydroxydes, créant ainsi des défauts qui la rendent plus électro-active et moins stable[66]. D'autres IrOx de morphologie cristalline subsistent plus stables de par leur réarrangement atomique. La principale méthode de fabrication des IrOx cristallins, consiste à oxyder thermiquement l'Iridium métal, méthode décrite dans la littérature sous la dénomination de TIROF (Thermally-formed Iridium Oxide Film). C'est en effet, l'oxydation thermique à des températures élevées de 400 à 600°C de l'Iridium qui va former un IrOx cristallin. Geiger[70] a montré qu'en oxydant l'Iridium déposé par voie physique EBPVD (Electron Beam Physical Vapor Deposition), une cristallisation de type rutile (IrO2) apparaissait à des températures avoisinant les 400-500°C. Par ailleurs, il existe une autre méthode pour former un IrOx cristallin, qui consiste à recuire thermiquement un IrOx amorphe ou HIROF (Hydrous Iridium Oxide Film) à des températures élevées. Durant ce processus de recuit, l'IrOx amorphe va d'abord subir une déshydratation des hydroxydes (100-300°C), puis à partir de 400°C la cristallisation de l'IrOx amorphe va s'amorcer (Figure IV. 34).

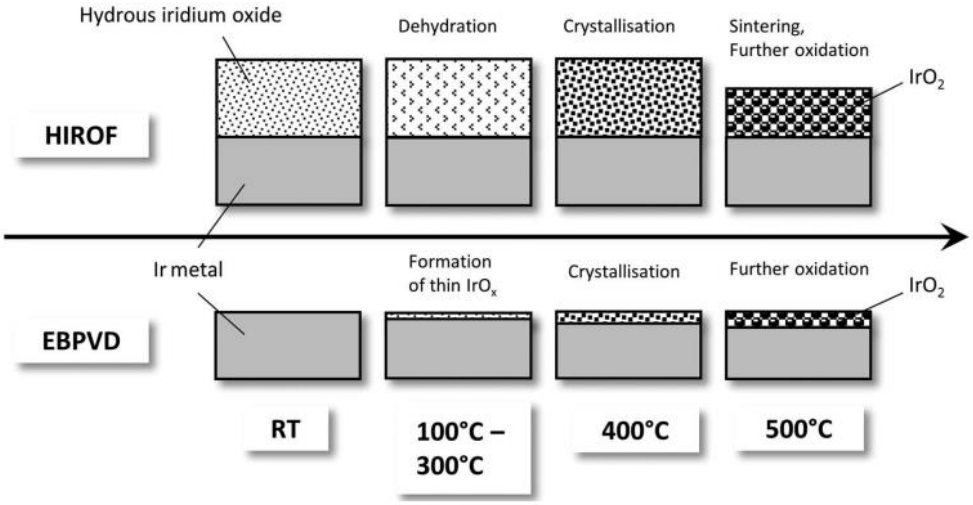


Figure IV. 34: Principaux procédés thermiques intervenant sur l'Iridium déposé électrochimiquement (HIROF) et sur l'Iridium déposé par la voie physique (EBPVD).

Geiger a démontré notamment que la stabilité et l'activité de l'IrOx dépendaient étroitement de la phase IrOx formée : amorphe ou cristalline. Pour cela, il a analysé l'activité et la stabilité de l'IrOx amorphe (HIROF) et de l'IrOx cristallin (EBPVD). Dans un premier temps, Geiger a analysé l'activité des IrOx par CV, il a sondé l'amplitude du courant pour chacun des IrOx : HIROF et EBPVD en fonction de la température. Il en a déduit que les courants étaient plus

élevés pour l'HIROF et EBPVD ayant subi un faible traitement thermique (25°C) (Figure IV. 35. a et b). En revanche, lorsque le traitement thermique dépasse les 400°C, l'HIROF et l'EBPVD présentent des amplitudes de courant très faibles. De cette première analyse il constate que l'activité de l'IrOx amorphe est meilleure que celui de l'IrOx cristallin. Quant à la stabilité, il évalue par intégration de la charge des voltammogrammes une importante dissolution de l'Iridium pour l'IrOx amorphe (Figure IV. 35. c). L'IrOx cristallin présente une plus faible dissolution d'Iridium, ce qui l'amène à conclure que le l'IrOx cristallin conduit à une meilleure stabilité que l'IrOx amorphe. En d'autres termes, il serait plus intéressant et plus pertinent d'utiliser des capteurs pH stables pour des suivis à long terme en s'intéressant à produire des IrOx de type cristallin.

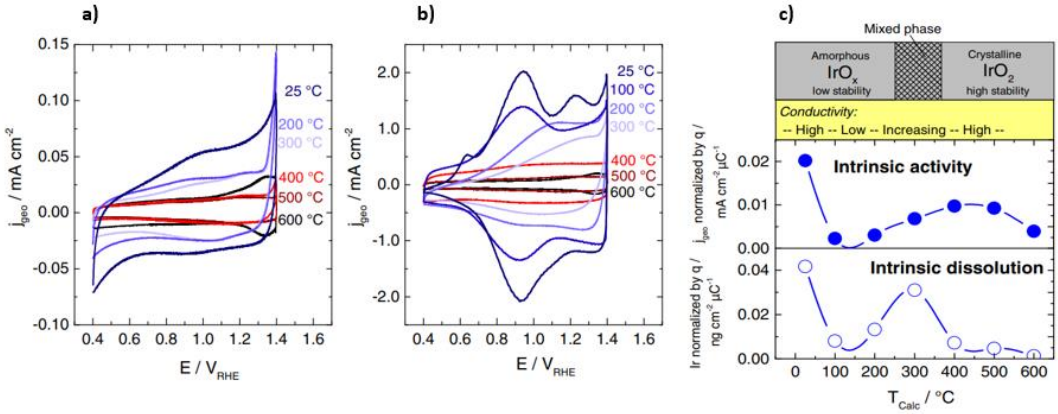


Figure IV. 35: Influence du traitement thermique sur les CV (50 mV/s) pour EBPVD (a) et HIROF (b). (c) Analyse de la stabilité et de l'activité de l'HIROF en fonction de la température de recuit. Mesure de l'activité de l'HIROF avec l'évaluation de la densité de courant à 1,5 V RHE et mesure de la stabilité de l'HIROF avec l'évaluation de la dissolution de l'Iridium en intégrant la charge des voltammogrammes.

Pour réduire l'instabilité des IrOx, il serait donc préférable d'utiliser des IrOx de type cristallin. Ceux-ci peuvent être obtenus par le biais d'une oxydation thermique de l'Iridium (TIROF) ou bien par un recuit de l'IrOx amorphe. Cette dernière méthode semblerait fastidieuse puisqu'elle nécessiterait d'abord de faire un dépôt électrochimique de l'IrOx puis d'effectuer un recuit thermique à des températures élevées allant jusqu'à 600°C ce qui serait incompatible avec le procédé de fabrication de notre micro-dispositif MEA. On peut envisager, pour obtenir un oxyde d'iridium plus stable dans le temps de remplacer le dépôt d'or initialement prévu pour la MEA avec un dépôt d'Iridium et de l'oxyder thermiquement par la suite.

4.6 REFERENCES

1. Lancaster, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373–379 (2013).
2. Bigorgne, A. E. *et al.* TTC7A mutations disrupt intestinal epithelial apicobasal polarity. *J. Clin. Invest.* **124**, 328–337 (2014).
3. Finkbeiner, S. R. *et al.* Stem cell-derived human intestinal organoids as an infection model for rotaviruses. *mBio* **3**, e00159-00112 (2012).
4. Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R. & Bodmer, W. F. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 3722–3727 (2010).
5. van de Wetering, M. *et al.* Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* **161**, 933–945 (2015).
6. Meng, Q. Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **6**, 733–746 (2010).
7. Bi, F.-C. *et al.* Optimization of cerebral organoids: a more qualified model for Alzheimer's disease research. *Transl. Neurodegener.* **10**, 27 (2021).
8. Chen, C., Rengarajan, V., Kjar, A. & Huang, Y. A matrigel-free method to generate matured human cerebral organoids using 3D-Printed microwell arrays. *Bioact. Mater.* **6**, 1130–1139 (2021).
9. Pautot, S., Wyart, C. & Isacoff, E. Y. Colloid-guided assembly of oriented 3D neuronal networks. *Nat. Methods* **5**, 735–740 (2008).
10. Shin, W. *et al.* Spatiotemporal Gradient and Instability of Wnt Induce Heterogeneous Growth and Differentiation of Human Intestinal Organoids. *iScience* **23**, 101372 (2020).
11. Coluccio, M. L. *et al.* Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectron. Eng.* **208**, 14–28 (2019).
12. Vives, J. & Batlle-Morera, L. The challenge of developing human 3D organoids into medicines. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 72 (2020).
13. Mousavi Shaegh, S. A. *et al.* A microfluidic optical platform for real-time monitoring of pH and oxygen in microfluidic bioreactors and organ-on-chip devices. *Biomicrofluidics* **10**, 044111 (2016).
14. Zhang, Y. S. *et al.* Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E2293–E2302 (2017).
15. Eklund, S. E. *et al.* Multianalyte microphysiometry as a tool in metabolomics and systems biology. *J. Electroanal. Chem.* **587**, 333–339 (2006).
16. Vollmer, A. P., Probstein, R. F., Gilbert, R. & Thorsen, T. Development of an integrated microfluidic platform for dynamic oxygen sensing and delivery in a flowing medium. *Lab. Chip* **5**, 1059–1066 (2005).
17. Weltin, A. *et al.* Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem. *Lab Chip* **14**, 138–146 (2014).
18. Ungerböck, B., Charwat, V., Ertl, P. & Mayr, T. Microfluidic oxygen imaging using integrated optical sensor layers and a color camera. *Lab. Chip* **13**, 1593–1601 (2013).
19. Zhan, W., Seong, G. H. & Crooks, R. M. Hydrogel-Based Microreactors as a Functional Component of Microfluidic Systems. *Anal. Chem.* **74**, 4647–4652 (2002).
20. Cheng, Y. *et al.* Mechanism and Optimization of pH Sensing Using SnO2 Nanobelt Field Effect Transistors. *Nano Lett.* **8**, 4179–4184 (2008).
21. Wu, C.-C., Lin, W.-C. & Fu, S.-Y. The open container-used microfluidic chip using IrOx ultramicroelectrodes for the in situ measurement of extracellular acidification. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4191–4197 (2011).
22. Marzouk, S. A. M. *et al.* Electrodeposited Iridium Oxide pH Electrode for Measurement of Extracellular Myocardial Acidosis during Acute Ischemia. *Anal. Chem.* **70**, 5054–5061 (1998).

23. Kimmel, D. W., Dole, W. P. & Cliffel, D. E. Application of multianalyte microphysiometry to characterize macrophage metabolic responses to oxidized LDL and effects of an apoA-1 mimetic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 181–185 (2013).
24. Lima, E. A. *et al.* Multichamber multipotentiostat system for cellular microphysiometry. *Sens. Actuators B Chem.* **204**, 536–543 (2014).
25. Mestres, P. & Morguet, A. The Bionas technology for anticancer drug screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **4**, 785–797 (2009).
26. Olthuis, W., Robben, M. A. M., Bergveld, P., Bos, M. & van der Linden, W. E. pH sensor properties of electrochemically grown iridium oxide. *Sens. Actuators B Chem.* **2**, 247–256 (1990).
27. Hafner, F. Cytosensor Microphysiometer: technology and recent applications. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 149–158 (2000).
28. Hiruta, Y., Ando, Y., Citterio, D. & Suzuki, K. A Fast-Response pH Optode Based on a Fluoroionophore Immobilized to a Mesoporous Silica Thin Film. *Anal. Sci.* **26**, 297–301 (2010).
29. Wencel, D., MacCraith, B. D. & McDonagh, C. High performance optical ratiometric sol–gel-based pH sensor. *Sens. Actuators B Chem.* **139**, 208–213 (2009).
30. Wu, C.-C., Luk, H.-N., Lin, Y.-T. T. & Yuan, C.-Y. A Clark-type oxygen chip for in situ estimation of the respiratory activity of adhering cells. *Talanta* **81**, 228–234 (2010).
31. Sud, D. *et al.* Optical imaging in microfluidic bioreactors enables oxygen monitoring for continuous cell culture. *J. Biomed. Opt.* **11**, 050504 (2006).
32. Weltin, A. *et al.* Accessing 3D microtissue metabolism: Lactate and oxygen monitoring in hepatocyte spheroids. *Biosens. Bioelectron.* **87**, 941–948 (2017).
33. Zheng, X. T., Yang, H. B. & Li, C. M. Optical detection of single cell lactate release for cancer metabolic analysis. *Anal. Chem.* **82**, 5082–5087 (2010).
34. Ben-Amor, S. *et al.* Enhanced Detection of Hydrogen Peroxide with Platinized Microelectrode Arrays for Analyses of Mitochondria Activities. *Electrochimica Acta* **126**, 171–178 (2014).
35. Funfak, A., Cao, J., Wolfbeis, O. S., Martin, K. & Köhler, J. M. Monitoring cell cultivation in microfluidic segments by optical pH sensing with a micro flow-through fluorometer using dye-doped polymer particles. *Microchim. Acta* **164**, 279–286 (2009).
36. Demchenko, A. P. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods Appl. Fluoresc.* **8**, 022001 (2020).
37. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. & Mahajan, R. T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65–74 (2009).
38. Fragoso, A. *et al.* Integrated microfluidic platform for the electrochemical detection of breast cancer markers in patient serum samples. *Lab. Chip* **11**, 625–631 (2011).
39. Ges, I. *et al.* Thin-film IrO pH microelectrode for microfluidic-based microsystems. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 248–256 (2005).
40. Nasr, B. *et al.* Self-Organized Nanostructure Modified Microelectrode for Sensitive Electrochemical Glutamate Detection in Stem Cells-Derived Brain Organoids. *Biosensors* **8**, 14 (2018).
41. Florou, A., Prodromidis, M., Karayannis, M. & Tzouwara-karayanni, S. Flow electrochemical determination of ascorbic acid in real samples using a glassy carbon electrode modified with a cellulose acetate film bearing 2,6-dichlorophenolindophenol. (2000) doi:10.1016/S0003-2670(00)00709-1.
42. Zhou, J., Zhang, L. & Tian, Y. Micro Electrochemical pH Sensor Applicable for Real-Time Ratiometric Monitoring of pH Values in Rat Brains. *Anal. Chem.* **88**, 2113–2118 (2016).
43. Kurzweil, P. Metal Oxides and Ion-Exchanging Surfaces as pH Sensors in Liquids: State-of-the-Art and Outlook. *Sensors* **9**, 4955–4985 (2009).
44. Lehoucq, G. Transistors à nanofils de silicium top-down. Application à la détection biologique. (2010).
45. Fog, A. & Buck, R. P. Electronic semiconducting oxides as pH sensors. *Sens. Actuators* **5**, 137–146 (1984).

46. Głab, S., Hulanicki, A., Edwall, G. & Ingman, F. Metal-Metal Oxide and Metal Oxide Electrodes as pH Sensors. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **21**, 29–47 (1989).
47. Ges, I. A., Dzhura, I. A. & Baudenbacher, F. J. On-chip acidification rate measurements from single cardiac cells confined in sub-nanoliter volumes. *Biomed. Microdevices* **10**, 347–354 (2008).
48. Bitziou, E., O'Hare, D. & Patel, B. A. Spatial changes in acid secretion from isolated stomach tissue using a pH-histamine sensing microarray. *The Analyst* **135**, 482 (2010).
49. Yamanaka, K. Anodically Electrodeposited Iridium Oxide Films (AEIROF) from Alkaline Solutions for Electrochromic Display Devices. *Jpn. J. Appl. Phys.* **28**, 632 (1989).
50. Kinoshita, K. Electrochemical Measurements on Pt, Ir, and Ti Oxides as pH Probes. *J. Electrochem. Soc.* **131**, 1089 (1984).
51. Uhl, A. & Kestranek, W. Die elektrometrische Titration von Säuren und Basen mit der Antimon-Indikatorelektrode. *Monatshefte Für Chem. Verwandte Teile Anderer Wiss.* **44**, 29–34 (1923).
52. Głab, S., Hulanicki, A., Edwall, G. & Ingman, F. Metal-Metal Oxide and Metal Oxide Electrodes as pH Sensors. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **21**, 29–47 (1989).
53. Ball, T. R. The Antimony Electrode in pH Measurements. *Trans. Electrochem. Soc.* **72**, 139 (1937).
54. Caflisch, C. R., Pucacco, L. R. & Carter, N. W. Manufacture and utilization of antimony pH electrodes. *Kidney Int.* **14**, 126–141 (1978).
55. Yamamoto, K. *et al.* Solid-state pH ultramicrosensor based on a tungstic oxide film fabricated on a tungsten nanoelectrode and its application to the study of endothelial cells. *Anal. Chim. Acta* **480**, 109–117 (2003).
56. Lonsdale, W., Wajrak, M. & Alameh, K. RuO2 pH Sensor with Super-Glue-Inspired Reference Electrode. *Sensors* **17**, (2017).
57. Marzouk, S. A. M. *et al.* Electrodeposited Iridium Oxide pH Electrode for Measurement of Extracellular Myocardial Acidosis during Acute Ischemia. *Anal. Chem.* **70**, 5054–5061 (1998).
58. Park, S. *et al.* pH-sensitive solid-state electrode based on electrodeposited nanoporous platinum. *Anal. Chem.* **77**, 7695–7701 (2005).
59. Kasian, O. *et al.* Degradation of iridium oxides via oxygen evolution from the lattice: correlating atomic scale structure with reaction mechanisms. *Energy Environ. Sci.* **12**, 3548–3555 (2019).
60. Willinger, E., Massué, C., Schlögl, R. & Willinger, M. G. Identifying Key Structural Features of IrO_x Water Splitting Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 12093–12101 (2017).
61. Wang, W. *et al.* Hydrous Ruthenium Oxide Nanoparticles Anchored to Graphene and Carbon Nanotube Hybrid Foam for Supercapacitors. *Sci. Rep.* **4**, 4452 (2015).
62. Chakrabarti, M. H., Roberts, E. P. L., Bae, C. & Saleem, M. Ruthenium based redox flow battery for solar energy storage. *Energy Convers. Manag.* **52**, 2501–2508 (2011).
63. Li, T., Kim, M., Liang, Z., Asthagiri, A. & Weaver, J. F. Hydrogen oxidation on oxygen-rich IrO2(110). *Catal. Struct. React.* **4**, 1–13 (2018).
64. Potrepka, D. M. *et al.* Characterization of IrOx sputtering for IrO2 and IrO2/Pt bottom-electrode piezoelectric micro-electro-mechanical systems applications. *Thin Solid Films* **638**, 127–137 (2017).
65. Conway, B. E. & Mozota, J. Surface and bulk processes at oxidized iridium electrodes—II. Conductivity-switched behaviour of thick oxide films. *Electrochimica Acta* **28**, 9–16 (1983).
66. Grimaud, A. An eye on surface changes. *Nat. Catal.* **1**, 242–243 (2018).
67. Grimaud, A. *et al.* Activation of surface oxygen sites on an iridium-based model catalyst for the oxygen evolution reaction. *Nat. Energy* **2**, 1–10 (2016).
68. Jang, H. & Lee, J. Iridium oxide fabrication and application: A review. *J. Energy Chem.* **46**, 152–172 (2020).
69. Baur, W. H. Über die Verfeinerung der Kristallstrukturbestimmung einiger Vertreter des Rutiltyps: TiO2, SnO2, GeO2 und MgF2. *Acta Crystallogr.* **9**, 515–520 (1956).
70. Geiger, S. *et al.* Activity and Stability of Electrochemically and Thermally Treated Iridium for the Oxygen Evolution Reaction. *J. Electrochem. Soc.* **163**, F3132–F3138 (2016).

71. Thanawala, S. S., Baird, R. J., Georgiev, D. G. & Auner, G. W. Amorphous and crystalline IrO2 thin films as potential stimulation electrode coatings. *Appl. Surf. Sci.* **254**, 5164–5169 (2008).
72. Slavcheva, E., Vitushinsky, R., Mokwa, W. & Schnakenberg, U. Sputtered Iridium Oxide Films as Charge Injection Material for Functional Electrostimulation. *J. Electrochem. Soc.* **151**, E226 (2004).
73. Bezbaruah, A. N. & Zhang, T. C. Fabrication of Anodically Electrodeposited Iridium Oxide Film pH Microelectrodes for Microenvironmental Studies. *Anal. Chem.* **74**, 5726–5733 (2002).
74. Cogan, S. F. Neural Stimulation and Recording Electrodes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10**, 275–309 (2008).
75. Wang, M., Yao, S. & Madou, M. A long-term stable iridium oxide pH electrode. *Sens. Actuators B Chem.* **81**, 313–315 (2002).
76. Yao, S., Wang, M. & Madou, M. A pH Electrode Based on Melt-Oxidized Iridium Oxide. *J. Electrochem. Soc.* **148**, H29 (2001).
77. Burke, L. D. & Scannell, R. A. An investigation of hydrous oxide growth on iridium in base. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **175**, 119–141 (1984).
78. Cherevko, S., Geiger, S., Kasian, O., Mingers, A. & Mayrhofer, K. J. J. Oxygen evolution activity and stability of iridium in acidic media. Part 1. – Metallic iridium. *J. Electroanal. Chem.* **773**, 69–78 (2016).
79. Cherevko, S., Geiger, S., Kasian, O., Mingers, A. & Mayrhofer, K. J. J. Oxygen evolution activity and stability of iridium in acidic media. Part 2. – Electrochemically grown hydrous iridium oxide. *J. Electroanal. Chem.* **774**, 102–110 (2016).
80. Juodkazytė, J., Šebeka, B., Stalnionis, G. & Juodkazis, K. EQCM Study of Iridium Anodic Oxidation in H2SO4 and KOH Solutions. *Electroanalysis* **17**, 1734–1739 (2005).
81. Boodts, J. C. F. & Trasatti, S. Hydrogen evolution on iridium oxide cathodes. *J. Appl. Electrochem.* **19**, 255–262 (1989).
82. Fog, A. & Buck, R. P. Electronic semiconducting oxides as pH sensors. *Sens. Actuators* **5**, 137–146 (1984).
83. Chandra, D. *et al.* Highly Efficient Electrocatalytic Water Oxidation by a Transparent Ordered Mesoporous Film of Intermediate IrOx(OH)y. *ACS Appl. Energy Mater.* **4**, 4355–4364 (2021).
84. Burke, L. D., Mulcahy, J. K. & Whelan, D. P. Preparation of an oxidized iridium electrode and the variation of its potential with pH. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **163**, 117–128 (1984).
85. Burke, L. D. & Whelan, D. P. A voltammetric investigation of the charge storage reactions of hydrous iridium oxide layers. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **162**, 121–141 (1984).
86. L. Hitchman, M. & Ramanathan, S. Evaluation of iridium oxide electrodes formed by potential cycling as pH probes. *Analyst* **113**, 35–39 (1988).
87. N. Buckley, D. & D. Burke, L. The oxygen electrode. Part 5.—Enhancement of charge capacity of an iridium surface in the anodic region. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **71**, 1447–1459 (1975).
88. Rand, D. & Woods, R. Cyclic Voltammetric Studies on Iridium Electrodes in Sulfuric Acid Solutions. Nature of Oxygen Layer and Metal Dissolution. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **55**, 375–381 (1974).
89. Burke, L. D. & O'Sullivan, E. J. M. Oxygen gas evolution on hydrous oxides — An example of three-dimensional electrocatalysis? *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **117**, 155–160 (1981).
90. Yagi, M., Tomita, E., Sakita, S., Kuwabara, T. & Nagai, K. Self-assembly of active IrO2 colloid catalyst on an ITO electrode for efficient electrochemical water oxidation. *J. Phys. Chem. B* **109**, 21489–21491 (2005).
91. Mozota, J. & Conway, B. E. Surface and bulk processes at oxidized iridium electrodes—I. Monolayer stage and transition to reversible multilayer oxide film behaviour. *Electrochimica Acta* **28**, 1–8 (1983).

92. Matthey, J. Electrochromic Iridium Oxides. *Johnson Matthey Technology Review* https://www.technology.matthey.com/article/28/2/56-61/.
93. Negi, S., Bhandari, R., Rieth, L., Van Wagenen, R. & Solzbacher, F. Neural electrode degradation from continuous electrical stimulation: comparison of sputtered and activated iridium oxide. *J. Neurosci. Methods* **186**, 8–17 (2010).
94. Yoshino, T., Baba, N. & Arai, K. Electrochromic IrOx Thin Films Formed in Sulfatoiridate (III, IV) Complex Solution by Periodic Reverse Current Electrolysis (PRIROF). *Jpn. J. Appl. Phys.* **26**, 1547 (1987).
95. Weltin, A. *et al.* Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem. *Lab. Chip* **14**, 138–146 (2013).
96. Meyer, R. D., Cogan, S. F., Nguyen, T. H. & Rauh, R. D. Electrodeposited iridium oxide for neural stimulation and recording electrodes. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **9**, 2–11 (2001).
97. Baur, J. E. & Spaine, T. W. Electrochemical deposition of iridium (IV) oxide from alkaline solutions of iridium(III) oxide. *J. Electroanal. Chem.* **443**, 208–216 (1998).
98. Elsen, H. A., Monson, C. F. & Majda, M. Effects of Electrodeposition Conditions and Protocol on the Properties of Iridium Oxide pH Sensor Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **156**, F1 (2009).
99. Mingels, R. H. G., Kalsi, S., Cheong, Y. & Morgan, H. Iridium and Ruthenium oxide miniature pH sensors: Long-term performance. *Sens. Actuators B Chem.* **297**, 126779 (2019).
100. Agmon, N. The Grotthuss mechanism. *Chem. Phys. Lett.* **244**, 456–462 (1995).
101. Rusi & Majid, S. R. Effects of Electrodeposition Mode and Deposition Cycle on the Electrochemical Performance of MnO2-NiO Composite Electrodes for High-Energy-Density Supercapacitors. *PLoS ONE* **11**, e0154566 (2016).
102. Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Student Solutions Manual to accompany Electrochemical Methods: Fundamentals and Applicaitons, 2e*. (John Wiley & Sons, 2002).
103. Zea, M. *et al.* Enhanced Performance Stability of Iridium Oxide-Based pH Sensors Fabricated on Rough Inkjet-Printed Platinum. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 15160–15169 (2019).
104. Rajalakshmi, N. & Dhathathreyan, K. S. Nanostructured platinum catalyst layer prepared by pulsed electrodeposition for use in PEM fuel cells. *Int. J. Hydrog. Energy* **33**, 5672–5677 (2008).
105. Popov, K. I. & Maksimović, M. D. Theory of the Effect of Electrodeposition at a Periodically Changing Rate on the Morphology of Metal Deposits. in *Modern Aspects of Electrochemistry* (eds. Conway, B. E., Bockris, J. O. & White, R. E.) vol. 19 193–250 (Springer US, 1989).
106. Obradović, M. D., Balanč, B. D., Lačnjevac, U. Č. & Gojković, S. Lj. Electrochemically deposited iridium-oxide: Estimation of intrinsic activity and stability in oxygen evolution in acid solution. *J. Electroanal. Chem.* **881**, 114944 (2021).
107. Ges, I. *et al.* Thin-film IrO pH microelectrode for microfluidic-based microsystems. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 248–256 (2005).
108. Carroll, S. & Baldwin, R. P. Self-calibrating microfabricated iridium oxide pH electrode array for remote monitoring. *Anal. Chem.* **82**, 878–885 (2010).
109. VanHoudt, P., Lewandowski, Z. & Little, B. Iridium oxide pH microelectrode. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 601–608 (1992).
110. Nakagawa, T., Beasley, C. A. & Murray, R. W. Efficient Electro-Oxidation of Water near Its Reversible Potential by a Mesoporous IrOx Nanoparticle Film. *J. Phys. Chem. C* **113**, 12958–12961 (2009).
111. Touni, A., Papaderakis, A., Karfaridis, D., Vourlias, G. & Sotiropoulos, S. Oxygen Evolution Reaction at IrO2/Ir(Ni) Film Electrodes Prepared by Galvanic Replacement and Anodization: Effect of Precursor Ni Film Thickness. *Molecules* **24**, 2095 (2019).
112. Halder, A. *et al.* Water Oxidation Catalysis via Size-Selected Iridium Clusters. *J. Phys. Chem. C* **122**, 9965–9972 (2018).
113. Huang, W.-D., Cao, H., Deb, S., Chiao, M. & Chiao, J. C. A flexible pH sensor based on the iridium oxide sensing film. *Sens. Actuators Phys.* **169**, 1–11 (2011).
114. Glarum, S. H. & Marshall, J. H. The A-C Response of Iridium Oxide Films. *J. Electrochem. Soc.* **127**, 1467 (1980).

115. Kinoshita, E., Ingman, F., Edwall, G., Thulin, S. & Głąb, S. Polycrystalline and monocrystalline antimony, iridium and palladium as electrode material for pH-sensing electrodes. *Talanta* **33**, 125–134 (1986).
116. Katsube, T., Lauks, I. & Zemel, J. N. pH-sensitive sputtered iridium oxide films. *Sens. Actuators* **2**, 399–410 (1981).
117. Kinlen, P. J., Heider, J. E. & Hubbard, D. E. A solid-state pH sensor based on a Nafion-coated iridium oxide indicator electrode and a polymer-based silver chloride reference electrode. *Sens. Actuators B Chem.* **22**, 13–25 (1994).
118. Koncki, R. & Mascini, M. Screen-printed ruthenium dioxide electrodes for pH measurements. *Anal. Chim. Acta* **351**, 143–149 (1997).
119. Xu, K., Zhang, X., Hou, K., Geng, M. & Zhao, L. The Effects of Antimony Thin Film Thickness on Antimony pH Electrode Coated with Nafion Membrane. *J. Electrochem. Soc.* **163**, B417 (2016).
120. Mauritz, K. A. & Moore, R. B. State of Understanding of Nafion. *Chem. Rev.* **104**, 4535–4586 (2004).
121. Moradi, F. & Dehghanian, C. Addition of IrO2 to RuO2+TiO2 coated anodes and its effect on electrochemical performance of anodes in acid media. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **24**, 134–141 (2014).
122. Kakooei, S., Ismail, M. C. & Wahjoedi, B. A. Electrochemical Study of Iridium Oxide Coating on Stainless Steel Substrate. *Int J Electrochem Sci* **8**, 12 (2013).
123. Chen, R. *et al.* Anodic Electrocatalytic Coatings for Electrolytic Chlorine Production: A Review. *Z. Für Phys. Chem.* **227**, 651–666 (2013).
124. Rivera, J. F., Pignot-Paintrand, I., Pereira, E., Rivas, B. L. & Moutet, J.-C. Electrosynthesized iridium oxide-polymer nanocomposite thin films for electrocatalytic oxidation of arsenic(III). *Electrochimica Acta* **110**, 465–473 (2013).
125. Optical Sensor Technology. https://www.presens.de/.
126. da Silva, G. C., Perini, N. & Ticianelli, E. A. Effect of temperature on the activities and stabilities of hydrothermally prepared IrOx nanocatalyst layers for the oxygen evolution reaction. *Appl. Catal. B Environ.* **218**, 287–297 (2017).

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse avaient pour but de concevoir et de fabriquer un micro-dispositif électrophysiologique 3D pour le suivi de l'activité neuronale d'un organoïde cérébral *in vitro*. Cette nouvelle stratégie technologique s'est présentée sous la forme d'un couplage de deux micro-dispositifs : une matrice planaire de microélectrodes afin de recueillir l'activité électrique sur un plan et d'un implant capable d'échantillonner spatialement et en profondeur la culture 3D neuronale. En parallèle, des travaux de recherche ont été effectués pour intégrer un capteur pH au sein du micro-dispositif.

A partir d'un état de l'art aussi complet que possible, présenté au début de ce manuscrit dans le **Chapitre 1**, nous avons exploré les différentes méthodes de développement des systèmes organoïdes auto-organisés en trois dimensions qui récapitulent la structure et la fonctionnalité cellulaire des organes *in vivo*. Nous avons montré que les nouveaux modèles d'organes conçus *in vitro* pouvaient apporter des réponses sur le développement des organes *in vivo*, **comme les organoïdes cérébraux qui sont capables de modéliser à long terme le développement d'une une ou plusieurs régions du cerveau dans sa version normale ou pathologique** comme par exemple l'autisme, Alzheimer, Parkinson ou encore l'épilepsie. Avec le développement des organoïdes, durant cette dernière décennie, des technologies comme la microfluidique ou l'impression 3D ont permis de garantir aux cultures d'organoïdes des conditions de développement optimales, presque semblable à celui d'un environnement *in vivo*. Il existe des outils capables de suivre leurs développements, dans le cas des organoïdes cérébraux des outils optiques permettent de caractériser la structure du cerveau et des outils comme l'électrophysiologie permettent de caractériser la fonctionnalité des neurones. Il existe notamment des matrices de microélectrodes (MEA) qui se positionnent au contact de la structure biologique afin de recueillir l'activité électrique et en simultané des neurones positionnés dans différents endroits de la culture. Le développement de ces systèmes multi-électrodes est crucial pour la recherche fondamentale en Neurosciences. Cependant, une des limitations importantes des systèmes MEA actuels est l'échantillonnage spatial des points de mesure de la culture 3D. En effet, aucun système ne permet encore un échantillonnage 3D des activités électriques neuronales. Parvenir à développer des systèmes d'enregistrement 3D pour des systèmes de culture cellulaires 3D, constituerait certainement un verrou majeur pour les défis de la neuroscience. Dans ce contexte, le premier objectif de ces travaux de recherche a été de concevoir et de tester **une nouvelle technologie tridimensionnelle, couplant une MEA planaire et un implant capable de mesurer l'activité extracellulaire en 3D d'une culture neuronale 3D.** Une telle technologie n'existe pas encore et permettra d'explorer réellement l'activité électrique du système cellulaire 3D en 3 dimensions.

Il existe par ailleurs d'autres données à considérer dans la culture des organoïdes pour assurer leurs standardisations et leurs viabilités sur le long terme. Il s'agit d'assurer aux organoïdes des conditions de cultures semblables aux conditions *in vivo*, où le suivi des paramètres physiologiques tels que le taux d'oxygène dissous, le pH ou encore les concentrations des nutriments (glucose, lactate, etc.) est essentiel pour assurer un bon développement cellulaire

pendant les premiers stades de développement du tissu nerveux. Nous avons donc étudié le **développement d'un capteur pH potentiométrique au sein du micro-dispositif MEA-implant.**

Dans le **Chapitre 2** a été exposé la méthode de fabrication du micro-dispositif MEA-implant avec la mise en place des connectiques électriques. Pour des problèmes de reproductibilité des cultures neuronales 3D, une MEA commerciale a été utilisée se composant de 60 microélectrodes en or (d=100µm) réparties sur une surface de 0,3 cm^2. La stratégie de couplage de la MEA et de l'implant a consisté à plonger l'implant dans le puit de culture de la MEA avec l'aide d'un capot qui recouvre le puit et fixe en même temps l'implant. **Il a donc été possible de positionner les 4 microélectrodes (d=40µm) de l'implant perpendiculairement au plan de la MEA.**

Dans le **Chapitre 3**, nous avons mesuré l'activité extracellulaire d'une culture 3D d'hippocampe de rat en temps réel et de manière synchronisée avec le micro-dispositif MEA-implant. Avec l'aide du logiciel MCS, il a été possible de détecter l'activité du réseau tous le long de la culture, à savoir pendant 7 semaines. **En terme d'activité spontanée du réseau, les enregistrements sur implant et MEA ont montré qu'il y avait bien un réseau dynamique établi sur les trois plans de la culture : 2D et 3D.** Pour visualiser la connectivité du réseau au sein du micro-dispositif, nous avons stimulé certaines électrodes de la MEA et observé les réponses d'une population de neurones qui s'établit dans les trois plans de la culture. Dans une autre étude, nous avons comparé sur la qualité du signal enregistré avec des électrodes en or et des électrodes traitées avec du PEDOT : PSS sur 35 semaines de mesure d'une culture d'hippocampe de rat. L'étude a été réalisée sur deux MEAs commerciales, l'une a été traitée et l'autre non. Cette étude nous a montré que le bruit de **l'électrode se réduisait avec le traitement et qu'il augmentait le rapport Signal/Bruit.** En analysant la viabilité des électrodes sur les 35 semaines de mesure, **la MEA traitée avec PEDOT : PSS a montré un meilleur vieillissement que celle qui n'a pas été traitée**. Cette performance peut être très utile lorsque les électrodes sont amenées à mesurer des activités extracellulaires sur le très long terme : 1-3 ans.

Dans le **Chapitre 4**, l'étude sur le capteur pH potentiométrique a été basée sur un film d'oxyde d'iridium électro déposé (EIROF ou IrO_x). Ce choix s'est orienté sur la facilitée à intégrer l'IrO_x sur des microélectrodes, sa grande sensibilité au pH et sa biocompatibilité avec les systèmes biologiques. Le capteur IrO_x présente quelle que soit sa méthode de dépôt (voltammétrie cyclique, chronopotentiométrie ou chronoampérometrie à train d'impulsion répétitives) **une sensibilité voisine des 74mV/pH**. Bien qu'il existe dans la littérature de nombreux articles décrivant son utilisation sur des courtes périodes (1h), il existe peu de références qui décrivent son utilisation sur le long terme et donc peu de références sur les problèmes de dérive dont il peut faire face. C'est d'ailleurs cette problématique qui s'est posé à nous, **des recherches ont donc été menées pour améliorer la stabilité du capteur durant les suivis long termes. De possibles facteurs influençant la stabilité du capteur** ont été étudié :

i) La méthode de dépôt de l'IrO_x (voie électrochimique)
ii) La protection du film IrO_x avec une membrane perméable

iii) L'épaisseur IrOx déposée

En fonction de la méthode de dépôt utilisée, celle-ci a révélé que les modes de dépôt rapide : chronopotentiométrie et par chronoampérometrie à train d'impulsions pouvaient générer des craquelures à la surface du film IrOx déposé et donc à son instabilité mécanique. **Le dépôt par voie moins rapide comme la voltammétrie cyclique à faible vitesse de balayage v=25 mV/s a montré un dépôt plus homogène de l'IrO*x* avec moins de craquelures**. Néanmoins, l'IrOx déposé par CV a tout de même montré une dérive du capteur dans le temps.

Des études sur le vieillissement de l'IrOx ont montré que la présence des ions Cl^- en solution produisaient sur **l'**IrOx **des interférences impliquant alors une dérive du capteur**[1,2]. **C'est pourquoi nous avons utilisé une membrane perméable en Nafion qui protège l'oxyde métallique des sels interagissant à sa surface.** Le Nafion a permis de réduire cette dérive à court terme, **en revanche à long terme, cette dérive évolue et n'apporte pas d'amélioration sur la stabilité du capteur.**

Des études menées par Elsen[3] ont suggéré que les épaisseurs des IrOx pouvaient entraîner des instabilités mécaniques du capteur et mener donc à des dérives. **Nous avons donc étudié la dérive du capteur pH en fonction de l'épaisseur IrO*x* déposé.** Cette étude nous a montré que **des dérives importantes étaient présentes pour des épaisseurs supérieures à 400nm. Néanmoins, une faible dérive du capteur pH reste tout de même présente pour les faibles épaisseurs : 100nm et 40 nm.** Leur dérive moyenne est comprise entre 0,81mV/jour et 1,27mV/jour.

Pour terminer, **nous avons repris les meilleures conditions de dépôt d'IrO*x* et l'avons intégré sur une MEA commerciale.** Nous avons procédé à **une calibration avec un grand panel d'échantillons pour calibrer la dérive du capteur pH**. La calibration a pris en compte la variation de la sensibilité pH et de la dérive du potentiel libre sur une dizaine de jours. Ces paramètres seront pris en compte pour évaluer le pH lors sa mise en culture dans la culture neuronale.

<u>Perspectives</u>

A court terme, nous envisageons de travailler d'une part, dans la continuité de l'étude sur l'activité extracellulaire de l'organoïde cérébral avec une plus grande densité d'électrodes sur l'implant afin d'améliorer la résolution cartographique du réseau 3D. Nous avons déjà commencé à développer une deuxième génération d'implant sous la forme d'une maille qui intègre entre une vingtaine et soixantaine d'électrodes. Cette maille a l'avantage d'être flexible et d'être au contact avec la surface globale de la culture. La maille sera après couplée à la MEA pour mesurer une activité du réseau neuronal dans tous les points de la culture 3D.

Pour terminer, nous avons vu que le PEDOT : PSS apportait à la mesure du signal, une réduction du bruit et donc à un meilleur rapport signal/bruit. De plus on a vu que la structuration montrait une amélioration de la durée de vie des électrodes. Nous envisageons de structurer les électrodes de la MEA et de l'implant avec du PEDOT : PSS.

Concernant le suivi du pH, nous envisageons de faire prochainement des tests *in vitro* dans le milieu de culture neuronale avec les capteurs à base d'IrOx. Bien que le capteur IrOx ait été pré-calibré, des dérives du capteur surviennent pour les suivis long termes. Nous envisageons donc d'utiliser un deuxième capteur pH qui contrôlera avec plus de précision les mesures pH effectuées avec le capteur IrOx. Ce deuxième capteur pH est de type optique et il est basé sur le principe de fluorescence. Grâce à un film optique (PreSens)[4] positionné dans la chambre transparente de la MEA, il y aura en parallèle à la mesure pH effectuée par le capteur IrOx, une deuxième mesure pH.

Pour des études plus approfondies sur les capteurs IrOx, les causes des dérives du capteur pH restent encore partiellement non identifiées dans la littérature. Il serait nécessaire d'étudier le vieillissement de l'IrOx, comme on a pu l'observer par voltammétrie cyclique où le pic de réduction : Ir^{III}-OOH se réduisait après 10 jours de mesure en continue en solution. Ce changement est intrinsèquement lié aux propriétés physico/chimiques de l'IrOx qui changeraient à mesure que le matériau vieillirait. Il serait donc intéressant d'étudier le vieillissement de l'IrOx en solution et d'analyser ses propriétés de surface par Spectrométrie Photoélectronique X (XPS) pour analyser les types d'oxydes formés à sa surface ou bien aussi par Diffraction aux Rayons X (DRX) pour nous tenir informés des propriétés cristallographiques de l'IrOx.

D'autre part, à plus long terme, nous prévoyons de travailler sur d'autres voies de dépôt de l'IrO*x* pour améliorer la stabilité du capteur pour des mesures sur le long terme. Dans la littérature, il est observé que la méthode de préparation de l'oxyde d'Iridium influe fortement sur sa stabilité[5,6]. Deux types d'oxydes avec des morphologies très différents subsistent chez l'oxyde d'Iridium: cristalline et amorphe. La morphologie amorphe est celle que l'on a étudié tout au long de ce chapitre, elle est obtenue lorsque l'IrOx est déposé électrochimiquement et elle est moins stable thermodynamiquement. Alors que l'IrOx cristallin est thermodynamiquement plus stable. Il serait donc plus intéressant dans notre cas d'adopter un IrOx de type cristallin pour effectuer des mesures pH sur le long terme. Deux possibilités de déposition s'offrent à nous :

- Une première méthode consiste à oxyder thermiquement l'Iridium métal à des températures élevées de 400 à 600°C, méthode décrite dans la littérature sous la dénomination de TIROF (Thermally-formed Iridium Oxide Film)[7].

- Une autre méthode moins coûteuse pour former un IrOx cristallin, consiste à recuire thermiquement un IrOx déposé par voie électrochimique à des températures voisines des 500-600°C.

Cette dernière méthode semblerait fastidieuse puisqu'elle nécessiterait d'effectuer un recuit thermique à des températures élevées allant jusqu'à 600°C ce qui serait incompatible avec le procédé de fabrication de notre MEA. On peut envisager, d'adopter la première méthode, en remplaçant le dépôt d'or par un dépôt d'Iridium et de l'oxyder thermiquement par la suite.

Références

(1) Fog, A.; Buck, R. P. Electronic Semiconducting Oxides as PH Sensors. *Sens. Actuators* **1984**, *5* (2), 137–146. https://doi.org/10.1016/0250-6874(84)80004-9.

(2) Kinlen, P. J.; Heider, J. E.; Hubbard, D. E. A Solid-State PH Sensor Based on a Nafion-Coated Iridium Oxide Indicator Electrode and a Polymer-Based Silver Chloride Reference Electrode. *Sens. Actuators B Chem.* **1994**, *22* (1), 13–25. https://doi.org/10.1016/0925-4005(94)01254-7.

(3) Elsen, H. A.; Monson, C. F.; Majda, M. Effects of Electrodeposition Conditions and Protocol on the Properties of Iridium Oxide PH Sensor Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **2009**, *156* (1), F1. https://doi.org/10.1149/1.3001924.

(4) *Optical Sensor Technology*. https://www.presens.de/ (accessed 2022-04-05).

(5) Jang, H.; Lee, J. Iridium Oxide Fabrication and Application: A Review. *J. Energy Chem.* **2020**, *46*, 152–172. https://doi.org/10.1016/j.jechem.2019.10.026.

(6) da Silva, G. C.; Perini, N.; Ticianelli, E. A. Effect of Temperature on the Activities and Stabilities of Hydrothermally Prepared IrOx Nanocatalyst Layers for the Oxygen Evolution Reaction. *Appl. Catal. B Environ.* **2017**, *218*, 287–297. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.06.044.

(7) Geiger, S.; Kasian, O.; Shrestha, B. R.; Mingers, A. M.; Mayrhofer, K. J. J.; Cherevko, S. Activity and Stability of Electrochemically and Thermally Treated Iridium for the Oxygen Evolution Reaction. *J. Electrochem. Soc.* **2016**, *163* (11), F3132–F3138. https://doi.org/10.1149/2.0181611jes.

ANNEXES

Fiches process de fabrication des micro-dispositifs :

MEA

Etapes du process		Voie de réalisation	Caractéristiques	Equipement
Préparation du substrat et des masques	**Nettoyage substrat verre 4'' (AF32)**	Plasma O_2	P=800W, t=15 min	Diener
	Nettoyage des masques	Solution piranha	t=2min30	
Métallisation du substrat verre 4''		PVD	Ti (50nm) / Au(200nm)	Alliance EVA 600
Structuration des motifs	**Photolithographie**	Résine ECI 1 µm	t = 30sec, a=5000 rpm/sec v = 3600rpm Recuit 45s à 90°C	Gyrset SUSS Microtec or PIST
		Exposition UV	Hard contact 175mJ/cm^2, λ=405 nm Recuit 90s à 110°C	Süss Microtec
		Développement	Solution MFCD26, 3min Recuit 2min à 115°C	
	Gravure chimique	Gravure Or	Bain KI (iodure de potassium), t=2 min	
		Gravure Titane	Bain HF 5% (acide fluorhydrique), t=20 s	
Passivation des pistes	**Photolithographie**	Plasma O_2 pour l'adhésion	P=400W, t=5 min	Diener avec la cage de Faraday
		Dépôt résine SU8 3005 2,5µm	t= 30sec, v=2000rpm Recuit 3min à 95°C	Gyrset SUSS Microtec or PIST
		Exposition UV	Hard contact 130mJ/cm^2, λ=405nm Recuit 3min à 95°C	Süss Microtec
		Développement	SU8 developer, t= 4min30	
		Recuit résine avec montée en température	T=125°C, t=3min (rampe :5°C/min en montée et rampe :2°C/min en descente)	SU8 hotplate (F-FRAI)
Découpe de la MEA	**Application d'une résine de protection**	Résine AZ-4562 10µm	v=2000rpm, t=30sec Recuit 1min à 90°C	Gyrset SUSS Microtec or PIST
	Découpe au laser	Scie diamanté		DISCO
	Lift off résine	Bain d'acétone	t=1min	

Implant

Etapes du process		Voie de réalisation	Caractéristiques	Equipement
Préparation du substrat et des masques	**Nettoyage substrat Silicium 4'' (SiP)**	Plasma O_2	P=800W, t=5min	Diener
	Nettoyage des masques	Solution piranha	t=2min30	
Dépôt 1ière couche de Parylène (23µm)		CVD	m=62g, t=3h30, $t_{chambre}$ = 30°C $t_{pyrolyse}$ = 670°C P_{max} = 60x10^{-3} mbar	Comelec
Structuration des motifs	**Photolithographie**	Plasma O_2 pour l'adhésion	P=200W, t=30s	Diener avec cage Faraday
		Dépôt résine AZ-nLOF 2035 5µm	t=30s, a=5000 rpm/s v=1300rpm Recuit 90s, 110°C	Gyrset SUSS Microtec or PIST
		Exposition UV	Vaccum contact 150mJ/cm^2, λ=405 nm Recuit 1min30 à 110°C	Süss Microtec
		Développement	MFCD-26, t=2min30	
	Métallisation des motifs	PVD	Ti (50nm) / Au(200nm)	Alliance EVA 600
	Lift off	Bain acetone	t=3h	
Passivation des pistes avec 2ième dépôt d'une couche de Parylène (1,3µm)		CVD	m=3g, t=45min, $t_{chambre}$ = 30°C, $t_{pyrolyse}$ = 670°C, P_{max} = 60x10^{-3} mbar	Comelec
		Traitement thermique	T=100°C, t= 16 h (rampe :1°C/min) Gaz : N_2	Four AET 4''
Gravure couche de passivation	**Photolithographie**	1er dépôt de résine AZ-ECI 3027 2,5µm	t=30s, a=5000 rpm/s, v=3600 rpm Recuit 45s à 90°C	Gyrset SUSS Microtec or PIST
		2ième dépôt de résine AZ-ECI 3027 2,5µm	t=30s, a=5000 rpm/s, v=850 rpm Recuit 90s à 90°C	Gyrset SUSS Microtec or PIST
		Exposition UV	Vaccum contact 300mJ/cm^2, λ=405 nm Recuit 1min15 à 110°C	Süss Microtec
		Développement	MFCD-26, t=35s	
	Gravure plasma	Plasma O_2	T=10°C, flux O_2=20 sccm, P=20 mmHg, P_{ICP}=500W, P_{bias}=10W t=4min40	ICP3 -Avisa Technology Omega 201
	Lift off résine	Bain d'acétone	t=30s	
Gravure de libération des implants	**Photolithographie**	Plasma O_2 pour l'adhésion	P=200W, t=30s	Diener avec cage Faraday
		Dépôt résine BPN 50µm	t=30s, a=5000rpm/s, v=350rpm Recuit 6min30 à 120°C	Gyrset SUSS Microtec or PIST
		Exposition UV	Soft contact 2,55J/cm^2, λ=405 nm Recuit 1min30 à 110°C	Süss Microtec
		Développement	MFCD-26, t=5min30	
	Gravure plasma	Plasma O_2 et C_4F_8	T=10°C, flux O_2=20 sccm, P=20 mTorr, P_{ICP}=500W, P_{bias}=10W t=18min (O2)+1min(C4F8)+7min(O2)	Alcatel P4
	Libération des implants	Eau DI	t=2h	
	Lift off résine	NF52	T=70°C, t=7min30	
	Rinçage des implants	Eau DI	t=15min	

Principe d'une mesure EIS

La Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (abrégée par SIE ou EIS en anglais) est un outil puissant pour l'étude de la structure et des caractéristiques électriques de l'interface électrochimique. La technique consiste à mesurer le courant circulant dans la cellule électrochimique après l'application d'un potentiel modulé sinusoïdal. On l'appelle «spectroscopie » parce que la modulation de potentiel se fait sur une certaine gamme de fréquences et constitue, un spectre de fréquence (Figure . 1). Dans ces conditions, il est ainsi possible d'obtenir une réponse électrique fiable correspondant à l'état du système au moment de la perturbation[1].

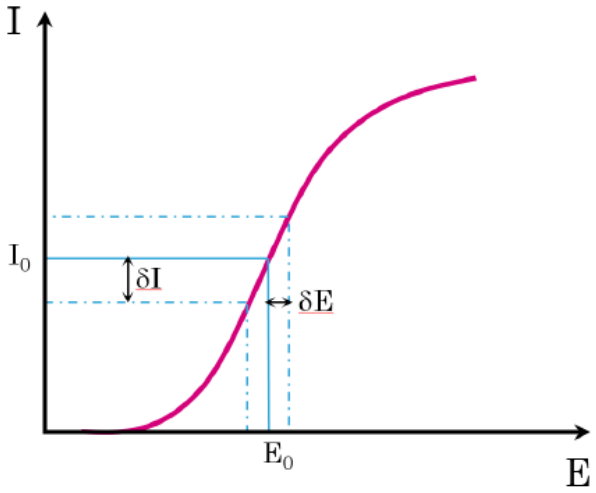


Figure . 1: Signal caractéristique d'une perturbation électrochimique aux bornes d'un accumulateur.

Dans la pratique, il s'agit d'appliquer une perturbation sinusoïdale en potentiel (PEIS : Potentiostatic Electrochemical Impedance Spectroscopy) de quelques millivolts d'amplitude autour de la tension d'équilibre du système.

$$\text{Signal d'entrée : } E_{WE} = \mathrm{E} + V_a \sin(\omega t) \quad \text{avec } \omega = 2\pi f \quad \textit{(Eq . 1)}$$

La réponse sinusoïdale de sortie sera obtenue en courant et accompagnée d'un déphasage dépendant des éléments électriques présents dans le système (Figure. 2).

$$\text{Signal de sortie : } \quad I_{WE} = \mathrm{I} + I_a \sin(\omega t + \varphi) \quad \textit{(Eq . 2)}$$

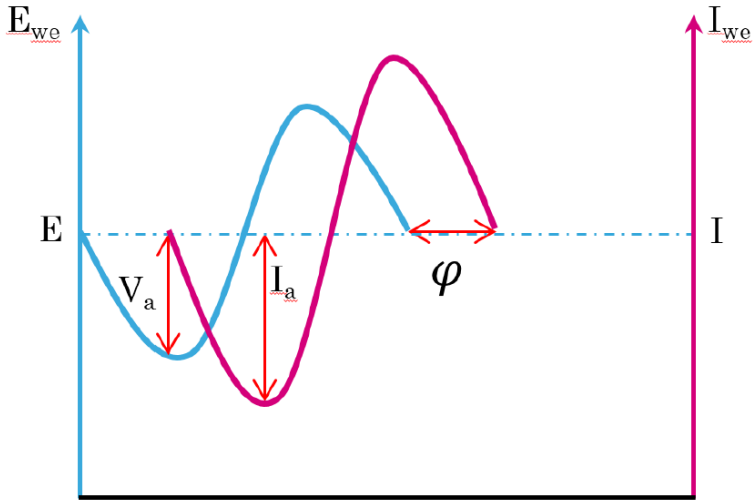


Figure . 22: Déphasage entre la perturbation électrique en potentiel d'entrée et signal de sortie en courant.

L'impédance électrochimique correspond alors au rapport du signal d'entrée sur le signal de sortie.

$$Z = \frac{E_{WE}}{I_{WE}} = \frac{E + V_a \sin(\omega t)}{I + I_a \sin(\omega t + \varphi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (Eq\ .\ 3)$$

Il est généralement de coutume de l'exprimer sous forme complexe :

$$Z(\omega) = \frac{E_{WE}}{I_{WE}} = Z_0\, e^{j\varphi} = Z_0 + (\cos\varphi + j \sin\varphi) \quad (Eq\ .\ 4)$$

En reportant sur un graphique la partie imaginaire (Z'') en fonction de la partie réelle (Z') il est possible de représenter le spectre d'impédance dans le plan de Nyquist (Figure. 3).

$$Z' = |Z| \cos(\varphi) \quad (Eq\ .\ 5)$$

$$Z'' = |Z| \sin(\varphi) \quad (Eq\ .\ 6)$$

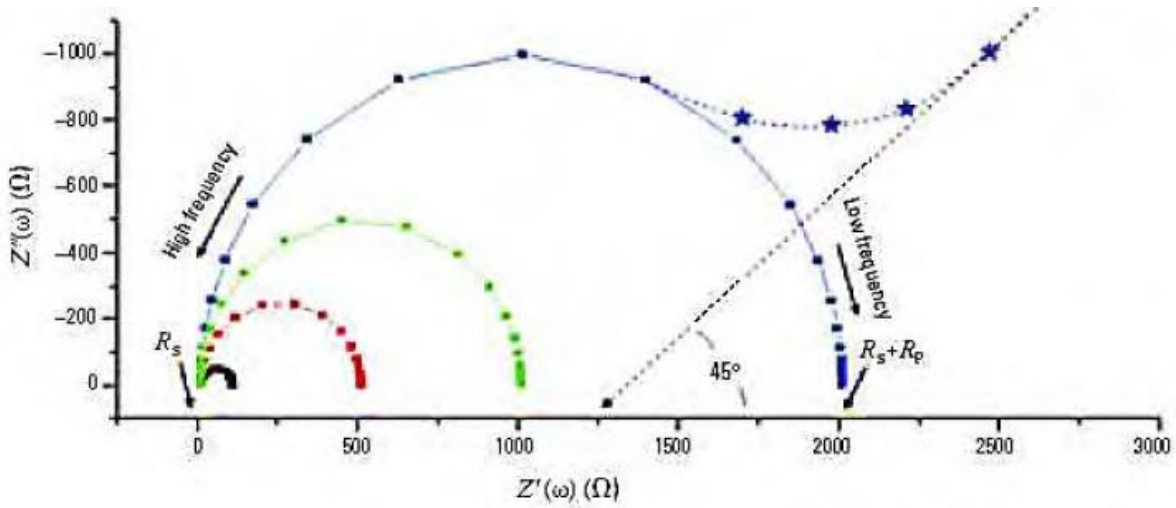


Figure . 3: Diagramme de Nyquist.

Cette mesure, valable pour une seule fréquence, va alors être répétée sur toute une gamme fréquentielle afin de pouvoir avoir une image complète du système électrochimique étudié. L'ensemble des points obtenus constitue ainsi le diagramme d'impédance électrochimique. Avec cette représentation, il est possible d'extraire les valeurs des différents composants du circuit de l'interface électrode/solution comme la composante Faradique de la composante non Faradique (Figure. 4). Ce circuit appelé "circuit Randless" est constitué d'une capacité de la double couche électrique (Cd), d'une résistance de transfert de charge (Rp), de la composante de diffusion de Warburg modélisant le processus de diffusion en spectroscopie et d'une résistance de l'électrolyte (Rs).

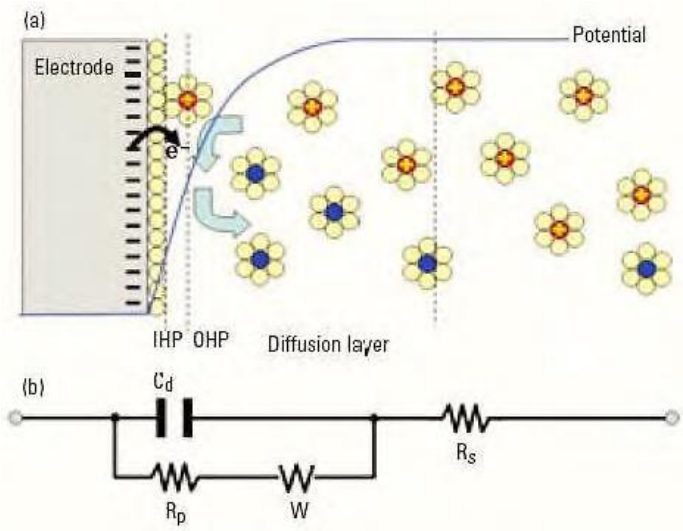


Figure . 23: Image schématique de a) l'interface électrode/solution et b) du circuit de Randless associé.

D'autres types de représentations peuvent également être utilisés. Par exemple en coordonnées polaires, puisque

$Z(\omega) = Z_0\, e^{j\varphi}$.

Cette représentation est plus connue sous le nom de diagramme de Bode et qui a été principalement rapporté dans ce manuscrit.

(1) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.